

**PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR  
BİLEŞİKLERİNİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER)  
STRESİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**İrem ÇOKSEVER**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR BİLEŞİKLERİNİN  
ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNE OLAN ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**İrem ÇOKSEVER**  
0000-0002-8222-9399

Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2021  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ ONAYI

İrem ÇOKSEVER tarafından hazırlanan “PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR BİLEŞİKLERİNİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN

- Başkan** : Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT  
TEPEDELEN  
0000-0002-9565-6349  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
İmza
- Üye** : Prof. Dr. Sezai TÜRKEL  
0000-0001-7128-6948  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
İmza
- Üye** : Prof. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK  
0000-0002-6189-1818  
Ege Üniversitesi,  
Eczacılık Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı  
İmza

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN**  
**Enstitü Müdürü**

.././.....

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

.../.../.....

**İrem ÇOKSEVER**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR BİLEŞİKLERİNİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**İrem ÇOKSEVER**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN

Hücrenin en büyük organeli olan endoplazmik retikulum; protein sentezi ve transportu, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanması gibi çok çeşitli roller üstlenmiştir. Hatalı formdaki proteinlerin ER lümeninde birikimi ise, serbest şaperon seviyelerini düşürerek “ER stresi” adı verilen süreci tetiklemektedir. Hücrelerin bu stres ile başa çıkabilmeleri ancak ER’nin protein katlama kapasitesini arttırması ve hatalı katlanan proteinlerin protein yıkım sürecine yönlendirilerek etkisiz hale getirilmesini sağlayan UPR adıyla bilinen yolağın devreye girmesiyle sağlanır. UPR yolağı, ER membranında BiP proteinine bağlı inaktif formda tutulan ve IRE1, ATF6 ve PERK olarak adlandırılan lokalize 3 adet transmembran özellikteki ER sensör proteini aracılığıyla kontrol edilmektedir. eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu ise hücrelerin strese nasıl yanıt vereceğine karar vermektedir. Orta seviyelerdeki fosforilasyon translayonu kısa bir süreliğine durdurarak hatalı proteinlerin yeniden düzenlenmesine yol açarken, güçlü seviyedeki fosforilasyon apoptozu tetiklemektedir. Literatürde bor ile ilgili yapılmış olan çalışmalara bakıldığında bor bileşiklerinin prostat kanseri tedavisinde umut vaat eden bileşikler olduğu ancak gerek borik asit gerekse özel sentez bor bileşiklerinin prostat kanseri hücrelerindeki etkisine dair daha fazla çalışmanın yapılması gerekliliği olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında, LNCaP prostat kanseri hücrelerinde ER stres ajanları kullanılarak, yeni sentez bor bileşiği M7’nin ER stresi-UPR sinyal yolağına olan etkileri ve moleküler hedefleri araştırıldı. Bu çalışma kapsamında M7’nin anti-proliferatif etkileri belirlendikten sonra, QRT-PCR ve Western Blot ile M7 varlığında ve yokluğunda belirlenen sinyal yolağındaki BiP, CHOP, eIF2 $\alpha$  ve PERK gibi hedef genlerin ekspresyon değişiklikleri transkripsiyonel ve translayonel olarak incelendi. Elde edilen veriler ile M7’nin ER stresini tetiklediği ve ayrıca ER stresi ajanları Tunikamisin ve Tapsigargin ile birlikte sinerjik etki gösterdiği belirlendi. Sonuç olarak M7 ile ER stresinin tetiklenerek proliferasyonun inhibe edilmesinin ve aynı zamanda prostat kanseri gelişiminde kritik rol oynayan AR sinyalinin bloke edilmesinin önemli bir terapi seçeneği sunabileceği düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** ATF6, Bor Bileşikleri, ER stresi, IRE1, LNCaP, PERK, UPR

**2021, xi +108 sayfa**

## ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATING THE EFFECT OF BORON COMPOUNDS ON ENDOPLASMIC  
RETICULUM STRESS (ER) IN THE PROSTATE CANCER LNCaP CELL LINE

**İrem ÇOKSEVER**

Bursa Uludag University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetics

**Supervisor:** Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN

The endoplasmic reticulum, the largest organelle of the cell; It has played a wide variety of roles such as protein synthesis and transport, protein folding, lipid and steroid synthesis, carbohydrate metabolism and calcium storage. Accumulation of proteins in the wrong form in the ER lumen triggers the process called “ER stress” by lowering free chaperone levels. The cells' ability to cope with this stress can only be achieved by increasing the protein folding capacity of the ER and by activating the pathway known as the UPR, which ensures that the misfolded proteins are directed to the protein degradation process and inactivated. The UPR pathway is controlled by 3 transmembrane ER sensor proteins called IRE1, ATF6 and PERK, which are kept in an inactive form bound to the BiP protein in the ER membrane. eIF2 $\alpha$  phosphorylation decides how cells respond to stress. Moderate levels of phosphorylation stop translation for a short time, leading to rearrangement of faulty proteins, while strong levels of phosphorylation trigger apoptosis. When the studies on boron in the literature are examined, it is seen that boron compounds are promising compounds in the treatment of prostate cancer, but there is a need for more studies on the effects of boric acid and special synthesis boron compounds on prostate cancer cells. In this thesis, the effects of the new synthesized boron compound M7 on the ER stress-UPR signaling pathway and its molecular targets were investigated by using ER stress agents in LNCaP prostate cancer cells. Within the scope of this study, after determining the anti-proliferative effects of M7, the expression changes of target genes such as BiP, CHOP, eIF2 $\alpha$  and PERK in the signal pathway determined in the presence and absence of M7 by QRT-PCR and Western blot were examined transcriptional and translational. With the obtained data, it was determined that M7 triggered ER stress and also showed a synergistic effect with ER stress agents Tunikamycin and Tapsigargin. As a result, it was thought that inhibiting proliferation by triggering ER stress with M7 and at the same time blocking the AR signal, which plays a critical role in the development of prostate cancer, may offer an important therapy option.

**Key words:** ATF6, Boron Compounds, ER stress, IRE1, LNCaP, PERK, UPR

**2021, xi +108 pages**

## TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi'ndeki akademik yaşantım boyunca bana verdiği rehberlik ve destek için akademik danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Burcu Erbaykent Tepedelen'e içten ve derin teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarımnda benden desteklerini esirgemeyen Yusuf Yay'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, özellikle babam Mehmet Güner Çoksever'e, annem Şükran Çoksever ve ablam Gizem Çoksever'e bugüne kadar bana verdikleri destek ve sevgileri için sonsuz ve içten teşekkürlerimi sunarım.

İrem ÇOKSEVER  
.../.../.....

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	5
2.1. Prostat Kanseri .....	5
2.1.1. Prostat nedir?.....	5
2.1.2. Prostat bezinin zonal anatomisi.....	7
2.1.3. Prostat fizyolojisi .....	9
2.1.4. Prostat kanserinin etiyolojisi .....	9
2.1.5. Prostat kanserinin tanısı .....	10
2.1.6. Belirtiler .....	12
2.1.7. Evreleme .....	12
2.1.8. Androjen-bağımlı prostat kanseri.....	13
2.1.9. Androjen-bağımsız prostat kanseri .....	14
2.1.10. Prostat kanseri hücre hatları .....	15
2.1.11. Prostat kanseri tedavisi.....	16
2.1.12. Tedavide kullanılan ilaçlar .....	17
2.1.13. Prostat kanseri ile ilişkili moleküler değişiklikler.....	18
2.2. ER Stresi .....	23
2.2.1. Endoplazmik Retikulum nedir?.....	23
2.2.2. ER stresi nedir? .....	25
2.2.3. Protein katlanması ve hücrelerin yanlış katlanmaya tepkisi .....	27
2.2.4. GRP78 .....	29
2.2.5. ERAD.....	31
2.2.6. UPR sinyal yolları .....	33
2.2.7. PERK'in etkinleşmesi ve işlevi.....	34
2.2.8. IRE-1'in etkinleşmesi ve işlevi .....	39
2.2.9. XBP-1.....	41
2.2.10. ATF6'nın etkinleşmesi ve işlevi .....	43
2.2.11. Kontrol altına alınamayan ER stresi durumunda hücrelerin apoptoz kararı .....	44
2.2.12. ER stresine neden olan kimyasallar .....	45
2.2.13. Çalışma kapsamında araştırılacak ER stresi ile ilişkili genler .....	46
2.3. Bor Elementi .....	50
2.3.1. Kullanım alanları.....	51
2.3.2. Bor çevreye nasıl ve nereden gelir? .....	51
2.3.3. Borun insanlara etkisi.....	52
2.3.4. Borun prostat kanseri, ER stresi ile ilişkisi ve mekanizması .....	53
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	56
3.1. Hücre Kültürü.....	56
3.1.1. Materyal .....	56



3.1.2. Hücrelerin bakımı ve pasajlanması .....	57
3.1.3. Hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi .....	58
3.1.4. Hücre sayımı .....	58
3.1.5. M7 bor bileşiğinin sentezi ve yapısı .....	59
3.1.6. Serum yoksunluğu ve madde (androjen (R1881) ve ER stres ajanları) uygulamaları .....	60
3.1.7. Sitotoksosite analizleri (MTT) .....	60
3.2. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....	61
3.2.1. Materyal .....	61
3.2.2. RNA izolasyonu .....	63
3.2.3. cDNA sentezi .....	64
3.2.4. Real-Time PCR .....	64
3.3. Western Blot (İmmünoablottlama) .....	66
3.3.1. Materyal .....	66
3.3.2. Protein izolasyonu .....	70
3.3.3. Protein miktarının belirlenmesi .....	70
3.3.4. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması .....	71
3.3.5. Jel hazırlama .....	71
3.3.6. Örnek hazırlama .....	72
3.3.7. Proteinlerin jelle yüklenmesi ve jelle yürütme .....	72
3.3.8. Jelden membrana transfer .....	73
3.3.9. Antikor işaretleme .....	73
3.3.10. Bantların görüntülenmesi .....	74
4. BULGULAR .....	75
4.1. Sitotoksosite Sonuçları (MTT) .....	75
4.2. QRT PCR Sonuçları .....	77
4.3. Western Blot Sonuçları .....	84
4.3.1. Örnek seti-1 (normal koşullar) .....	84
4.3.2. Örnek seti-2 (hormon deprivasyonlu koşullar) .....	87
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	92
KAYNAKLAR .....	101
ÖZGEÇMİŞ .....	108

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklama

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
mL	Mililitre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
%	Yüzde

### Kısaltmalar

### Açıklama

ADT	Androjen deprivasyon tedavisi
AMFR	Autocrine Motility Factor Receptor
AR	Androjen reseptör
ATF4	Transkripsiyon faktörü 4
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
BPH	İyi huylu prostat hiperplazisi
CHOP	C/EBP homolog proteini
CREB-2	cAMP-tepki elemanı bağlayıcı protein 2
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3
DNAJB9	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B9
DNAJC10	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member
DRE	Dijital rektal muayene
DR5	Death Receptor 5
eIF2 $\alpha$	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 2 $\alpha$
ER	Endoplazmik Retikulum
ERSE	ER stres yanıtı elemanlarına
ER1 $\alpha$	ER oksidoredüktin-1 $\alpha$
EDEM	ER degradation-enhancing a-mannosidase-like protein
EIF2AK3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated degradation
ERN1	Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signalling1
FAK	Fokal adhezyon kinaz
GLS	Golgi-lokalizasyon sinyali
Grp78	Glucose regulated protein 78
HSPA5	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5
IRE1	İnozitol içeren enzim 1
ISR	Entegre stres tepkisi
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
LHRH	Luteinleştirici hormon salgılatıcı hormon agonistleri
MHC	Majör histo-uyumluluk kompleksi
UPR	Unfolded protein response (Katlanmamış protein yanıtı)
PERK	PKR-benzeri endoplazmik retikulum kinaz
Pca	Prostat kanseri

PKR	Aktive protein kinaz
PSA	Prostata özgü antijen
RIDD	Regüle edilmiş IRE1-bağımlı bozunma
ROS	Reaktif oksijen türleri
S2P	Site-2 proteazları
SERCA	ATP'ye bağlı ER Ca <sup>2+</sup> pompası
SVIP	Small VCP Interacting Protein
SYVN	Synoviolin
TBP	TATA-Box Binding Protein
TRAF2	Tumour necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor-2
TRUS	Transrektal ultrason
UFD1	Ubiquitin Recognition Factor In ER Associated Degradation 1
uORF	Kısa açık okuma çerçeveleri
VCP	Valosin Containing Protein
XBP1	X-box bağlayıcı protein 1

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Normal prostat anatomisi.....	6
Şekil 2.2. McNeal'in insan prostatının bölgesel anatomisinin diyagramları .....	7
Şekil 2.3. Prostatın bölgesel anatomisi: prostatın 3 glandular zonu ve anterior fibromusküler stroma.....	8
Şekil 2.4. Prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve yaşayabilirliğinin regülasyonunda AR'nin hücre döngüsü bağımlı aktivitesi.....	14
Şekil 2.5. LNCaP Hücre Hatlarının Mikroskopik Görüntüsü .....	16
Şekil 2.6. Prostat kanserinin moleküler patogenezi .....	18
Şekil 2.7. İnsan prostat kanseri ilerlemesi. İlerleme aşamaları spesifik kromozom bölgelerinin ve aday tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile ilişkilidir.....	23
Şekil 2.8. Prostat kanseri patogenezindeki moleküler değişiklikler. Kırmızı X işaretleri bloke edilen prosesleri ve üretilmeyen molekülleri, noktalı ana hatlar seviyesi azalan molekülleri, A harfi mRNA'nın poliA kuyruğunu temsil etmektedir. NKX3.1-AKT etkileşimi henüz kanıtlanmadığı için soru işareti ve noktalı ok ile gösterilmiştir.....	22
Şekil 2.9. ER yapısı ve genel fonksiyonlar .....	24
Şekil 2.10. Memeli ER stres tepkisi. ER'de katlanmamış proteinlerin birikmesi ER stresini indükler ve hücreler bununla başa çıkabilmek için ER stres tepkisini uyarır. Memeli ER stres tepkisi 4 mekanizmadan oluşur: 1) translasyon zayıflaması; 2) ER şaperonlarının ifadesi; 3) geliştirilmiş ERAD; 4) apoptoz .....	26
Şekil 2.11. Glikoprotein katlanması ve bozulması. ER'de sentezlenen yeni oluşan glikoproteinlerin şeker zincirleri, glukozidaz I veya II tarafından kesilir ve bir glikoz kalıntısı içeren polipeptitler, kalneksin döngüsü ile katlanır. Kalneksin döngüsü tarafından katlanamayan bir polipeptit kalıntısı, mannosidaz I tarafından çıkarılır ve daha sonra polipeptitler, EDEM tarafından tanınır ve ERAD tarafından bozulur.....	29
Şekil 2.12. ER stresinin sinyal yolları.....	30
Şekil 2.13. Memeli ERAD mekanizması. Kalneksin döngüsünden salınan katlanmamış proteinler, EDEM ve OS9 içeren bir tanıma kompleksi tarafından yakalanır, retrotranslokasyon makinesi yoluyla sitozole taşınır, E1-E2-E3 sistemi tarafından poli-übikitinleştirilir ve proteazom tarafından bozulur .....	32
Şekil 2.14. UPR sinyal yolunun 3 ana dalı ve bunların ara bağlantıları .....	33
Şekil 2.15. Katlanmamış Protein Tepkisi (UPR) bağımlı sinyal dallarının yapısı ve aralarındaki karışma .....	34
Şekil 2.16. PERK yolunun aktivasyonu. (A) PERK, IRE1 ve ATF6'nın aktivasyonu. ER stresi olmadığında BiP, bu sensörlere bağlanarak PERK, IRE1 ve ATF6'nın aktif hale gelmesini engeller. BiP, IRE1 ve PERK aktivasyonunu oligomerize olmalarına izin vermeyerek engellerken, ATF6'nın translokasyonunu Golgi-lokalizasyon sinyalini (GLS) maskeleyerek engeller. BiP, katlanmamış proteinler tarafından sensörlerden ayrıldığında, bu sensör molekülleri aktive olur. (B) ATF4 ifadesinin düzenlenmesi. ER stresinin yokluğunda, eIF2a'nın çoğu aktiftir (fosforile değildir) ve çeviri küçük ORF'lerde başlar ve ATF4 ORF'ye ulaşmadan önce ribozomların salınmasına yol açar. ER stresi üzerine, eIF2a'nın çoğu inaktif hale gelir (fosforile olur) ve çeviri nadiren küçük ORF'lerde başlar .....	37

Şekil 2.17. Normal epitel hücreleri ve kanser hücrelerinde ER stres koşullarına PERK- bağımlı UPR sinyal yolu aktivasyonu ile ilgili yanıt.....	38
Şekil 2.18. Serbest radikallerin biyolojik kökeni ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) genellikle hem içsel faktörlerden (hücre altı organellerde fizyolojik olarak yürütülen enzimatik reaksiyonlar) hem de çok sayıda dışsal olanlardan türetilir. ROS, bağışıklık tepkisi veya redoks sinyalleri de dahil olmak üzere hücrenin normal işleyişi için açıkça gerekli olmasına rağmen, aşırı yüklenmeleri zararlı olabilir ve önemli hasara neden olabilir. Nihayetinde, apoptotik veya nekrotik hücre ölümünün yürütülmesine yol açabilir veya hatta tümör büyümesini sağlayabilir. Katlanmamış Protein Tepkisi (UPR) sinyal yolu, ROS kaynaklı oksidatif stres ile yakından bağlantılıdır ve hücrel redoks dengesizliğini ele almak için aktive olur.....	36
Şekil 2.19. İnsan IRE1 $\alpha$ 'ya bağlı sinyal yolunun aktivasyonu.....	40
Şekil 2.20. ER'nin UPR'sindeki XBP1 sinyal yolunun şematik diyagramı .....	42
Şekil 3.1. Yeni sentez bor bileşiği M7'nin sentez yolu ve yapısı .....	59
Şekil 4.1. M7'nin LNCaP hücre hattında zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığına etkisi.....	75
Şekil 4.2. A) M7'nin LNCaP hücre hattında GraphPad yazılım programı ile % canlılık değerlerine karşı logaritmik konsantrasyonlarından elde edilen proliferasyon eğrileri B) LNCaP hücre hattında M7 uygulamalarının GraphPad yazılım programı ile elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri. ....	76
Şekil 4.3. A) ER stresi ajanları ve M7 uygulamalarının AR mRNA seviyesine etkileri B) ER stresi ajanları ve M7 uygulamalarının PSA mRNA seviyelerine etkisi....	77
Şekil 4.4. <i>ATF4</i> ve <i>ATF6</i> genlerinin Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarına göre mRNA seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi. ....	78
Şekil 4.5. <i>ERN1</i> ve <i>EIF2AK3</i> genlerinin Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarına göre mRNA seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi. ....	79
Şekil 4.6. <i>DDIT3</i> ve <i>HSPA5</i> genlerinin Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarına göre mRNA seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi .....	80
Şekil 4.7. <i>XBP1</i> ve <i>DNAJB9</i> genlerinin Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarına göre mRNA seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi. ....	81
Şekil 4.8. Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla <i>DNAJC10</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi. ....	81
Şekil 4.9. Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla <i>SVIP</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi.....	82
Şekil 4.10. Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla <i>VCP</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi.....	82
Şekil 4.11. Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla <i>SYVN</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi.....	83
Şekil 4.12. Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla <i>UFD1</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi.....	83
Şekil 4.13. Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla <i>AMFR</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi.....	83
Şekil 4.14. A) LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması sonucu gözlenen prostat kanseriyle ilişkili proteinlerin (AR ve PSA) ifadelerinin karşılaştırmalı şekilde incelenmesi (GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.) B) LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması sonucunda Image J	

yazılımı ile AR ve PSA'nın kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri .....	84
Şekil 4.15. A) LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması sonucu gözlenen ER stresi ile ilişkili proteinlerin ifadelerinin karşılaştırmalı şekilde incelenmesi (GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.) B) LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile BiP ve CHOP'un kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri C) LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile EIF2 $\alpha$ , pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$ ve PERK'in kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri .....	85
Şekil 4.16. A) Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucu gözlenen AR ve PSA'nın protein ifadelerinin karşılaştırmalı şekilde incelenmesi (GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.) B) Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile AR ve PSA'nın kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri .....	87
Şekil 4.17. Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucu gözlenen ER stresi ile ilişkili proteinlerin ifadelerinin karşılaştırmalı şekilde incelenmesi (GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.) .....	89
Şekil 4.18. Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile BiP ve CHOP'un kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri. ....	89
Şekil 4.19. Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile EIF2 $\alpha$ , pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$ ve PERK'in kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri .....	90

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1. Real-Time PCR’da ekspresyon profilleri analizlenecek genler.....	65
Çizelge 3.2. Protein moleküler ağırlığına göre jel konsantrasyon yüzdeleri .....	71
Çizelge 3.3. Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları.....	72
Çizelge 3.4. Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları .....	72

## 1. GİRİŞ

Kanser, dış ve/veya iç faktörler sebebiyle kontrolsüz bölünen hücrelerin aşırı çoğalması ve hücre ölüm programının bozulmasından kaynaklanan multifaktöriyel hastalıktır (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020). Kanser, dünya çapında ölümün ana nedenlerinden biri haline gelmesi nedeniyle günümüzde ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Muhtemelen tümör mikroçevresi oksidatif stresten etkilendiği için kanser hücrelerinin metabolizmasına bağlı olarak kötü klinik prognoz durumu ortaya çıkmaktadır. Bu olay fazla sayıda hücre sel yanıtı tetiklemekte ve böylece kanserin daha fazla ilerlemesi için uygun koşulları yaratmaktadır (Storm ve ark. 2016). Prostat kanseri (PCa), cilt kanserinden sonra en sık teşhis edilen kanser ve batı dünyasındaki erkekler arasında kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedeni olarak dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Yedi erkekten yaklaşık birinin yaşamları boyunca PCa teşhisi konacağı tahmin edilmektedir (Storm ve ark. 2016).

Hücresinin en büyük organeli olan endoplazmik retikulum; protein sentezi ve transportu, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanması gibi çok çeşitli roller üstlenmiştir (Schwarz ve Blower 2016). Sekretör yolağa giriş için portal görevi üstlenen ER’de hücrenin toplam protein sentezinin %30’luk bölümü gerçekleşmektedir (Bastiaansen ve ark. 2015). Katlanma süreci hatasız bir süreç değildir. Yeni sentezlenen proteinlerin üçte birlik bölümünün hatalı katlandığı bilinmektedir. Proteinler uygun şekilde katlanmış olsalar da, ısı ve ER stresi gibi hücre sel streslere sürekli olarak maruz kaldıklarından, hücre içerisinde sıklıkla aşınmaya uğramaktadırlar (Nishikawa ve ark. 2005). Hatalı katlanan ya da agregat olan proteinler hücre için son derece sitotoksiktir. Hatalı formdaki proteinlerin ER lümeninde birikimi, serbest şaperon seviyelerini düşürerek “ER stresi” adı verilen süreci tetiklemektedir. Hücrelerin bu stres ile başa çıkabilmeleri ancak ER’nin protein katlama kapasitesini arttırması ve hatalı katlanan proteinlerin protein yıkım sürecine yönlendirilerek etkisiz hale getirilmesi ile mümkündür. Bu amaçla hücrelerde Katlanmamış Protein Cevabı (UPR, unfolded protein response) adı ile bilinen yolak devreye girmektedir. Endoplazmik retikulum (ER) stresi, toplu olarak katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan bir dizi sinyal yolunu aktive eder (Lin ve ark. 2007). ER stresi, ER'nin proteinleri katlama



ve aktarma kabiliyeti ile yanlış katlananların bozulması arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkar. ER, oksidatif hasara nispeten duyarlı bir organel olduğundan, yukarıda bahsedilen koşullar hızla katlanmamış protein yanıtı (UPR) sinyal yolunun aktivasyonuna neden olur. UPR'nin sonucu, çok sayıda faktöre bağlı olarak, pro-survival ve pro-apoptotik dal arasında değişebilir ve bunlar arasında geçiş yapabilir. Bu nedenle kanser hücrelerinin kaderine karar vermede karşıt etkiler gösterir (Siwecka ve ark. 2019). UPR, ER'nin metabolik ve protein katlama verimliliğini eski haline getiren ER stresini hafifletmek için geliştirilmiş adaptif bir mekanizmadır. UPR'nin aktivasyonu, ER zarında bulunan üç stres sensörünün uyarılmasıyla başlatılır: PKR-benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), İnozitol gerektiren enzim 1 (IRE1) ve aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF6) (Santamaría ve ark. 2019). Bu üç UPR dalı (IRE1, PERK ve ATF6), katlanmamış protein seviyelerini azaltarak hücre sağkalımını artırır. UPR sinyali, ER stresi azaltılmazsa apoptotik hücre ölümünü de destekler (Lin ve ark. 2007).

Stres algılama esas olarak BiP olarak da bilinen ER yerleşik şaperon olan GRP78'e (HSPA5) bağlıdır (Santamaría ve ark. 2019). ER stresinin indüksiyonu sonrası represör olarak görev yapan BiP'in sensörlerden uzaklaşması, ER sensör proteinlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Nishikawa ve ark. 2005). Normal fizyolojik koşullar altında, bu 3 transmembran proteini BiP tarafından inaktif bir konfigürasyonda tutulur. Yanlış katlanmış proteinlerin ya da UPR'yi aktive edebilen diğer uyanların birikmesi üzerine BiP, ER sensörlerinden ayrılır ve bunun yerine ER lümenindeki katlanmamış proteinlere bağlanır (Storm ve ark. 2016). Her 3 ER stres sensörü de hayatta kalma veya ölüm kararlarını kontrol eden sinyal yollarını tetikler. Katlanmamış proteinlerin birikmesi, GRP78'i sekestre ederek UPR'den sorumlu 3 adet ER yerleşik sensörünün aktivasyonunu tetikler. IRE1, fonksiyonel transkripsiyon faktörü XBP1'leri oluşturan XBP'i (XBP1u) kodlayan mRNA'nın alışılmadık bir şekilde birleştirilmesine aracılık eder ve NFκB sinyallemesini aktive edebilir. IRE1 Rnaz, ER ile ilişkili RNA'ları RIDD (regüle edilmiş IRE1-bağımlı bozunma) yoluyla bozar. PERK, eIF2α'yı, transkripsiyon faktörü ATF4'ün translasyonunu teşvik ederken global translasyonu inhibe etmek için fosforile eder. PERK ayrıca, NRF2'yi fosforile edebilir. SP1 ve SP2 proteazları, bZIP alanının (ATF6bZIP) salınmasına aracılık ettiği için ATF6, ER'den Golgi'ye taşınır. Çekirdeğin XBP1'lerinde, ATF4 ve ATF6bZIP transkripsiyon faktörleri, hücrelerin ER

stresini hafifletmesine yardımcı olmak için çok sayıda genin ekspresyonunu tetikler. Kalıcı ER stresi üzerine, UPR apoptozu tercih eder. Kanser hücreleri, tümörle ilişkili stres durumlarında hayatta kalmayı desteklemek için UPR sinyalinden yararlanır (Santamaría ve ark. 2019).

UPR sinyali, salgı yolunun hemen hemen her yönünde yer alan proteinlerin ekspresyonunu indükleyerek homeostazı geri kazanmayı amaçlamaktadır. Gen ekspresyon verileri, UPR'nin ER'ye protein girişi, katlanma, glikozilasyon, ER ile ilişkili degradasyon (ERAD), protein kalite kontrolü, redoks metabolizması, otofaji, lipid biyogenezi ve veziküler kaçakçılığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda yapılan bir dizi çalışma prostat kanserinde (PCa) UPR'yi etkilemiştir ve bu anahtar stres sinyal yolu ve PCa'daki regülasyonu hakkındaki anlayışımızı büyük ölçüde genişletmiştir (Storm ve ark. 2016).

İnsanlar için iz elementi olarak kabul edilen bor elementi, organizmada birçok önemli göreve sahiptir (Bradke ve ark. 2008, Nielsen ve Meacham 2011). Borun insan vücudunda enzim aktivitesini düzenlediği, bağışıklık sistemi ve insülin metabolizmasında görev aldığı bilinirken; kalsiyum, magnezyum ve vitamin D ile ilişkili olan bor, kemik metabolizmasında da önemli görevler üstlenmektedir (Korkmaz 2011, Duydu ve ark. 2011). Yapılan çalışmalar sonucu yüksek miktarda bor bileşiğine maruz kalan erkeklerde prostat kanseri riskinin azaldığı bulgulanmıştır. Sudaki bor düzeyinin artmasının prostat kanseri riskinin ve ölüm oranlarının azalmasıyla doğru orantılı olduğu literatürde ortaya konulmuştur. 2011 yılında Müezzinoğlu ve arkadaşları tarafından günlük yüksek bor maruziyeti yoluyla prostatik hücresel prosese bağlı hiperplazinin oluşumunun azalabileceği yönünde bulgular literatüre eklenmiştir (Müezzinoğlu ve ark. 2011). Barranco ve Eckhert'in çalışmalarında, borik asitin DU145 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir (Barranco ve Eckhert 2004). Kandaki yüksek BA miktarının intrasellüler  $Ca^{+2}$  sinyalini ve depolanmasını azaltarak prostat kanseri riskini düşürdüğü düşünülmektedir (Henderson ve ark. 2009). DU-145 prostat kanseri hücrelerinin fizyolojik BA konsantrasyonları ile tedavisinin, ER genişlemesi, sitoplazmik stres granüllerinin oluşumu ve eIF2 $\alpha$ , GRP78/BiP ve ATF4'ün hafif aktivasyonu ile ER stresine neden olduğu rapor edilmiştir (Henderson ve ark. 2014).

Son olarak borik asit ve boraksın sıçanlarda sisplatin toksisitine olan etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, artan ER stresi nedeniyle apoptotik etkiler görülebileceği bildirilmiştir (Hazman ve ark. 2018).

Bu bağlamda araştırmada androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı LNCaP kullanılarak yeni sentez bor bileşiği M7'nin ER stresi- UPR- ERAD sinyal yolağına olan etkileri sorgulanmaya ve moleküler hedefleri belirlenmeye çalışıldı. Aynı zamanda bu tez çalışması kapsamında M7'nin androjen sinyaline olan etkisi de AR ve PSA gen ve proteinleri üzerinden değerlendirildi. Bu amaç doğrultusunda M7 varlığında ve yokluğunda Tunikamisın ve Tapsigargin gibi ER stresi yaratan ajanlar kullanılarak ER stresi tetiklendi ve M7'nin etkinliğinin sorgulanması için BiP, CHOP, eIF2 $\alpha$  ve PERK gibi hedef genlerin transkripsiyonel ve translasyonel regülasyonları sırasıyla QRT-PCR ve western-blot metodolojileri ile incelendi. Bununla birlikte normal ve hormon deprivasyon koşullarında hücrelere uygulamalar yapılarak (sentetik androjen R1881 gibi) sinyal yolaklarının regülasyonlarında ve alınan yanıtlarda farklılık olup olmadığı da araştırıldı.

## **2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI**

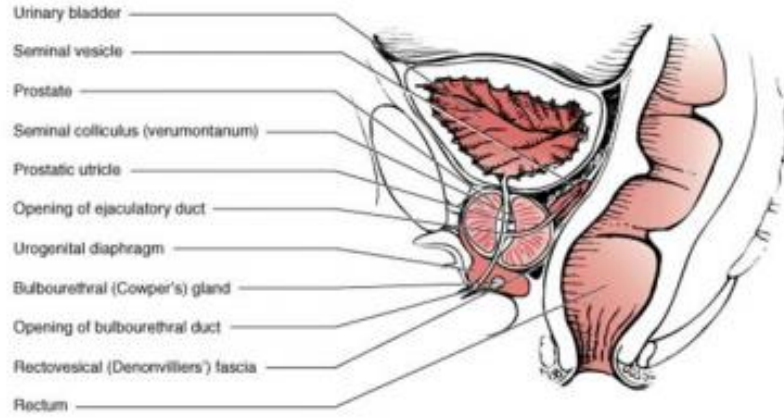
### **2.1. Prostat Kanseri**

#### **2.1.1. Prostat nedir?**

Anatomik kesişme bölgesinin merkezinde bulunan ve bir salgı bezi olan prostat, mesanenin altında yer alarak üretrayı çevrelemekte ve rektumun önünde bulunmaktadır (Basu ve Tindall 2010). Prostat bezi (prostat), şekli ve boyutu yenilebilir bir kestaneye benzeyen eşleşmemiş bir parankimal-glandüler organdır. Erkek genital sistemine aittir -menin bir bileşeni ve sıvılaşmasından sorumlu olan glikoproteini (prostata özgü antijen, PSA) üretir. Prostatın ayrıca endokrin özellikleri vardır: E, F ve A prostaglandinleri, spermidin ve spermini üretir. Ayrıca testosteronun 5- $\alpha$ -redüktaz enziminin etkisi altında dihidrotestosterona dönüştürüldüğü yerdir (Tyloch ve Wieczorek 2017). Genç yetişkin prostatı yaklaşık 20 g ağırlığındadır ve erkek yardımcı üreme organlarının en büyüğüdür. Mesanenin arkasında bulunan, prostatik üretra ve ejakülatör kanalları tamamen içine alan bir yapıdır (White ve ark. 2013)

Prostat, sadece memelilerde bulunan ve seminal sıvının bileşenlerini üretme işlevi gören erkek yardımcı bir ekzokrin bezidir. Prostatın indüksiyonu ve gelişimi ile yetişkin bezinin homeostazı, testisten türetilen erkek hormonları olan androjenler tarafından kontrol edilir (Francis ve Swain 2018).

Prostat bezi gelişiminin, 8-12. haftalarda insan koryonik gonadotropinin uyarımı sonucu salgılanan testosteron tarafından sağlandığı bilinmektedir. Prostat epiteli üretral tomurcuğun endodermal epitelinden köken alırken çevre mezenşim prostat stroma ve kas kısmını oluşturmaktadır. Doğum anında prostat bezi küçüktür ve puberteye kadar bir dinlenme aşamasındadır. Puberterle birlikte büyümeye başlamaktadır (Toivanen 2017).



**Şekil 2.1.** Normal prostat anatomisi (Kufe ve ark. 2003)

Prostat bezi idrar kesesinin alt kısmında bulunur ve üretrayı çevreler. Üst sınırları, mesane ve seminal vezikülleri içerir ve ürogenital diyafram, alt sınırını çizer. Bez, önde pelvisin iki pubis kemiği arasındaki eklem ve arkadan rektumla sınırlanmıştır (Şekil 2.1.). Prostat kolayca rektal muayene ile dokunarak muayene edilebilir (Palmeri ve ark. 2016).

Prostat bezi içinde gelişen hastalıklar üç gruba ayrılabilir:

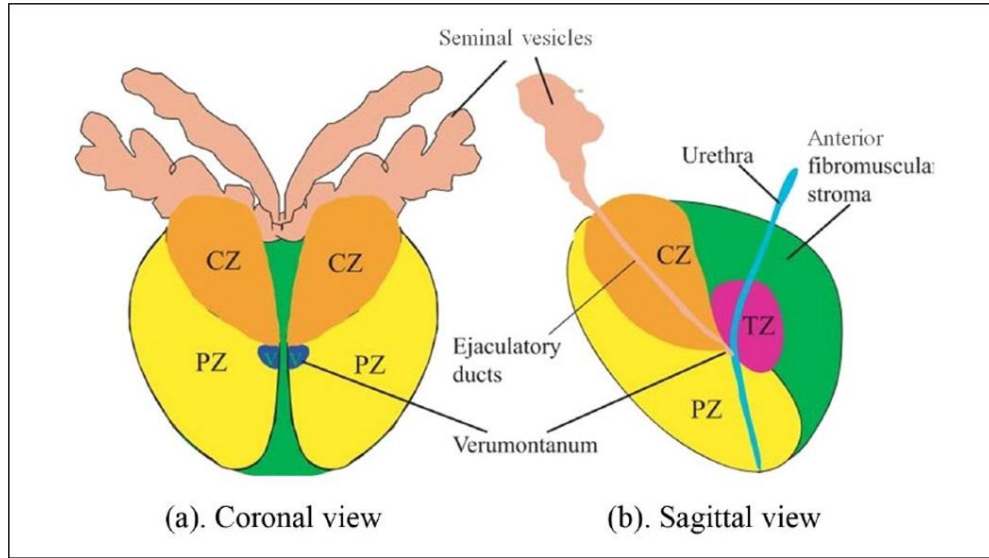
- İyi huylu prostat hiperplazisi (BPH),
- Prostatit ve
- Prostat kanseri (PCa) (Tyloch ve Wieczorek 2017).

Kanser, dünya çapında ölümün ana nedenlerinden biri haline gelmesi nedeniyle günümüzde ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Tümör mikroçevresi oksidatif strese etkilediğinden dolayı prostat kanseri için kötü klinik prognoz, kanser hücrelerinin metabolizmasına bağlıdır. Bu olay yeterli hücresel yanıtı tetikler ve böylece kanser ilerlemesi için uygun koşulları yaratır (Siwecka ve ark. 2019). PCa, cilt kanserinden sonra en sık teşhis edilen kanser ve batı dünyasındaki erkekler arasında kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedeni olarak dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur. Yedi erkekten yaklaşık birine yaşamları boyunca PCa teşhisi konacağı tahmin edilmektedir (Storm ve ark. 2016). Amerika Birleşik Devletleri'ndeki erkekler arasında ise, prostat kanseri en yaygın kutanöz olmayan malignitedir. Ortalama tanı yaşı 67 iken, her 8 erkekten yaklaşık

1'i yaşamları boyunca PCa geliştirmektedir. PCa aynı zamanda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir ve 41 erkekten 1'i hastalıktan ölmektedir (Palmeri ve ark. 2016).

### 2.1.2. Prostat bezinin zonal anatomisi

Prostatın bilinen en eski anatomik sınıflandırması Lowsley tarafından 1912 yılında gerçekleştirilmiştir. Lowsley tarafından, posterior, iki lateral, bir ön ve bir orta lob olarak toplam 5 lob tanımlanmıştır. Daha sonraları, 1968 yılında, John E. McNeal tarafından mikroskopik olarak bez ve kanal yapılarına dayanarak bölgesel anatomi sınıflaması yapılmıştır (Şekil 2.2) ve günümüzde bu sınıflandırma kabul görmektedir (Toivanen 2017).

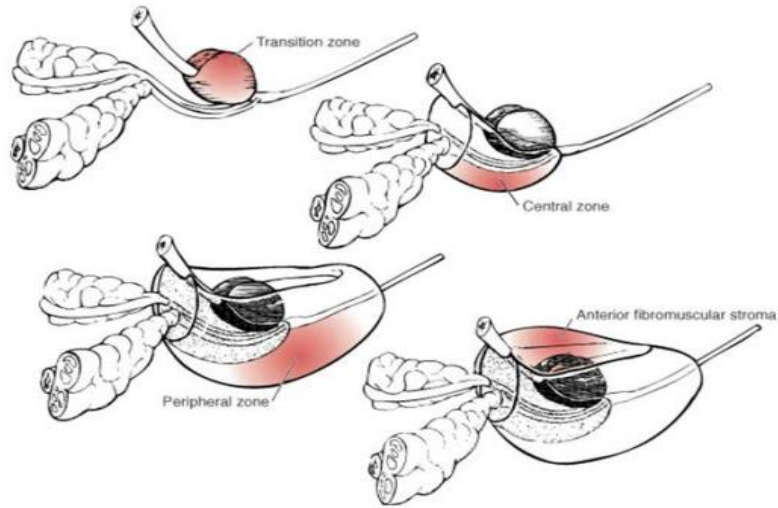


**Şekil 2.2.** McNeal'in insan prostatının bölgesel anatomisinin diyagramları (Palmeri ve ark. 2016).

Şekil 2.3'de gösterildiği gibi bir insan prostatı, glandüler olmayan bir bölgeye (anterior fibromusküler stroma) ve 3 glandüler bölgeye ayrılmaktadır; CZ (santral zon), PZ (periferik zon) ve TZ (transisyonel zon) (Palmeri ve ark. 2016).

Tüm prostat dokusunun %30'unu anterior fibromusküler stroma oluşturmakta ve prostatın anteriorunda konumlanmaktadır. Glandüler yapı bulundurmaz. Prostatın ön

yüzünü tamamen kaplamaktadır. Periferal zon ise, prostatın palpe edilebilen tek bölümü olup apeksten tabana doğru posterolateral olarak uzanmaktadır. Santral zon koni görünümündedir ve taban kısmı mesane boynunda, apeksi ise prostatik utrikul seviyesinde yer almaktadır. Bu salgı bezi yapısal ve histolojik olarak geri kalan prostat bezlerinden farklılık göstermektedir ve bu bezlerin Wolf kanallarından kaynaklandığı öne sürülmüştür. Prostat adenokarsinomlarının %1-5'i santral zondan kaynaklandığı bilinmektedir. Prostat hacmi yaşla beraber artmakta ve benign prostat hiperplazisine bağlı artmış transizyonel ve periüretral bez hacmiyle ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Genel olarak periferal zon prostat bezinin yaklaşık % 70'ini, santral zon % 25'ini, transizyonel zon %5-10'unu, periüretral zon ise <%1'lik kısmını oluşturmaktadır. Prostat adenokarsinomlarının yaklaşık % 20'si transizyonel zondan köken almaktadır. Periferal zon prostatik glandüler dokunun çoğunu oluşturmakla birlikte bezin posterior ve lateral bölümlerini sarmaktadır. Adenokarsinomlar %70 oranında periferal zonda gerçekleşmektedir. Ayrıca bu zon kronik prostatit tarafından en sık etkilenen zon olarak bilinir (Toivanen 2017).



**Şekil 2.3.** Prostatın bölgesel anatomisi: prostatın 3 glandular zonu ve anterior fibromusküler stroma (Kufe ve ark. 2003)

### **2.1.3. Prostat fizyolojisi**

Erkek yardımcı üreme bezlerinin en büyüğü prostat bezidir. Mesane boynu ve üretranın ilk parçasını sarar. Fibrinolizin, sitrik asit ve asit fosfataz sentezlemektedir. Prostat içinde sayıları 30-50'yi bulan tubüloalveolar yapıda bez bulunmakla birlikte, bunlar boşaltım kanalları aracılığıyla üretranın prostatik kısmına açılmaktadır. Prostatik kapsül fibroelastik bağ dokusu yapısında olup bol miktarda düz kas lifi içermektedir. Prostat lobları prostata kapsülden içeriye giren septumlar tarafından oluşturulur. Stromal doku glandüllerin etraflarını sarar ve bu doku, düz kas lifi içeren elastik bağ dokudan ibaret olup periferde kapsül ile devam etmektedir. Bu kasların kontraksiyonları ile ejakülasyon sırasında prostat salgısının atılımını sağladığı bilinmektedir (Toivanen 2017).

Prostat sıvısı ince ve alkalin pH'a sahip süt görünümünde bir sıvı olmakla birlikte alkali özelliği ovumun başarılı olarak döllenesini sağlamaktadır. Çünkü kadınlarda vajina salgısı asidik karakterdedir. Prostat salgısının alkali olması spermilerin kadın genital traktusunda canlı kalabilmeleri için gereklidir. Prostat sıvısının içinde su, asit fosfataz, kolesterol, sitrik asit, amilaz, tamponlayıcı tuzlar, çinko, prostaglandinler, fosfolipidler, PSA, kalsiyum sitrat, seminal plazmin, fosfat iyonları, plazminojen ve pıhtılaşma sağlayıcı enzim gibi maddeler bulunmaktadır. Dolayısıyla pıhtıyı eritici enzimler pıhtı oluşturucu enzimler ile birlikte mevcuttur. Prostat sıvısı semen sıvısının %30'unu oluşturmaktadır. Ejakülasyondan hemen sonra semenin pıhtılaşması, onun koitus sonrasında vajinanın derin kısımlarına tutunmasını sağlamaktadır. Pıhtılaşma işleminde kalsiyum iyonları görevlidir. Ejakülasyondan ortalama 15-30 dakika içinde prostat salgısında bulunan profibrinolizin, fibrinolizine dönüşür ve pıhtıyı eritir. Bu işlem likefaksiyon olarak adlandırılır (Toivanen 2017).

### **2.1.4. Prostat kanserinin etiyolojisi**

Temel olarak prostat kanseri ile ilişkili dört öncelikli epidemiyolojik bulgu saptanmıştır. Bu bulgular yaş, ırksal farklılıklar, ailesel kalıtım ve beslenmedir. Bunların dışında genetik yatkınlık, sosyal alışkanlıklar, kilo, güneş ışığı ve ağır metallerle maruz kalma gibi



çevresel etkenler, sigara tüketimi de prostat kanseri riskinin artmasına yol açmaktadır (Kufe ve ark. 2003).

Prostat kanseri genel olarak ileri yaş erkeklerin hastalığıdır ve yeni tanı konmuş hastaların %75' inden fazlası 65 yaş üzerindedir. 85 yaşında, prostat kanseri riski tüm dünyada %0,5-20 arasında değişim gösterir. Yapılan otopsi çalışmaları sonuçlarına göre; 30 yaş erkeklerin %30'u, 50 yaş erkeklerin %50'si ve 85 yaş üstündeki erkeklerin büyük çoğunluğunun histolojik (latent) prostat kanserine sahip olduğu gözlemlenmiştir. 50 yaşından küçük erkeklerde prostat kanseri teşhisi %1' in altında seyreder (Çelen ve ark. 2011).

Prostat kanseri insidansında etnik populasyonlar ve ülkeler arasında farklılık gözlenir. Asya bölgesinde, özellikle Japon ve Çinlilerde (yıllık olarak 1.9/100.000) düşük oranda seyrederken; İskandinav ve Kuzey Amerika ülkelerinde yüksek oranda saptanmaktadır (yıllık olarak 137/100.000 ). Beyazlara oranla siyah ırkta prostat kanseri görülme oranı yaklaşık bir buçuk kat artar. Hastalığın gelişmesi için en güçlü risk faktörü aile içerisinde prostat kanseri öyküsü bulunması, yani genetik yatkınlıktır (Çelen ve ark. 2011).

Androjenler prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde etkilidir. Testesteron, cerrahi kastrasyon ya da medikal tedavi ile durdurulduğunda tümör azalır. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I), tümör hücrelerinin proliferasyon, diferansiyasyon (farklılaşma) ve apoptozunu düzenlemekte görevlidir. Yüksek plazma IGF-I düzeyi ile prostat kanseri riski, doğru orantı gösterir. Böcek ilaçlarına maruz kalan çiftçilerde ve petrol endüstrisinde çalışanlarda prostat kanseri riski artış gösteririrken yüksek elektromanyetik alanlarda çalışan elektrik sağlayıcı işçiler arasında da artmış prostat kanser mortalitesi gözlemlenmiştir (Çelen ve ark. 2011).

### **2.1.5. Prostat kanserinin tanısı**

Prostat kanserinin erken teşhisi büyük ölçüde yaygın olarak kullanılan bir prostat spesifik antijen (PSA) kan testi ile belirlenir ve kesin tanı için biyopsi yapılır (Kohaar ve ark. 2019). PSA, prostat bezi tarafından salgılanan bir glikoproteindir ve kan serumundaki

PSA seviyesinin artışı prostat kanseri için karakteristiktir. Prostat kanseri şüphesi, PSA konsantrasyonunun 4 ng/mL'nin üzerine çıkmasıyla ortaya çıkmaktadır, ancak bu sınır değer hastanın yaşı ile birlikte yükselmektedir (Tyloch ve Wieczorek 2017).

Prostat kanseri, hastalığın erken evresinde asemptomatiktir, çeşitli klinik ve patolojik ilerleme özelliklerinden oluşur ve ağrısız kanser tipinin büyük bir alt kümesiyle karakterize edilir. Bu nedenle, prostat kanseri için erken teşhis, hastalığın sınıflandırması (ağrıya karşı agresif) ve tedavi yanıtının tahmini için kişiselleştirilmiş bir yaklaşım geliştirmek çok önemlidir. Ancak sürekli olarak yüksek PSA seviyelerine sahip bireyler sonunda biyopsi geçirse bile, bu kanser riski için kesin olmayan bir belirteçtir. Çünkü yüksek serum PSA seviyeleri her zaman kanser varlığına karşılık gelmez. Prostatit ve iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) gibi kanserli olmayan patolojik durumlar da serum PSA seviyesinin yükselmesini tetikleyerek gereksiz biyopsilere yol açabilir (Kohaar ve ark. 2019).

PCa teşhisi genellikle PSA testi ve dijital rektal muayene (DRE) ile taranarak başlar. Daha kesin tanı, daha sonra klinisyene uygun Gleason skorunu sağlamak için kullanılan rastgele transrektal ultrason (TRUS) kılavuzluğunda biyopsilerle yapılabilir. Bu faktörlerin kombinasyonu ve evreleme, uygun tedavi ve prognozu belirler (Palmeri ve ark. 2016).

Prostat bezi kanseri, ABD'de erkekler arasında en sık görülen neoplazmdır. Polonya'da, akciğer kanserinden (% 20) sonra ve kolon kanserinden (% 12) önce görülme sıklığı (% 13) açısından ikinci sırada yer almaktadır. Son yıllarda prostat kanserinin morbidite ve saptanabilirliğinde artış görülebilmektedir. 75 yaşın üzerinde prostat kanseri dışındaki nedenlerle ölen erkek grubunda, otopsi materyallerinde prostat kanseri oranı % 50 ile % 75 arasında değişmektedir. Artan tespit edilebilirlik, kan serumundaki PSA seviyesini belirleyen testlerin yayılması ve özellikle TRUS olmak üzere ultrason muayenelerinin gerçekleştirilmesi ile ilişkilidir (Tyloch ve Wieczorek 2017).

Yaşa bağlı normal PSA değerleri:

- 40-49 yaş: PSA  $\leq$  2.5 ng/mL

- 50-59 yaş: PSA  $\leq$ 3.5 ng/mL
- 60-69 yaş: PSA  $\leq$ 4.5 ng/mL
- 70 ve üstü: PSA  $\leq$ 5.5 ng/mL

### 2.1.6. Belirtiler

Prostat kanseri çoğunlukla hastalığın erken evrelerinde herhangi bir belirti vermez. Bu dönem hastalarında genellikle görülebilecek şikayetler:

- Özellikle geceleri olan sık sık idrar yapma ihtiyacı
- İdrar yapmaya başlamada gecikme ve bitiminde idrarın damla damla akmayı sürdürmesi
- İdrar yapamama
- İnce, zayıf ya da kesik kesik idrar yapma
- İdrar yapmada yanma ya da ağrı hissedilmesi
- Cinsel ilişki esnasında ağrılı ejakülasyon (boşalma)
- İdrar ya da menide kan görülmesi

Geç dönem prostat kanseri hastalarında ise kalça, sırt ya da bacak ağrıları ön plandadır. Yukarıdaki şikayetlerden herhangi biri kanser ya da ciddi olmayan başka sağlık probleminin de belirtisi olabilmektedir. Yani bunlardan birinin bulunması bireyin kesinlikle prostat kanseri olduğu anlamı taşımaz. Bu şikayetlerden bir veya daha fazlasını yaşayan kişilerin, şikayetin sebebini öğrenmek amacıyla mutlaka bir üroloğa muayene olması tavsiye edilmektedir (Üroonkoloji Derneği 2016).

### 2.1.7. Evreleme

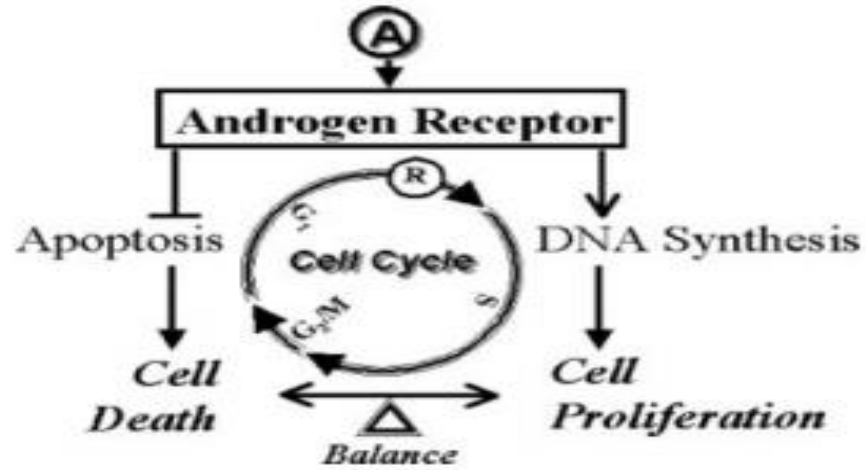
Prostat kanserinde uygulanacak tedaviye, hastalığın vücuttaki yayılımı doğrultusunda karar verilir. Bu sebeple prostatta kanser saptanırsa doktorun hastalığın evresini yani yaygınlığını öğrenmesi gerekecektir. Evreleme yapılırken kanserin sadece prostat bezinde sınırlı olup olmadığı; prostat dışı yayılım saptandığında nerelerde olduğu araştırılmalıdır. Bu amaç doğrultusunda her hastada gerekmemekle birlikte bilgisayarlı

tomografi, akciğer grafisi, manyetik rezonans görüntüleme ve kemik sintigrafisi gibi görüntüleme tekniklerinden yardım alınabilir (Üroonkoloji Derneği 2016).

- 1. Evre: Prostatta konumlanan tümör, muayene sırasında el ile hissedilmeyecek kadar küçüktür ve genellikle prostatın iç bölgelerinde konumlanmış olabilir. Dolayısıyla rektal muayene ile tanı konulamaz. Bu durumda PSA yüksekliği sebebiyle yapılan biyopside veya idrar yolu tıkanıklığını açmak amacıyla yapılan TURP operasyonu ile tespit edilebilir.
- 2. Evre: Bu evrede tümör boyutu parmakla hissedilebilecek büyüklüğe ulaşmıştır. Ama henüz prostat dışına yayılmamıştır.
- 3. Evre: Tümör prostat kapsülünün dışına taşmış veya meni keselerine yayılım göstermiştir.
- 4. Evre: Bu evre metastatik evredir. Tümörün çevre dokulara ya da kemik, karaciğer ve akciğer gibi uzak organlara metastazı gerçekleşmiştir (Üroonkoloji Derneği 2016).

### **2.1.8. Androjen-bağımlı prostat kanseri**

Androjen sinyali prostat bezinin normal gelişimi, çoğalması ve farklılaşmasında kritik rol oynamaktadır ve ligand-bağımlı bir transkripsiyon faktörü olan androjen reseptörü aracılığı ile gerçekleşmektedir (Alimirah ve ark. 2006, Simmons 2006). Prostatik büyüme ve farklılaşma için androjen sinyali her açıdan esansiyeldir, çünkü prostat androjenler yokluğunda oluşmamaktadır (Abate-Shen ve ark. 2008). Androjenler peptit büyüme faktörleri ile birlikte prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu aktive etmektedir. AR inaktivasyonu ise prostat kanseri hücrelerinde DNA replikasyonunu ve S fazına geçişi engellemekte ve hücre ölümünü tetiklemektedir. Dolayısıyla Şekil 2.4.'te görüldüğü gibi azalan AR aktivitesi yaşamsal mekanizmaları zayıflatırken artan AR aktivitesi proliferasyona yol açmaktadır (Reddy ve ark. 2006).



**Şekil 2.4.** Prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve yaşayabilirliğinin regülasyonunda AR'nin hücre döngüsü bağımlı aktivitesi (Reddy ve ark. 2006).

Bugün androjenler büyük ölçüde flutamid ve bikalutamid gibi farmasötik ajanlar ile inhibe edilmesine rağmen androjen-yokluğu (androjen ablasyonu) prostat kanseri ile mücadelede en etkili terapötik araç olarak kalmıştır (Simmons 2006). Androjen ablasyon terapisine yanıt olarak başlangıçta bir gerileme gözlenebilir de hastalık genellikle zaman içerisinde geleneksel tedaviye yanıt vermeyen ve yüksek derecede agresif androjen-bağımsız (hormon-refraktuar veya kastrasyon dirençli) metastatik prostat kanserine geçiş göstermektedir (Reddy ve ark. 2006, Simmons 2006).

### 2.1.9. Androjen-bağımsız prostat kanseri

Prostat kanserinin ikinci evresi olarak tanımlanan androjen-bağımsız prostat kanserinin gelişimi için AR aktivitesinin regülasyonunun bozulması ile ilişkili olarak birçok model geliştirilmiştir (Bennett ve ark. 2010, Nelson ve ark. 2003). Bu modeller AR gen amplifikasyonunu, AR ekspresyon seviyesinin değişimini, ko-regülatörlerin mutasyonlarını, büyüme faktörü sinyalinin değişimi sonucu AR'nin kinaz aktivasyonunu, AR somatik mutasyonlarını ve AR'yi aktive eden anti-apoptotik Bcl-2 ve diğer onkogenlerin aşırı ekspresyonlarını içermektedir (Basu ve Tindall 2010, Bennett ve ark. 2010). Sonuç olarak her bir mekanizma prostat kanseri hücrelerinin androjenlere cevap verme yeteneğini bağımsızlık veya aşırı duyarlılık şeklinde değiştirmektedir (Schulz ve

ark. 2003). Bütün bu mekanizmaların AR sinyal yolağının aktivasyonunu değiştirmesi nedeniyle androjen ablasyon terapisinde başarı elde edilememektedir (Nelson ve ark. 2003).

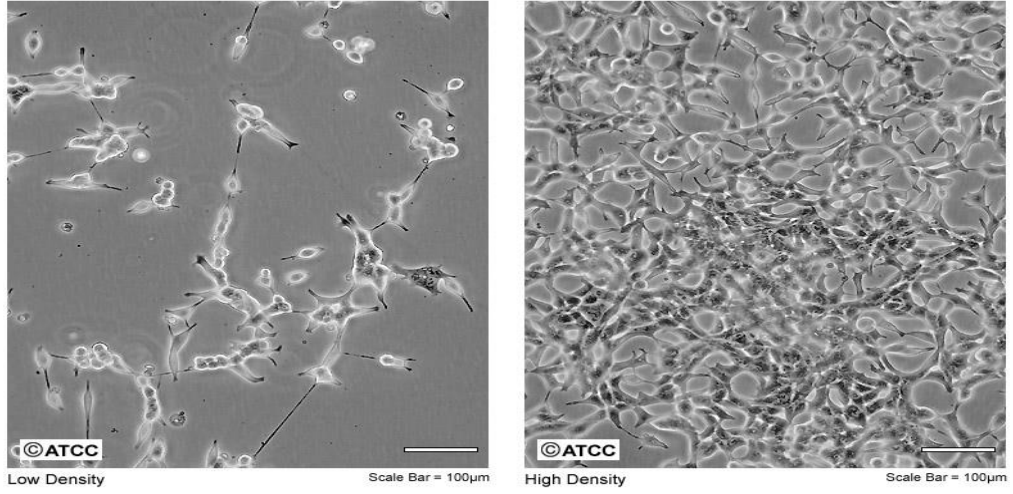
#### **2.1.10. Prostat kanseri hücre hatları**

Hücre hatları, sıklıkla laboratuvar çalışmalarında ve in vitro kanser araştırmalarında model olarak kullanılır. Hücre hattı kullanımının birçok avantajı mevcuttur. Sınırlı koşullarda bile sınırsız üreyebilme yeteneğine sahiptirler ve muamele edilmeleri kolaydır. Bunlara ek olarak, yüksek derecede homojenite gösterip donmuş stoklardan kolaylıkla kullanılır hale getirilebilirler. Bütün bu avantajlarına karşın dezavantajları da bulunmaktadır. Hücre hatları genellikle kültürde fenotipik ve genotipik sapmalara eğilim gösterirler. Ayrıca, alt kültürler oluşabilir ve zamanla popülasyonda bulunan daha hızlı büyüyen ve özellikli klonların seçimiyle fenotipik değişikliklere neden olabilirler (Horoszewicz 1983).

- **LNCaP**

LNCaP hücreleri, onkoloji alanında yaygın olarak kullanılan insan hücrelerinin bir hücre dizisidir. 1977'de JS Horoszewicz ve arkadaşları tarafından, metastatik prostat kanseri tanısı konmuş 50 yaşındaki bir Kafkas erkekte (kan türü B +) sol supraklaviküler lenf düğümünün iğne aspirasyon biyopsisinden izole edilmiştir (Şekil 2.5.). Yapışık, tek hücreler ve gevşek bağlı kümeler şeklinde bulunabilen epitelyal LNCaP hücreleri hormon-duyarlı insan prostat adenokarsinom hücreleridir. (ATCC 2021).

ATCC Number: **CRL-1740**  
Designation: **LNCaP clone FGC**



**Şekil 2.5.** LNCaP Hücre Hatlarının Mikroskopik Görüntüsü (ATCC 2021).

### 2.1.11. Prostat kanseri tedavisi

Hormon-bağımlı olarak gelişim gösteren prostat kanserinin çeşitli evreleri için farklı tedavi seçenekleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Erkek hormonları (androjenler) prostatın büyümesini sağlar. Bugün androjenler büyük ölçüde flutamid gibi farmasötik ajanlar ile inhibe edilmesine rağmen androjen yokluğu prostat kanseri ile mücadelede en etkili terapötik yaklaşım olarak kullanılmaktadır. Başlangıçta androjen yokluk terapisi tümör hücre proliferasyonunun azalmasına ve tümör boyutunun küçülmesine neden olmakta (Huggins 1967), daha sonra 2-3 yıl içerisinde yüksek derecede agresif ve androjen-bağımsız metastatik prostat kanserinin yeniden oluşmasına yol açmaktadır. Bu aşamadan sonra herhangi bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Simmons 2006).

Günümüz klinik başarıları genel sağkalım süresini uzatabilmesine rağmen, prostat kanseri nedeniyle her yıl ortalama 30.000 erkeğin hayatını kaybettiği bilinmektedir. Metastatik olgularda, androjen reseptör sinyal yolları önemlidir ve androjen deprivasyon (baskılama) tedavisi (ADT) standart tedavi sayılır. Ancak AR'lerinin genetik aberasyonları sonucunda tedavide başarılı olmak oldukça güç hale gelmektedir. Çünkü, genellikle 12-36 ay içinde prostat kanseri hastaları androjen ablasyonuna direnç

geliştirirler ve kastre düzeydeki testosterona rağmen androjen bağımlı/bağımsız sinyaller, kanser hücrelerinin proliferasyonuna neden olur (Konaç and Sözen 2014).

Anti-androjen tedavisi olan veya olmayan bireylerde radyasyon tedavisi ve cerrahi, prostat kansinomu için anahtar tedavilerdir. Tümörün evresine ve uygulanan ışınlanmanın türüne bağlı olarak, prostat kanseri hastalarının % 90 kadarı radyoterapi ile kalıcı olarak tedavi edilebilir. Bununla birlikte, normal doku toksisitesi, bir tümörün iyileştirici radyasyon dozunun verilmesini sınırlayabilir ve bu nedenle, etkili eksternal ışın radyoterapisinin önündeki en büyük engellerden birisidir. Radyoterapi sonrası prostat kanserinin lokal nüksü, kanser hücrelerinin radyorezistansına bağlanabilir. Prostat kanserinin radyorezistansına katkıda bulunan moleküler mekanizmalar ve hücrel özellikler arasında, PI3K/Akt ve mTOR gibi sinyal yollarının aktivasyonları, DNA onarım yollarındaki değişiklikler, otofaji, epitelyal-mezenkimal geçiş ve kanser kök hücrelerinin potansiyel varlığı yer almaktadır. Prostat kanserinde rol oynayan diğer bir önemli faktör tümör mikroçevresidir. Tümör ilerlemesi ve tedavi yanıtı, radyasyon tedavisinin bir sonucu olarak tümör mikro ortamındaki değişikliklerden etkilenebilir. Yeni tedavi seçenekleri için olanaklar sunan radyasyon terapileri tarafından tetiklenen immünomodülatör değişiklikler bununla yakından ilişkilidir. Radyoterapi sonrası kanser hücrelerinin metabolizmasındaki değişiklikler de hücrelerin radyosensitivitesini değiştirebilir. Yine de, radyorezistansın ortaya çıkması, prostat kanserinin lokal olarak yenilenmesini ve metastazını destekleyen, birçok hasta için daha az etkili tedavilere yol açacak şekilde oldukça tahmin edilemezdir. Radyasyon tedavilerinin etkinliğini daha da artırmak için yardımcı tedavilere acilen ihtiyaç duyulmaktadır (Seifert ve ark. 2009).

#### **2.1.12. Tedavide kullanılan ilaçlar**

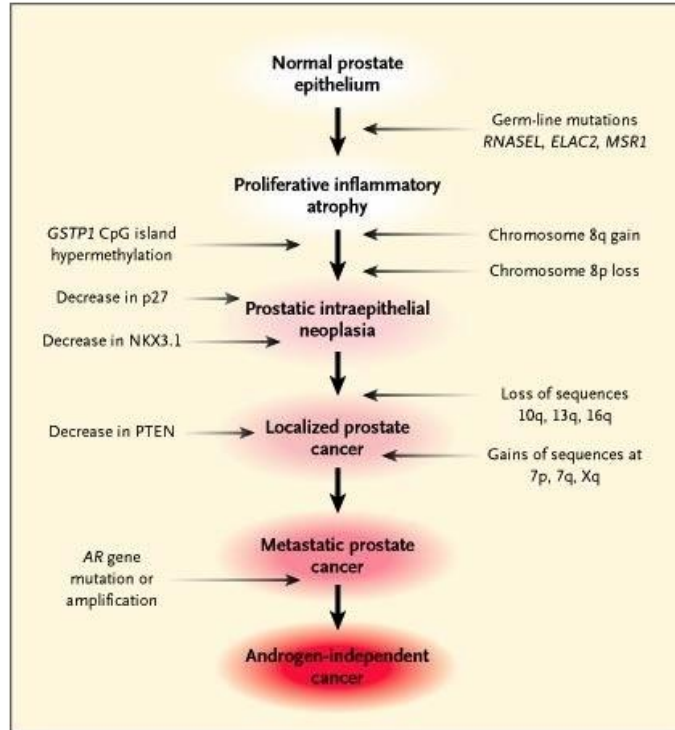
- LHRH (Luteinleştirici hormon salgılatıcı hormon agonistleri): Testislerden testosteron yapımı engellenir (Leuprolid ve Goserelin gibi).
- Antiandrojenler: Erkeklik hormonlarının etkileri baskılanır (Flutamid, Bikalutamid, Nilutamid gibi).



- Diğer İlaçlar: Böbrek üstü bezinden androjen üretimi engellenir (Ketokanazol ve Aminoglutetimid gibi) (Üroonkoloji Derneği 2016).

### 2.1.13. Prostat kanseri ile ilişkili moleküler değişiklikler

Prostat kanseri gelişiminin moleküler belirteçlerinin daha iyi anlaşılması, bu hastalığın tümörleşme potansiyelinin açıklanabilmesi için gereklidir (Kufe ve ark. 2003). Aslında prostat patogenezinin sorumlu olan tek bir tümör baskılayıcı geni yoktur ve rapor edilen genetik değişimlerin sıklığı oldukça değişkendir. Bu durum olasılıkla prostat kanserinin heterojenik ve çok odaklı özelliğini temsil etmektedir (Hallstrom 2007). Androjen reseptörü, PTEN ve RNaseL mutasyonları, TMPRSS2 ve ETS transkripsiyon faktörleri arasındaki kromozomal translokasyonlar ileri faz prostat kanserinde tanımlanmıştır. Bununla birlikte tümörün başlangıcı ve erken intraepitel neoplastik büyümeden sorumlu özgül genler ve moleküler yollar hakkında sınırlı bilgiler mevcuttur (Abdulkadir ve ark. 2002, Song ve ark. 2009).



Şekil 2.6. Prostat kanserinin moleküler patogenezi (Nelson ve ark. 2003).

- **HPC1/RNASEL**

İlk rapor edilen prostat kanseri duyarlılık lokusu HPC1 kromozom 1q24-25 üzerinde yer almaktadır. HPC1 lokusu hücre proliferasyonunu ve apoptozu regüle eden bir enzimi kodlayan RNaseL genini içermektedir. RNaseL mutasyonları prostat kanseri için artan risk ve erken başlangıç (65 yaşından önce) ile ilişkilidir ve HPC1 kaybı daha agresif prostat kanserine yatkınlığa yol açmaktadır. Tek nükleotid polimorfizmi RNaseL enzimatik aktivitesini doğasal tip enzime göre üç kat azaltmaktadır (Shand ve Gelmann 2006, Simmons 2006).

- **HPC2/ELAC2**

İlk klonlanan prostat kanseri duyarlılık geni ELAC2, HPC2 lokusundan izole edilmiştir. ELAC2 kromozom 17p12 üzerinde lokalize olmuştur ve DNA onarımı ile ilgili bir proteini kodlamaktadır. İki yanlış anlamlı varyantı, Ser217Leu ve Ala541Thr, ELAC2 aktivitesini değiştirmemektedir ancak artan prostat kanseri riski ile ilişkilidir (Simmons 2006).

- **RB1**

Prostat kanserinde ikinci sıklıkta kaybedilen bölge (%50) 13q'dur. 13q14 kaybı için en güçlü tümör baskılayıcı aday retinoblastoma, RB1, genidir ve RB1 mutasyonları lokalize ve invazif prostat kanserlerinde bulunmaktadır. Retinoblastoma gen ürünü, pRB, S-fazına geçişi engelleyerek hücre döngüsünü regüle etmektedir. Ayrıca pRB'nın prostat hücrelerinde özellikle androjen yokluğuna yanıt olarak apoptozu regüle ettiği de düşünülmektedir (Abate-Shen ve Shen 2000, Simmons 2006).

- **PTEN/MMAC1**

İleri evre prostat kanserlerinin çoğunluğunda kaybedilen 10q23 kromozomal bölgesinde haritalanan PTEN tümör baskılayıcı geni potansiyel regülatör genlerden birisidir (Abate-Shen ve ark. 2003, Kim ve ark. 2002). PTEN, hedefi fosfotidilinozitol 3,4,5-trifosfat

(PIP3) olan bir lipid fosfatazı kodlamaktadır (Abate-Shen ve ark. 2003, Shand ve Gelmann 2006). PTEN kaybı mutasyonla veya metilasyon yoluyla gen susturulması nedeniyle gerçekleşmektedir (Hallstrom 2007). PTEN fonksiyon kaybı PIP3 birikimi ile sonuçlanmakta ve AKT gibi efektör moleküllerin aktivasyonuna yol açmaktadır. AKT ise anahtar sinyal moleküllerini fosforilleyerek hücre yaşamını, mitozu ve anjiogenezi uyarmakta ve apoptozu inhibe etmektedir. Dolayısıyla PTEN ekspresyonunun yokluğu anormal hücre çoğalması ile sonuçlanmaktadır (Lei ve ark. 2006, Simmons 2006).

- **CDKN1B (p27/kip1)**

12p12-13 kromozomundaki kayıplar genellikle ileri prostat kanserlerinde gerçekleşmektedir. CDKN1B, pRb fosforilasyonunu engelleyerek hücre döngüsünün ilerlemesini durduran bir siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü 15p27'yi kodlamaktadır (Shand ve Gelmann 2006, Simmons 2006). p27 inaktivasyonu, ekspresyonunun kaybı veya normal olmayan bir fosforilasyon ya da ubiquitinasyon nedeniyle hücre lokalizasyonunun değişmesi sonucu gerçekleşmektedir (Abate-Shen ve Shen 2000, Simmons 2006). Ek olarak PTEN, PI3K-AKT yolağını inhibe ederek p27 protein seviyesini artırmaktadır. Dolayısıyla PTEN fonksiyonunun kaybı düşük p27 seviyeleri ile sonuçlanmakta ve dolayısıyla prostat kanserinde azalan veya yok olan p27 ekspresyonu tümör derecesi ile ilişkilendirilmektedir (Nelson ve ark. 2002, Shand ve Gelmann 2006).

- **p53**

p53 lokusunu içeren kromozom 17p13'de allelik kayıp %50 oranında ileri prostat kanserinde ve metastazda gerçekleşmektedir (Jiang ve ark. 2006, Simmons 2006). p53, G1/G2 ve G2/M geçişlerinin anahtar düzenleyicisini kodlamakta ve DNA onarım genlerinin uyarılmasında önemli bir rol oynamaktadır. p53 ya büyümenin durdurulmasını ve DNA onarımını uyarmakta ya da stresin uzunluğuna bağlı olarak apoptozun başlamasına yol açmaktadır. Sonuç olarak p53 inaktivasyonu DNA onarım mekanizmasındaki azalmayla sonuçlanmaktadır (Abate-Shen ve Shen 2000, Hallstrom 2007, Simmons 2006).

- **C-MYC**

Hormon-duyarsız ve metastatik prostat kanserinde en yaygın görülen (%90) kromozomal değişikliklerden biri de 8q kromozomunun kazanılmasıdır (Schulz ve ark. 2003, Simmons 2006). C-MYC birçok insan kanserinde aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre döngüsünün ilerlemesi ile DNA replikasyonunu tetiklemektedir. En çok kullanılan iki prostat tümör hücre hattı LNCaP ve PC-3 önemli derecede C-MYC amplifikasyonuna ve artmış ekspresyonuna sahiptir (Simmons 2006).

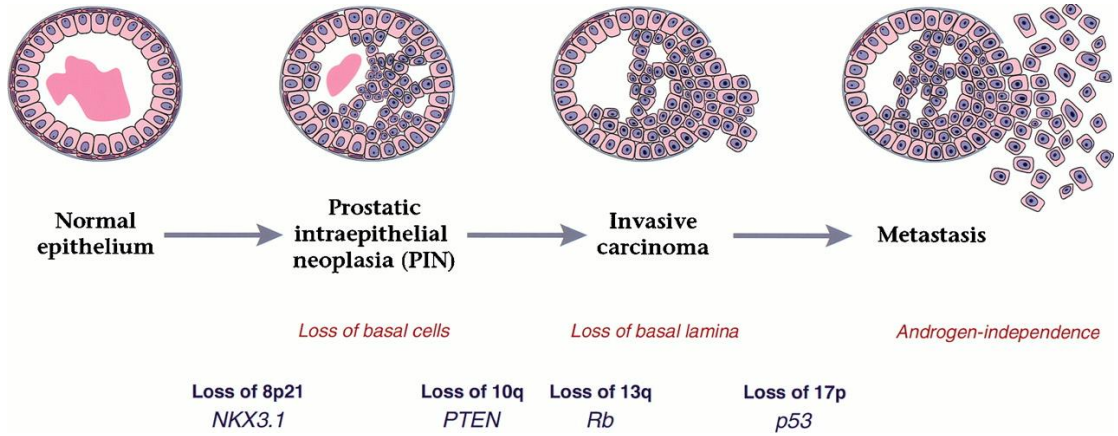
- **GSTP1**

Prostat kanserinde en fazla değişen genlerden biri glutatyon S-transferaz sınıf pi (GSTP1)'dir. Glutatyon S-transferaz, glutatyonun reaktif oksijen türleri (ROS) ile birleşmesini katalizleyerek hücreleri DNA hasarı ajanlarından korumaktadır. Metilasyon yoluyla GSTP1 promotörünün susturulması yaklaşık %95 oranında prostat kanserinde ve %70 oranında PIN lezyonunda belirlenmiştir ki bu durum GSTP1 susturulmasının prostat tümörleşmesinde erken bir olay olduğunu göstermektedir (Hallstrom 2007, Simmons 2006). GSTP1 fonksiyonunun kaybı prostat hücrelerini karsinojenlere karşı savunmasız bırakarak lüminal hücrelerin neoplastik transformasyonuna ve tümörleşmeye yol açmaktadır (Hallstrom 2007, Nelson ve ark. 2002, Simmons 2006). Prostat hücrelerinde GSTP1 bir onkogen veya bir tümör baskılayıcı gen olarak değil, prostat hücrelerini genomik hasara karşı koruyan koruyucu (caretaker) gen olarak rol oynamaktadır (Nelson ve ark. 2003, Nelson ve ark. 2002).

- **NKX3.1**

NKX3.1 prostatta eksprese edildiği bilinen az sayıdaki regülatör proteinlerden birini temsil etmektedir (Bhatia-Gaur ve ark. 1999). PIN lezyonlarının ve prostat tümörlerinin büyük bir çoğunluğu ile ilişkili olan heterozigotluğun kaybedilmesi genellikle NKX3.1 geninin lokalize olduğu 8p21 kromozomunda gerçekleşmektedir. PIN lezyonlarının %50'sinde ve metastatik tümörlerin %80'inde NKX3.1 ekspresyonu azalmakta veya yok olmaktadır. (Song ve ark. 2009). NKX3.1'in tek bir allelinin kaybedilmesi epitel

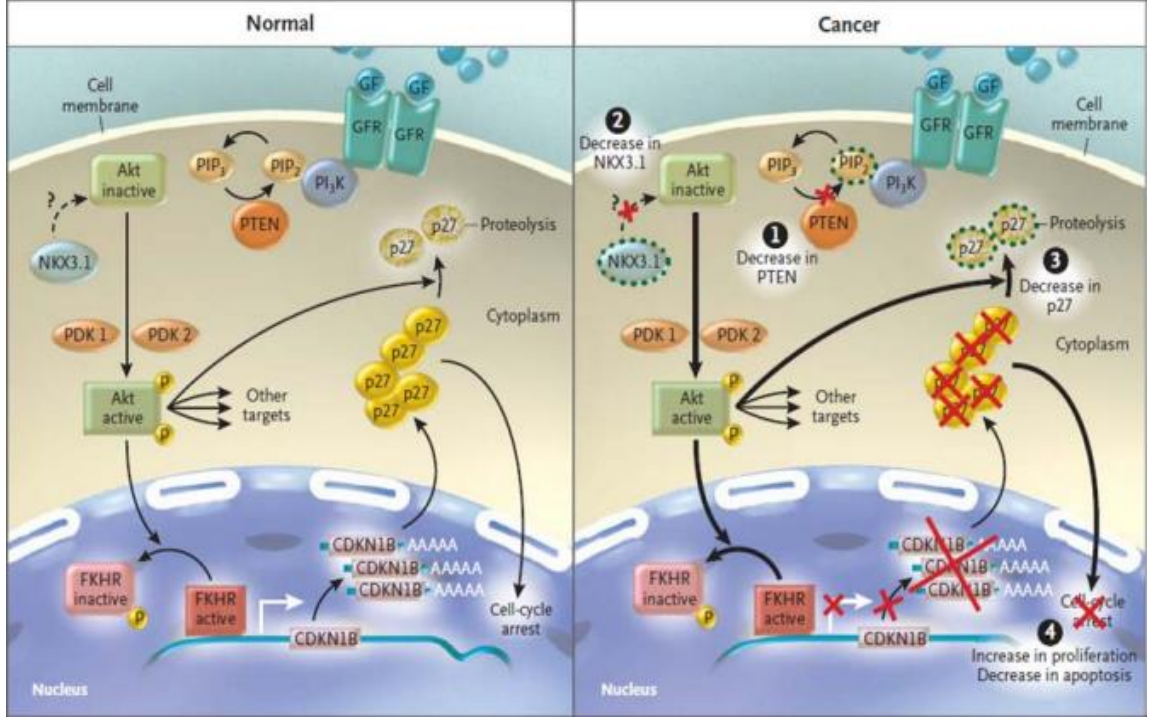
hiperplazi oluşumu için yeterli olmaktadır (Abdulkadir ve ark. 2002). İnsan prostat kanseri dokularında mutasyon analizleri sonucunda NKX3.1'in kalan allelinde herhangi bir somatik mutasyon olgusuna rastlanılmamış, ancak prostat kanserinde tümör gelişimi ile birlikte NKX3.1 ekspresyonunun tamamen kaybı gözlenmiştir (Bethel ve ark. 2006, Bowen ve ark. 2000, Shand ve Gelmann 2006, Voeller ve ark. 1997, Xu ve ark. 2000). Ek olarak prostat kanseri hücrelerinde metilasyonun ve histon deasetilasyonunun inhibisyonu sonucu NKX3.1 ekspresyonunun aktive olmadığı ve CpG adacıklarının metilasyonunun yüksek oranda gözlenmediği bulgulanmıştır (Asatiani ve ark. 2005). Bununla birlikte NKX3.1'in homeodomain yapısını ve DNA-bağlanma aktivitesini değiştiren eşey hücresi (germ line) mutasyonunun (homeodomain içerisindeki T164A mutasyonu) kalıtsal prostat kanseri yatkınlığına yol açtığı ve dolayısıyla NKX3.1'in prostat dokusunda tümörleşmeye neden olan diğer genetik değişiklikleri engelleyen bir görevli (gatekeeper) gen olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Song ve ark. 2009, Zheng ve ark. 2006). Sonuç olarak prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi, sözü geçen spesifik kromozom bölgelerinin ve aday tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile ilişkili olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2.7.) (Abate-Shen ve Shen 2000).



**Şekil 2.7.** İnsan prostat kanseri ilerlemesi. İlerleme aşamaları spesifik kromozom bölgelerinin ve aday tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile ilişkilidir (Abate-Shen ve Shen 2000).

Prostat kanseri hücre fenotipinin kritik belirleyici faktörleri olan karsinojen savunması (GSTP1), büyüme faktörü sinyal yolları (NKX3.1, PTEN ve p27) ve androjenler (AR) prostat kanseri gelişiminde anahtar moleküler değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Normal prostatta NKX3.1, PTEN ve p27 prostat hücrelerinin büyümesini ve yaşamasını

regüle etmektedir. PTEN'in ve NKX3.1'in yetersiz miktarları çeşitli mekanizmalar aracılığıyla p27 seviyesinin azalmasına dolayısıyla proliferasyonun artması ve apoptozun azalmasına yol açmaktadır (Şekil 2.7). Tüm bu moleküler değişiklikler prostat kanserinin tanı ve tedavisi için özgül hedefleri tanımlamaktadır (Nelson ve ark. 2003).



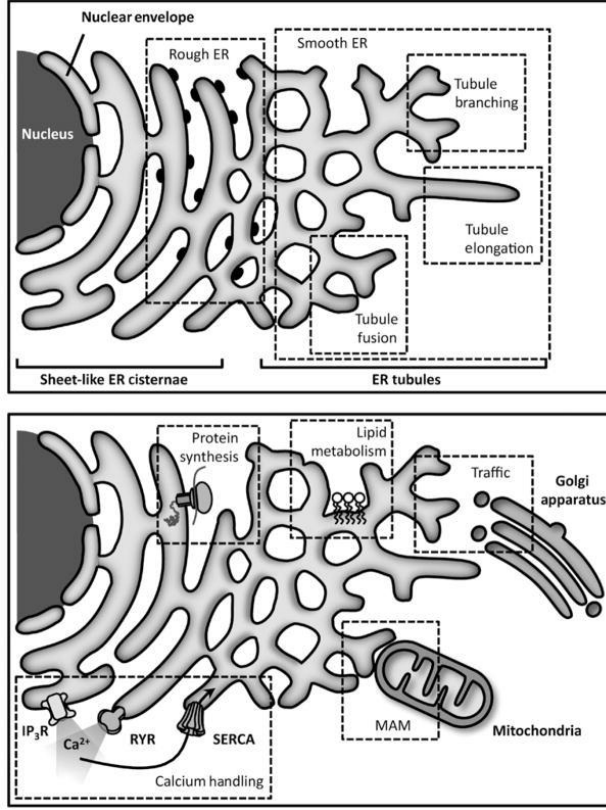
**Şekil 2.8.** Prostat kanseri patogenezindeki moleküler değişiklikler. Kırmızı X işaretleri bloke edilen prosesleri ve üretilmeyen molekülleri, noktalı ana hatlar seviyesi azalan molekülleri, A harfi mRNA'nın poliA kuyruğunu temsil etmektedir. NKX3.1-AKT etkileşimi henüz kanıtlanmadığı için soru işareti ve noktalı ok ile gösterilmiştir (Nelson ve ark. 2003).

## 2.2. ER Stresi

### 2.2.1. Endoplazmik Retikulum nedir?

Endoplazmik retikulum (ER), hücrel homeostaz, gelişme ve stres tepkisi için gerekli çok sayıda işlevi olan dinamik bir hücre içi organeldir (Bravo ve ark. 2013). Hücrenin en büyük organeli olan endoplazmik retikulum; protein sentezi ve transportu, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolanması

gibi çok çeşitli roller üstlenmiştir (Schwarz ve Blower 2016). Sekretör yolağa giriş için portal görevi üstlenen ER’de hücrenin toplam protein sentezinin %30’luk bölümü gerçekleşmektedir (Bastiaansen ve ark. 2015).



**Şekil 2.9.** ER yapısı ve genel fonksiyonlar (Bravo ve ark. 2013).

ER, sıklıkla hücrenel ekso-endositik yolla ilişkili olmasına rağmen hem yapısı hem de işlevi açısından karmaşık bir organeldir (Şekil 2.9.) (Bravo ve ark. 2013). 1945 yılında Keith R. Porter, Albert Claude ve Ernest F. Fullam tarafından elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, hücre sitoplazmasının dantel şeklinde bir ağ manzarası görünümünde olduğu bulgulanmıştır. Bu ağ yapı hücrenin ektositoplazmasında görülmediğinden bu araştırmacılar buna endoplazmik retikulum (plazma içi ağı) ismini vermişlerdir. Yapılan daha derin çalışmalarda ER’nin sitoplazmada bulunan bir koful sistemi olduğu ve bu sistemin bir zarla çevrili olduğu sonucuna varılmıştır. ER, sekretuar, lüminal ve membran proteinlerinin katlanması, translasyon sonrası modifikasyonları ve taşınmasından sorumlu olan temel bir organeldir ve bu nedenle, hücrenel homeostazın

korunmasında önemli bir rol oynar. Yeni sentezlenen ve salgılanan zar proteinleri, modifikasyon için endoplazmik retikuluma aktarılır (Liu ve ark. 2016).

### **2.2.2. ER stresi nedir?**

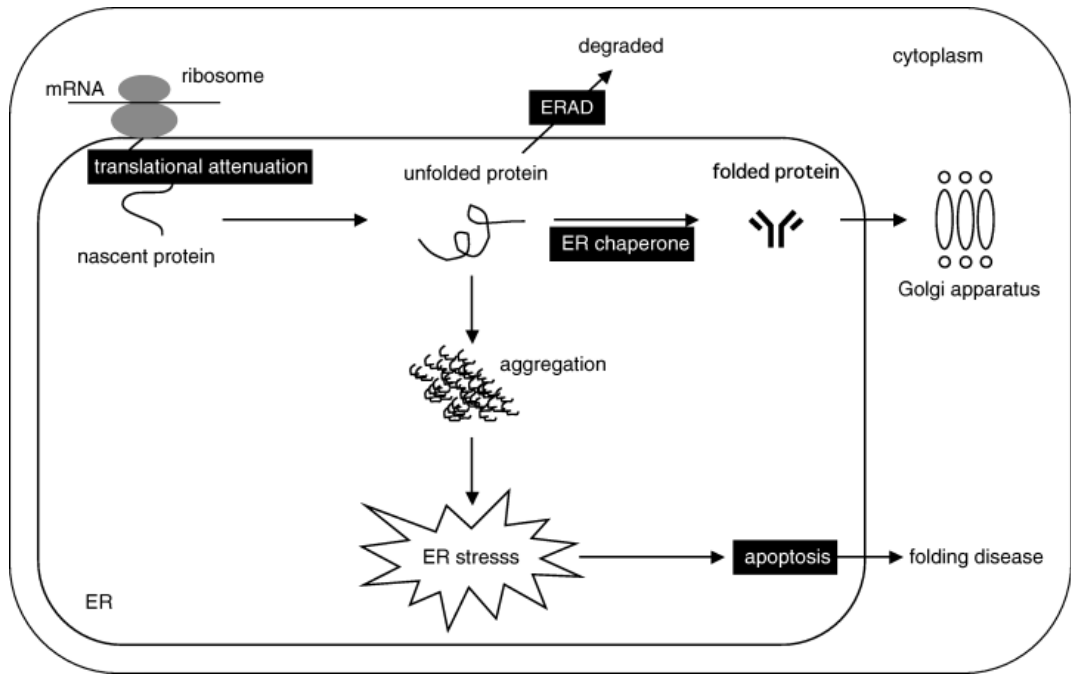
ER homeostazını ve uygun ER işleyişini değiştiren koşullar ER stresi olarak bilinen bir durum oluşturur. ER stresi, ER'nin proteinleri katlama ve aktarma kabiliyeti ile yanlış katlananların bozulması arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkar (Siwecka ve ark. 2019). ER lümeninde toksik, katlanmamış proteinlerin birikmesi nedeniyle hücre bütünlüğüne çok zararlı olabilecek bu duruma birçok farklı faktör yol açabilir. Bu nedenle, ER homeostazının eski haline getirilmesi, hücrenin hayatta kalması için çok önemlidir. ER stresine maruz kalan hücreler, stresi azaltmak için yetersiz kalırsa hücre ölümüne yol açan bir dizi işlemi aktive eder. Hücresel strese yanıt olarak, iyi kurulmuş bir sinyal kaskadı, katlanmamış protein yanıtı (UPR) aktive edilir. Bu karmaşık mekanizma, hücresel homeostazı yeniden kurmanın ve tetikleyici stresi hafifletmenin önemli bir yoludur. Ortaya çıkan kanıtlar, UPR'nin kalsiyum ve lipid transferi dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla hücresel metabolizmayı etkilediğini ve bu süreçlerin nörodejenerasyon, kanser, diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere hastalık patogenezinin dahil olma olasılığını artırdığını göstermiştir (Bravo ve ark. 2013).

ER stresine hücresel yanıt, UPR olarak bilinir. Prensip olarak UPR, paralel ve seri olarak hareket eden çoklu stratejiler kullanarak ER'nin normal işleyişini eski haline getirmeye çalışır. Örneğin, ER şaperon proteinlerinin ekspresyonu, protein agregasyonunu önlemek ve doğru protein katlanmasını kolaylaştırmak için artar. Ayrıca, ER'den geçen protein miktarı, protein translasyonunun geçici olarak engellenmesi ile azaltılır. Bunun yanı sıra, membran lipidlerinin sentezini uyararak ER hacmi artar. Son olarak, katlanmamış proteinlerin bozulması, endoplazmik retikulum ile ilişkili protein yıkımı (ERAD) sürecini aktive ederek artar (Bravo ve ark. 2013).

Büyük miktarlarda yanlış katlanan proteinlerin üretilmesi, yüksek ısı sebebiyle katlanan proteinlerin yeniden açılması, mutant proteinlerin üretilmesi, artan protein trafiği,



glukozun azalması ve viral enfeksiyonların tümü ER için ciddi stres kaynaklarıdır (Yoshida 2007). Endoplazmik retikulum stresi, toplu olarak UPR olarak adlandırılan bir dizi sinyal yolunu aktive eder (Lin ve ark. 2007). ER, oksidatif hasara nispeten duyarlı bir organel olduğundan, strese karşı UPR sinyal yolunun aktivasyonuna neden olur. UPR'nin sonucu, çok sayıda faktöre bağlı olarak, pro-survival ve pro-apoptotik dal arasında değişebilir ve bunlar arasında geçiş yapabilir. Bu nedenle kanser hücrelerinin kaderine karar vermede karşıt etkiler gösterir (Siwecka ve ark. 2019).



**Şekil 2.10.** Memeli ER stres tepkisi. ER'de katlanmamış proteinlerin birikmesi ER stresini indükler ve hücreler bununla başa çıkabilmek için ER stres tepkisini uyarır. Memeli ER stres tepkisi 4 mekanizmadan oluşur: 1) translasyon zayıflaması; 2) ER şaperonlarının ifadesi; 3) geliştirilmiş ERAD; 4) apoptoz (Yoshida 2007).

ER'de katlanmamış proteinlerin birikmesi ER stresini indükler ve hücreler başa çıkmak için ER stres tepkisini uyarır (Şekil 2.10.). Memeli ER stres tepkisi dört mekanizmadan oluşur. Birincisi, katlanmamış proteinlerin daha fazla birikmesini önleyen protein sentezinin zayıflatılmasıdır. İkincisi, katlama kapasitesini artırmak için ER şaperon genlerinin transkripsiyonel indüksiyonudur ve üçüncüsü, ERAD yeteneğini artırmak için ERAD bileşen genlerinin transkripsiyonel indüksiyonudur. Dördüncüsü, organizmanın

hayatta kalmasını sağlamak için ER stresinin zarar verdiği hücrelerin güvenli bir şekilde yok edilmesi için apoptozun indüksiyonudur (Yoshida 2007).

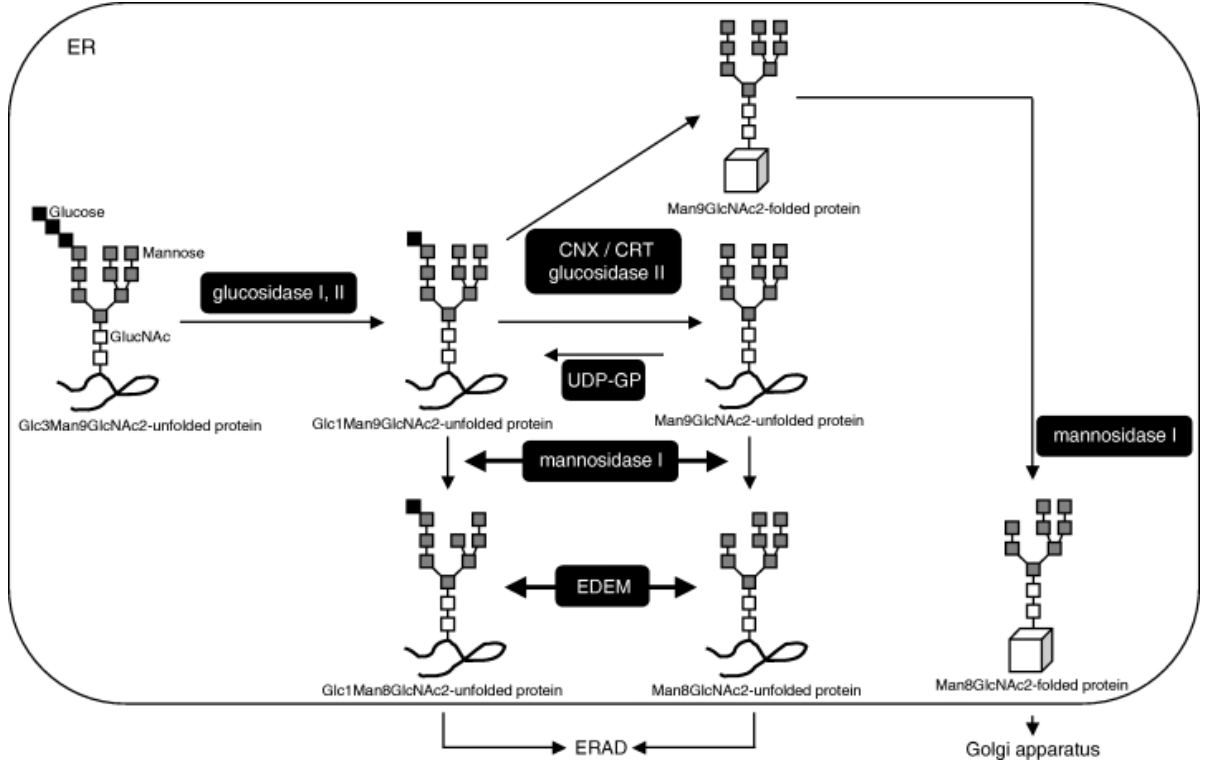
### **2.2.3. Protein katlanması ve hücrelerin yanlış katlanmaya tepkisi**

Protein katlanma süreci hatasız bir süreç değildir. Yeni sentezlenen proteinlerin üçte birlik bölümünün hatalı katlandığı bilinmektedir. Proteinler uygun şekilde katlanmış olsalar da, ısı ve ER stresi gibi hücresel streslere sürekli olarak maruz kaldıklarından, hücre içerisinde sıklıkla aşınmaya uğramaktadırlar (Nishikawa ve ark. 2005). Hatalı katlanan ya da agregre olan proteinler, hücre için son derece sitotoksiktir. Hatalı formdaki proteinlerin ER lümeninde birikimi, serbest şaperon seviyelerini düşürerek “ER stresi” adı verilen süreci tetiklemektedir. Hücrelerin bu stres ile başa çıkabilmeleri ancak ER'nin protein katlama kapasitesini arttırması ve hatalı katlanan proteinlerin protein yıkım sürecine yönlendirilerek etkisiz hale getirilmesi ile mümkündür. Bu amaçla hücrelerde Katlanmamış Protein Cevabı (UPR, unfolded protein response) adı ile bilinen yolak devreye girmektedir (Nishikawa ve ark. 2005). UPR, ER'nin metabolik ve protein katlama verimliliğini eski haline getiren ER stresini hafifletmek için geliştirilmiş adaptif bir mekanizmadır. UPR'nin aktivasyonu, ER zarında bulunan üç stres sensörünün uyarılmasıyla başlatılır: PKR-benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), İnozitol gerektiren enzim 1 (IRE1) ve aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF6) (Santamaría ve ark. 2019). Bu üç UPR dalı, katlanmamış protein seviyelerini azaltarak hücre sağkalımını arttırır. UPR sinyali, ER stresi azaltılmazsa apoptotik hücre ölümünü de destekler (Lin ve ark. 2007). UPR yolağı, ER membranında BiP proteinine bağlı inaktif formda tutulan ve IRE1, ATF6 ve PERK olarak adlandırılan lokalize 3 adet transmembran özellikteki ER sensör proteini aracılığıyla kontrol edilmektedir. ER stresinin indüksiyonu sonrası represör olarak görev yapan BiP'in sensörlerden uzaklaşması, ER sensör proteinlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Nishikawa ve ark. 2005). Hatalı katlanmış proteinler ile hücrenin mücadele etme yollarından bir diğeri ise Endoplazmik Retikulum ilişkili protein yıkımı (Endoplasmic reticulum-associated degradation; ERAD) adı verilen bir mekanizmayla tanınması ve proteazomal yıkıma sevk edilmesidir (Friedlander ve ark. 2000).

Endoplazmik retikulumda sentezlenen proteinler, ER şaperonlarının yardımıyla uygun şekilde katlanır. Yanlış katlanmış proteinler, ERAD ile atılır. Katlanmamış protein miktarı ER'nin katlanma kapasitesini aştığında, insan hücreleri ER şaperonlarının ve ERAD bileşenlerinin ifadesini indükleyen ve ER üzerindeki yükü azaltmak için geçici olarak protein sentezini zayıflatan UPR adı verilen bir savunma mekanizmasını etkinleştirir. Üç bağımsız yanıt yolunun; şaperonların ve ERAD bileşenlerinin ekspresyonunun indüksiyonu ile translasyonel zayıflamanın ayrı ayrı düzenlediği ortaya çıkmıştır (Yoshida 2007).

Proteinler şaperonlara bağlanır ve ilk olarak kendi içlerinde disülfür köprüleri oluşturur. Daha sonrasında o proteini oluşturan amino asitlerin hidroksil, amin gibi peptit bağlarına katılmayan serbest polar gruplar, hidrojen bağları ve Van Der Waals kuvvetleri ile birbirlerini çekip, iterek proteinin katlanıp son şeklini almasını sağlar. Katlanma sonrasında glukozidaz II, katlanan proteinin ucunda kalan son glukozu koparır. Uçtaki son glukoz koptuğunda şaperon tuttuğu katlanmış proteini bırakır. Eğer katlanma doğruysa bu proteinin ER'dan dışarı çıkmasına yol açar. Normalde şeker grupları katlanmış proteinin hidrofobik kısımlarını örtecek şekilde öyle kritik noktalara takılmıştır ki, eğer protein yanlış katlanırsa şekerler iç, hidrofobik kısımlar dış tarafta kalır. Bu tarz durumda 2 şey gerçekleşmektedir;

- İlk olarak şekerler, içte kalan yanlış katlanmış proteinlere bağlandığı için, EDEM (ER degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein) adlı bir enzim hatalı katlanan bu proteinleri tanır ve ardından onları parçalanmaya gönderir. Bu parçalanma ERAD adı verilen, hatalı katlanmış proteinlerin übikitinle etiketlenerek, proteazomda parçalanmasına ilişkin bir süreci kapsar (Şekil 2.11.).
- İkinci olarak, doğru katlanmayan proteinlerin dış tarafında kalan hidrofobik kısımlara Grp78 (glucose regulated protein 78) bağlanır. Grp78, normalde ER'un membranında bulunan 3 farklı proteinin iç tarafa bakan uçlarına yapışır ve bu proteinlerin inaktif şekilde beklemelerini sağlar (Yoshida 2007).

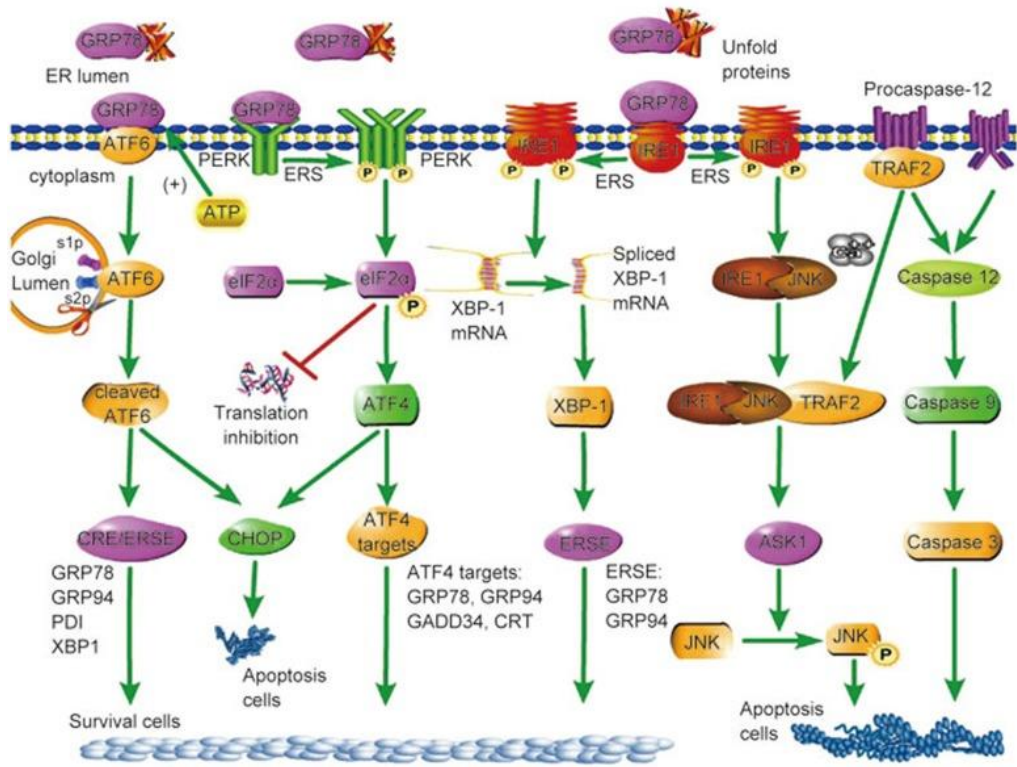


**Şekil 2.11.** Glikoprotein katlanması ve bozulması. ER'de sentezlenen yeni oluşan glikoproteinlerin şeker zincirleri, glukozidaz I veya II tarafından kesilir ve bir glikoz kalıntısı içeren polipeptitler, kalneksin döngüsü ile katlanır. Kalneksin döngüsü tarafından katlanamayan bir polipeptit kalıntısı, mannosidaz I tarafından çıkarılır ve daha sonra polipeptitler, EDEM tarafından tanınır ve ERAD tarafından bozular (Yoshida 2007).

#### 2.2.4. GRP78

Grp78, glukozun azalmasına bir yanıt olarak daha fazla üretilen bir proteindir. Diğer adı BiP'tir. HSPA5 adlı bir gen tarafından kodlanır ve "Heat shock protein 70kDa" protein ailesine mensup bir şaperondur (Yoshida 2007). Grp78, "glukozun düzenlediği protein" anlamına gelen "Glucose regulated protein" sözcüklerinin baş harflerinden türetilmiştir. Mol ağırlığının 78kDa olması sebebiyle bu ismi almıştır. Grp78 immunoglobulinlerin ağır zincirlerine bağlanır. Bu sebeple bazı bilimsel eserlerde Grp78 yerine "Binding immunoglobulin protein" sözcüklerinin baş harflerinden türetilmiş olan BiP kısaltması kullanılmaktadır (Yoshida 2007).

Hücresel stresi algılama esas olarak BiP olarak da bilinen ER yerleşik bir şaperon olan GRP78'e (HSPA5) bağlıdır (Santamaría ve ark. 2019). ER stresinin induksiyonu sonrası represör olarak görev yapan BiP'in sensörlerden (IRE1, PERK ve ATF6) uzaklaşması, ER sensör proteinlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Nishikawa ve ark. 2005). Normal fizyolojik koşullar altında, bu 3 transmembran proteini BiP tarafından inaktif bir konfigürasyonda tutulur. Yanlış katlanmış proteinlerin veya UPR'yi aktive edebilen diğer uyarıların birikmesi üzerine BiP, ER sensörlerinden ayrılır ve bunun yerine ER lümenindeki katlanmamış proteinlere bağlanır (Storm ve ark. 2016). Her üç ER stres sensörü de hayatta kalma veya ölüm kararlarını kontrol eden sinyal yollarını tetikler. Katlanmamış proteinlerin birikmesi, GRP78'i sekestre ederek UPR'den sorumlu 3 ER yerleşik sensörünün aktivasyonunu tetikler (Şekil 2.12.) (Santamaría ve ark. 2019).



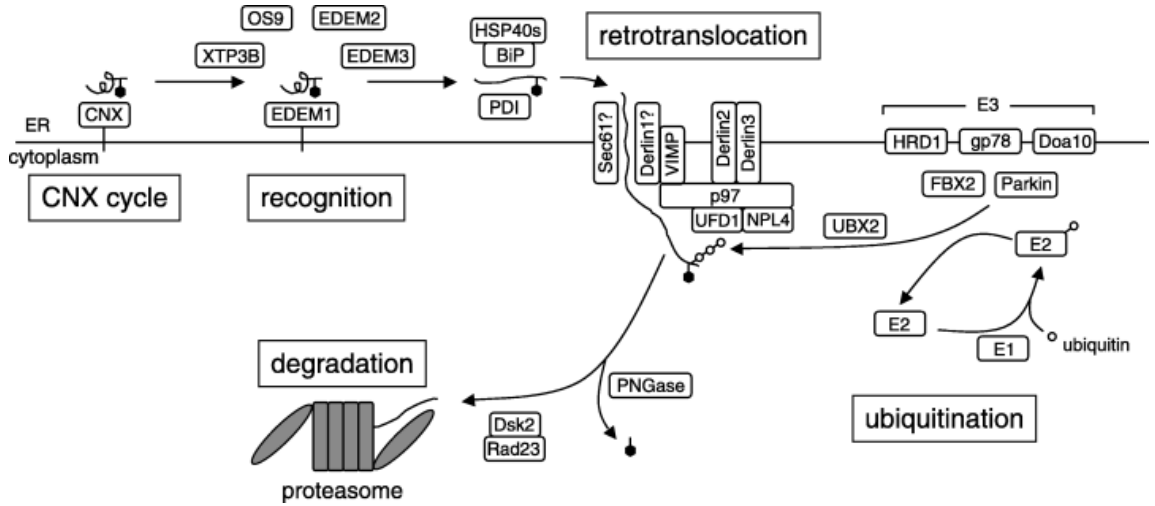
Şekil 2.12. ER stresinin sinyal yolları (Liu ve ark. 2016).

### 2.2.5. ERAD

Yanlış katlanmış proteinler hücrel homeostazı tehlikeye atar. Bu durum, yüksek kapasiteli protein katlama bölmesi olan ve işlevi sıkı protein kalite kontrol sistemleri gerektiren endoplazmik retikulumda özellikle sorunludur (Needham ve ark. 2019). Hatalı katlanmış proteinler ile hücrenin mücadele etme yollarından bir diğeri ise Endoplazmik Retikulum ilişkili protein yıkımı (ERAD) adı verilen bir mekanizmayla tanınması ve proteazomal yıkıma sevk edilmesidir (Friedlander ve ark. 2000). ER'deki multiprotein kompleksleri, sitozoldeki bozunma için yanlış katlanmış proteinleri 26S proteazomuna tanımlayabilir, çıkarabilir, ubiquitine edebilir ve iletebilir. Bu olaylar topluca ER ile ilişkili bozunma veya ERAD olarak adlandırılır. ERAD yolağındaki birkaç adım moleküler şaperon ağları tarafından kolaylaştırılır ve ERAD'ın önemi, bu yolun çeşitli protein konformasyonel hastalıklarla bağlantılı olması gerçeğiyle vurgulanmaktadır (Needham ve ark. 2019).

ERAD fonksiyonunda gözlenen bozuklukların, kistik fibröz,  $\alpha$ 1-antitripsin (AAT) yetmezliği, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalıkları), viral enfeksiyon ve albinizm gibi yetmiş yakın hastalığın patolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Guerriero ve Brodsky 2012). UPR'nin aktivasyonu, ER aşırı yüklenmesini azaltmak için protein çevirisinin azaltılması, ERAD sistemi yoluyla yanlış katlanmış proteinlerin bozulmasında artış da dahil olmak üzere birçok sağ kalım önleme mekanizması yoluyla katlanmamış protein yükünü azaltır. Dolayısıyla UPR, uyarlanabilir pro-sağkalımı ve aynı zamanda pro-apoptotik yanıtları içeren karmaşık bir mekanizmadır (Santamaría ve ark. 2019).

ER'de biriken katlanmamış/yanlış katlanmış proteinlerin bolluğu, özellikle katlanmamış proteinlerin birikmesi nedeniyle, yeni protein sentezi engellenir. Birikmiş proteinleri temizlemek için, birçok şaperon geni, transkripsiyonel seviyede indüklenir ve hatalı katlanmış proteinleri proteazomal bozunma yoluyla yer değiştirip çıkarabilen ERAD sistemini aktive eder. Bu süreçler, katlanmamış protein tepkisi olarak tanımlanır (Liu ve ark. 2016).

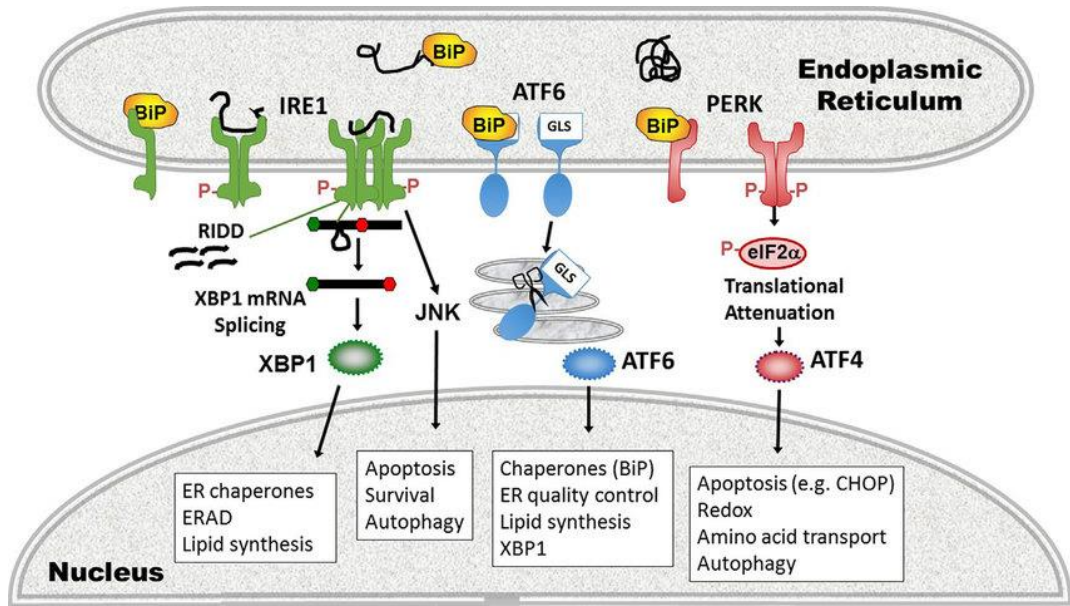


**Şekil 2.13.** Memeli ERAD mekanizması. Kalneksin döngüsünden salınan katlanmamış proteinler, EDEM ve OS9 içeren bir tanıma kompleksi tarafından yakalanır, retrotranslokasyon makinesi yoluyla sitozole taşınır, E1-E2-E3 sistemi tarafından poli-übikitinleştirilir ve proteazom tarafından bozulur (Yoshida 2007).

Yanlış katlanmış proteinlerin açığa kalan hidrofobik kısımları, PERK, ATF6 ve IRE1'e yapışarak onları inaktif halde tutan Grp78'i kendine doğru çeker. Böylece yanlış katlanmaya yanıt veren PERK, ATF6 ve IRE1'in aktifleşmesini sağlar. PERK, translasyonu yavaşlatırken, IRE1 ve ATF6 daha fazla şaperon yapılmasını sağlar ve böylelikle ER stresini azaltmaya çalışır. ERAD, son mannozu koparılmış ve hatalı bir protein olarak kabul görmüş proteinlerin sitoplazmaya taşınmasını sağlayarak orada übikitinle etiketlenip, proteazomda parçalanmasına ilişkin bir süreçtir. ERAD süreci yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasına yol açtığından ER stresini azaltmaktadır. Sitoplazmaya çıkan yanlış katlanmış bu proteinler de sitoplazmada übikitinasyon sistemi ile karşılaşmaktadır. Übikitinasyon sistemi aracılığıyla, proteozomlarda parçalanarak yok edilmesi istenen proteinler, übikitin adı verilen küçük bir peptit yapılandırılarak etiketlenir. Bu etiketleme sistemi 3 enzimden oluşur; E1, E2 ve E3. Hatalı proteinler E1 ve E2 enzimleri ile tanınır ve E3 enzimiyle, etiketlenmeye hazır hale getirilmiş proteinlere übikitin yapılandırılır (Şekil 2.13). Übikitinle işaretlenmiş bu proteinler proteazomda parçalanarak yok edilir (Yoshida 2007).

## 2.2.6. UPR sinyal yolları

Endoplazmik Retikulum, protein kalite kontrolünün yanı sıra sekretuar proteinlerin çoğunun katlanması ve birleştirilmesinden sorumlu olan başlıca membran trafiği sistemini oluşturur. Fizyolojik veya patolojik uyarılar, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi yoluyla ER'de stres yaratır. Bu koşullar altında, ER homeostazını yeniden dengelemek için UPR olarak adlandırılan bir sinyal ağı aktive olur (Siwecka ve ark. 2021).

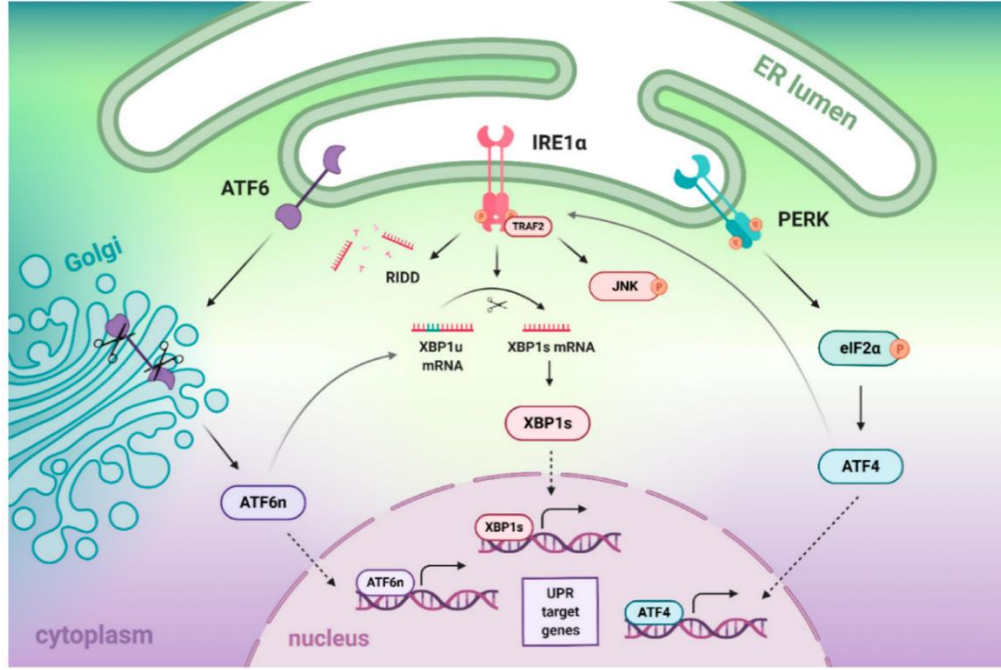


Şekil 2.14. UPR sinyal yolunun 3 ana dalı ve bunların ara bağlantıları (Smith 2018).

ER stres koşulları altında, hasarlı proteinler ER lümeni içinde birikir ve bağlayıcı immüoglobulin proteinlerine (BiP'ler) bağlanır, bu da proteinleri yeniden katlamak için ATF6, IRE1α ve PERK ile transmembran komplekslerinden ayrılır. Sonuç olarak, UPR'nin üç dalı aktive olur ve yeterli stres tepkilerini tetikler (Siwecka ve ark. 2019). UPR, ER'nin metabolik ve protein katlama verimliliğini eski haline getiren ER stresini hafifletmek için geliştirilmiş adaptif bir mekanizmadır. UPR'nin aktivasyonu (Şekil 2.14), ER zarında bulunan üç stres sensörünün uyarılmasıyla başlatılır: PERK, IRE1 ve ATF6 (Santamaría ve ark. 2019). Bu üç UPR dalı, katlanmamış protein seviyelerini azaltarak hücre sağkalımını artırır. UPR sinyali, ER stresi azaltılmazsa apoptotik hücre ölümünü destekler (Lin ve ark. 2007). Tüm bu proteinler, ER stres koşulları üzerine aktive olur



ve UPR'nin moleküler bekçileri olarak görev yapar. Üç stres sensörü arasında önce PERK, ardından IRE1 ve ATF6 etkinleştirilir. Bunlardan her biri, UPR sinyal iletim yollarının farklı dallarını bağımsız olarak yönetir (Siwecka ve ark. 2021).



**Şekil 2.15.** Katlanmamış Protein Tepkisi (UPR) bağımlı sinyal dallarının yapısı ve aralarındaki karışma (Siwecka ve ark. 2021).

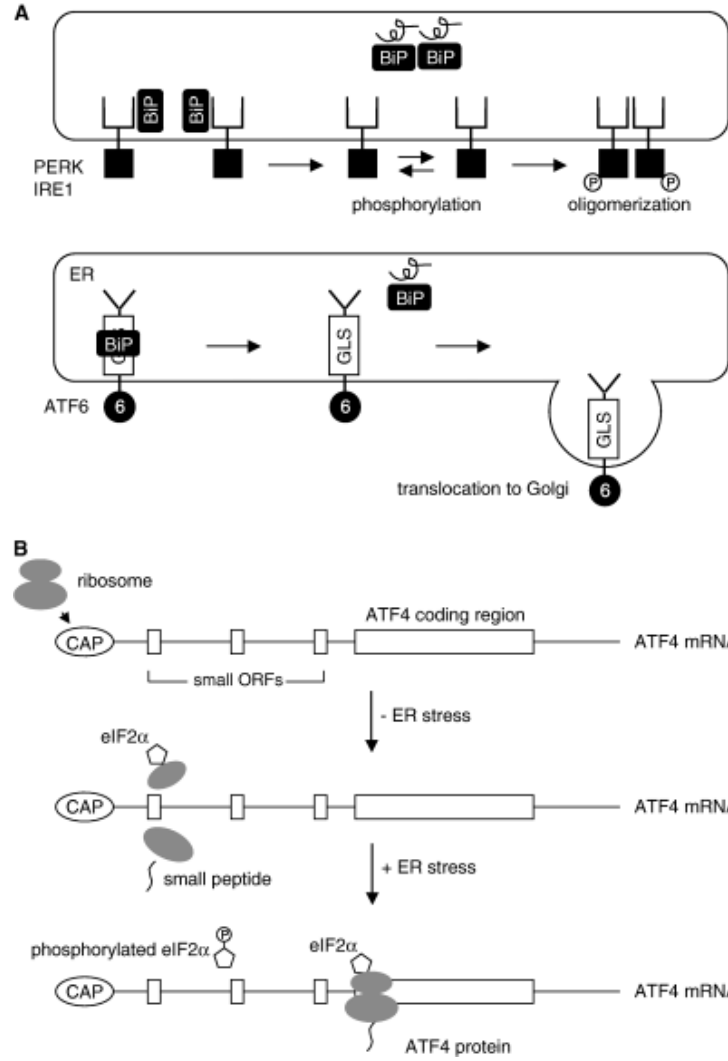
Şekil 2.15'te gösterildiği gibi ER stresi üzerine ATF6, Golgi aygıtında proteolitik bölünmeye uğrar, burada transkripsiyonel olarak aktif formu (ATF6n) üretilir. IRE1 $\alpha$ 'nın çeşitli aktiviteleri vardır: Spesifik mRNA'ların düzenlenmiş IRE1-Bağımlı Bozulmasını (RIDD), XBP1 mRNA'nın geleneksel olmayan şekilde eklenmesini indükler ve ayrıca JNK sinyal kaskadını başlatmak için TNF Reseptör İlişkili Faktör 2 (TRAF2) ile etkileşime girer. Aktive edilmiş PERK, genel translasyon başlangıcını bloke eden ve aynı zamanda ATF4 dahil olmak üzere belirli mRNA'ların translasyonunu seçici olarak indükleyen eIF2 $\alpha$ 'yı fosforile eder (Siwecka ve ark. 2021).

### 2.2.7. PERK'in etkinleşmesi ve işlevi

PERK, "Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase" sözcüklerinin baş harflerinden türetilmiştir. Bu protein ER zarına lokalizedir ve tirozin kinaz enzim

aktivitesi gösteren yüzeyi sitoplazma tarafında bulunur. Grp78'i bağlayan kısmı ise ER boşluğuna bakmaktadır. Grp78, PERK'ten ayrıldığında, normalde birbirinden ayrı duran PERK molekülleri birbirine yaklaşır ve ardından üç tane PERK molekülü birlikte çalışmaya başlar. Birbirine yaklaşan PERK molekülleri, uçlarındaki tirozin kinaz enzimlerini kullanıp birbirlerinin uçlarına fosfat grupları takar, yani otofosforile olur. Bu olay PERK'in aktivasyonudur (Yoshida 2007).

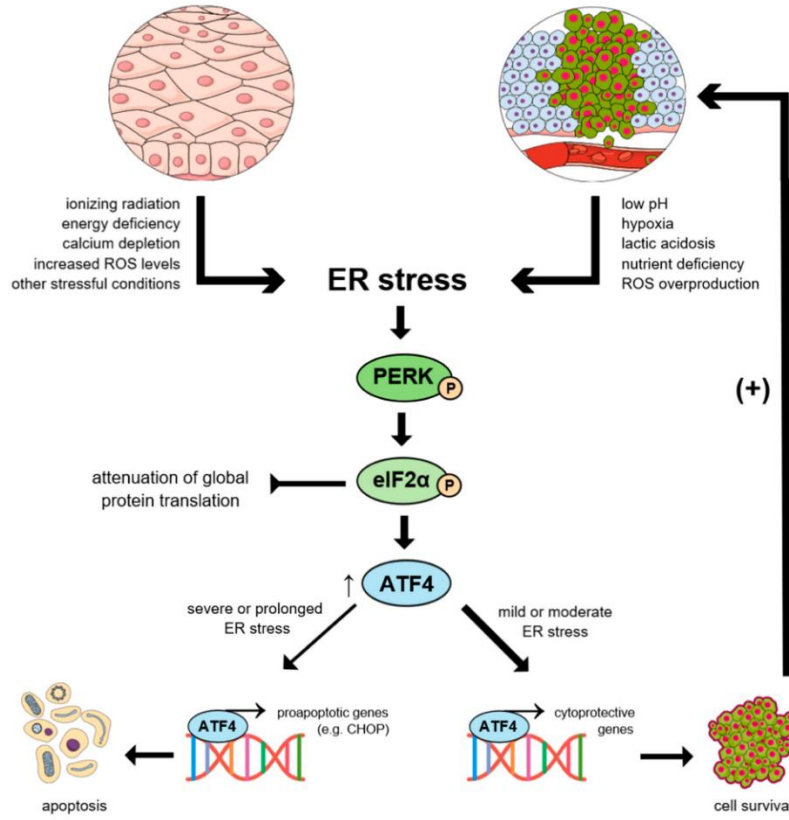
PERK, ER stresine yanıt olarak translasyonu azaltan bir ER transmembranı Ser/Thr kinazdır. ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikmesiyle PERK, ökaryotik çeviri başlatma faktörü 2 (eIF2)  $\alpha$ -alt biriminde dimerize olur, otofosforile olur ve daha sonra global translasyonun zayıflamasına neden olan Ser51'i fosforile eder. Global translasyondaki azalma, ER'ye giren yeni sentezlenen proteinlerin miktarını hızla azaltır ve iyileşmesini sağlar. Çeviri durmasına rağmen, 5'-UTR'de kısa açık okuma çerçevelerine (uORF) sahip birkaç seçilmiş mRNA bu translasyon inhibisyonundan kaçır. Bunun memelilerde en iyi karakterize edilen örneği, redoks dengesi, aminoasit metabolizması, protein katlanması, otofaji ve hücre sağkalımı ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörü 4'ü (ATF4) aktive etmektir. ATF4 hedef genleri arasında apoptozun düzenlenmesinde yer alan bir transkripsiyon faktörünü kodlayan CHOP vardır. CHOP'un, ER stresörleri ile tedavi edildiğinde vahşi tip hücrelere kıyasla CHOP -/- MEF'lerin gelişmiş hücre sağkalımı sergilediği, apoptozu desteklediği gösterilmiştir. CHOP, muhtemelen proapoptotik BİM'in transkripsiyonel indüksiyonu ve apoptoza yol açan antiapoptotik BCL-2 ekspresyonunun down-regülasyonu yoluyla apoptozu tetiklemektedir (Storm ve ark. 2016). Bir transmembran kinaz olan PERK, translasyonu azaltmak ve ATF4 ekspresyonunu up-regüle etmek için eIF2 $\alpha$ 'yı fosforile eder (Şekil 2.16) ve CHOP gibi hedef genlerin transkripsiyonunun artmasına yol açar (Yoshida 2007).



**Şekil 2.16.** PERK yolunun aktivasyonu. (A) PERK, IRE1 ve ATF6'nın aktivasyonu. ER stresi olmadığında BiP, bu sensörlere bağlanarak PERK, IRE1 ve ATF6'nın aktif hale gelmesini engeller. BiP, IRE1 ve PERK aktivasyonunu oligomerize olmalarına izin vermeyerek engellerken, ATF6'nın translokasyonunu Golgi-lokalizasyon sinyalini (GLS) maskeleyerek engeller. BiP, katlanmamış proteinler tarafından sensörlerden ayrıldığında, bu sensör molekülleri aktive olur. (B) ATF4 ifadesinin düzenlenmesi. ER stresinin yokluğunda, eIF2 $\alpha$ 'nın çoğu aktiftir (fosforile değildir) ve çeviri küçük ORF'lerde başlar ve ATF4 ORF'ye ulaşmadan önce ribozomların salınmasına yol açar. ER stresi üzerine, eIF2 $\alpha$ 'nın çoğu inaktif hale gelir (fosforile olur) ve çeviri nadiren küçük ORF'lerde başlar (Yoshida 2007).

PERK sinyallemesi, fosfatase PP1 ile birleşen ve eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonunu destekleyen, böylece translasyonel inhibisyonu hafifleten, CHOP hedef gen büyüme durması ve DNA hasarına neden olabilen GADD34 tarafından ayarlanır. PERK sinyali, uyarlanabilir yanıt fazı ve apoptoza yol açan kronik ER stresi arasındaki geçişte merkezi bir konumdadır. Ek

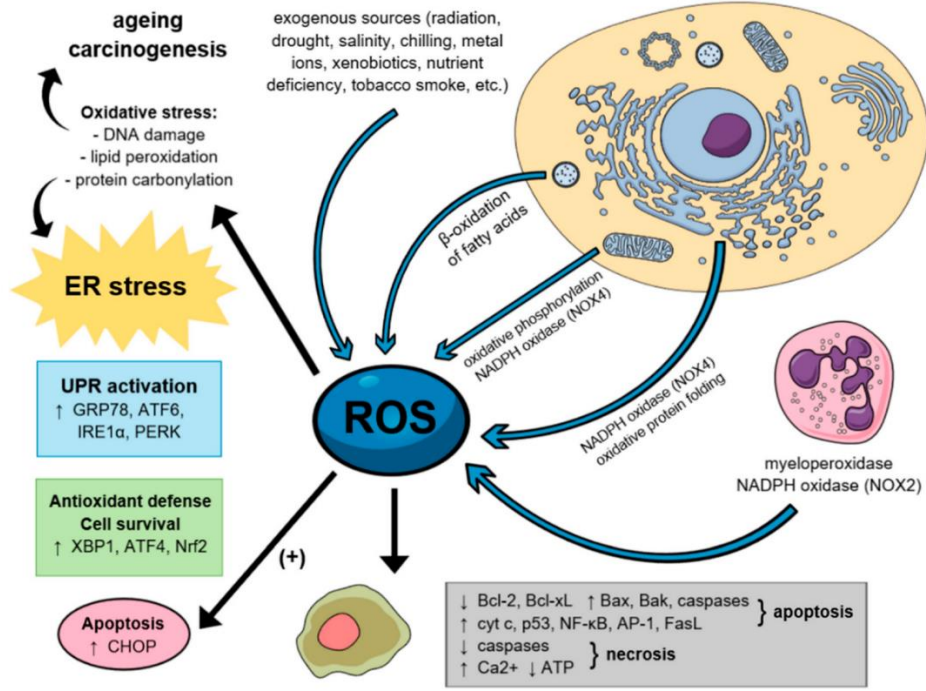
olarak CHOP, ER oksidoredüktin-1 $\alpha$  (ER1 $\alpha$ ) ekspresyonunun induksiyonu yoluyla ER’de oksidatif protein katlanmasını teşvik eder. Bununla birlikte, disülfid bağı oluşumunda ortaya çıkan artış, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturur. Bu, kronik ER stresi koşulları altında, GADD34 yoluyla ER’ye protein akışındaki CHOP aracılı artışın ve daha sonra ROS oluşumundaki artışın da apoptoza yol açan artmış bir strese yol açabileceğini düşündürmektedir (Storm ve ark. 2016).



**Şekil 2.17.** Normal epitel hücreleri ve kanser hücrelerinde ER stres koşullarına PERK-bağımlı UPR sinyal yolu aktivasyonuyla ikili yanıt. (Siwecka ve ark. 2019).

İlginçtir ki, eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonu, global olarak translasyonu azaltır ancak ATF-4 gibi bazı belirli mRNA'ların translasyonunu da tam tersi uyarır. Ayrıca bu süreç sırasında UPR’de rol oynayan aminoasit metabolizması, aminoasit transportu, ERAD ve endoplazmik retikulumun genişlemesinde rol oynayan birçok genin transkripsiyonu da indüklenir. Aktive edilmiş PERK, Şekil 2.17’de gösterildiği gibi, protein sentezini azaltan ancak paradoksal olarak ATF4’ünki gibi mRNA’ların translasyonunu artıran eIF2 $\alpha$  alt birimini fosforile eder. ATF4, sırayla, transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteininin

(CHOP) up-regülasyonunu içeren bir transkripsiyonel programı başlatır. ATF4 ve CHOP, protein sentezindeki fonksiyonları kodlayan genlerin ekspresyonunu iş birliği içinde uyarır ve yeniden aktive edilmiş çeviri oranı, apoptozu indükleyen önemli miktarlarda ROS üretir (Sarcinelli ve ark. 2020).



**Şekil 2.18.** Serbest radikallerin biyolojik kökeni ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri (Siwecka ve ark. 2019).

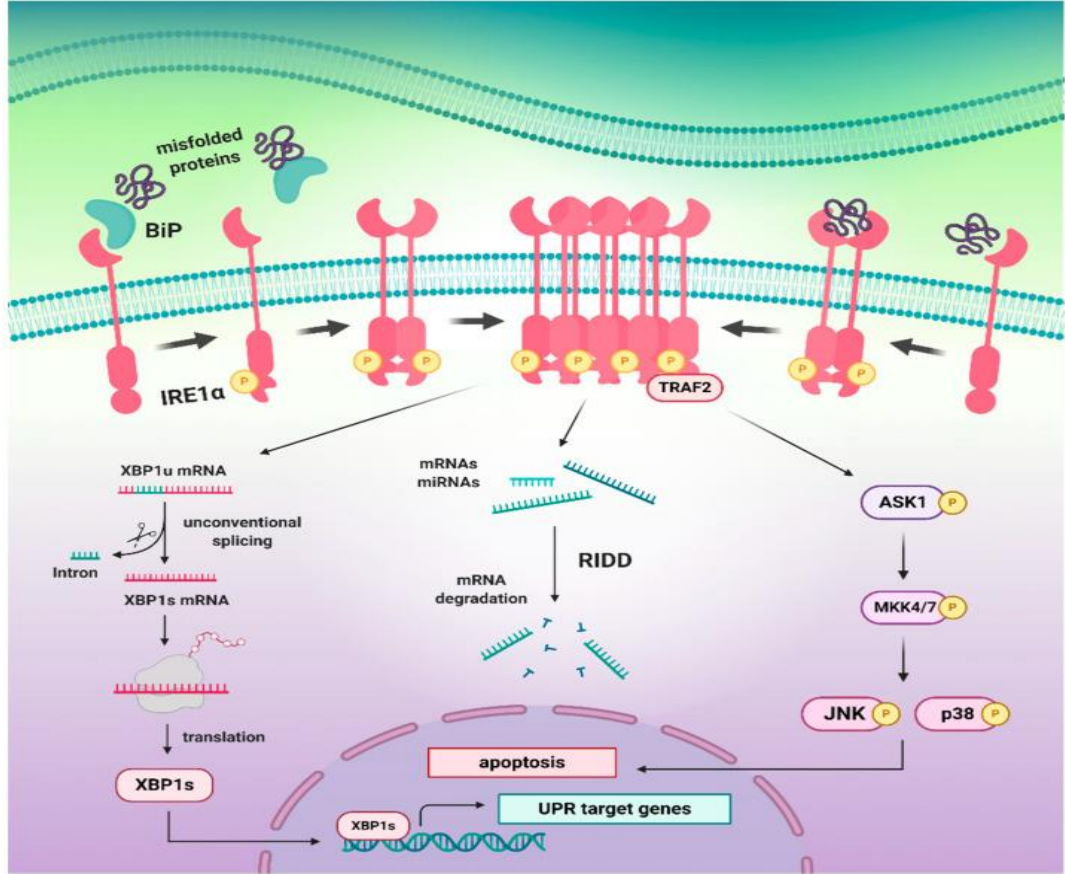
Şekil 2.18'de resmedildiği gibi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) genellikle hem içsel faktörlerden (hücre altı organellerde fizyolojik olarak yürütülen enzimatik reaksiyonlar) hem de çok sayıda dışsal olanlardan türetilir. ROS, bağışıklık tepkisi veya redoks sinyalleri de dahil olmak üzere hücrenin normal işleyişi için açıkça gerekli olmasına rağmen, aşırı yüklenmeleri zararlı olabilir ve önemli hasara neden olabilir. Nihayetinde, apoptotik veya nekrotik hücre ölümünün yürütülmesine yol açabilir veya hatta tümör büyümesini sağlayabilir. UPR sinyal yolu, ROS kaynaklı oksidatif stres ile yakından bağlantılıdır ve hücrel redoks dengesizliğini ele almak için aktive olur (Siwecka ve ark. 2019).

### 2.2.8. IRE-1'in etkinleşmesi ve işlevi

İnositol gerektiren enzim tip 1 (IRE-1), ER stres koşullarında aktive olan UPR sinyal yolunun üç dalından biri olarak hareket eden bir serin/treonin kinazdır. Çok sayıda insan patolojisi ile sıkı bir şekilde ilişkili olan hem hayatta kalma yanlısı hem de pro-apoptotik hücrel tepkileri indükleyebildiği bilinmektedir. Diğerlerinin yanı sıra, IRE1 aktivitesinin, ER lümeni içinde yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ve sonuçta ortaya çıkan ER stres koşulları ile ilişkili kanser, nörodejenerasyon, enflamatuar ve metabolik bozukluklarda arttığı doğrulanmıştır. Ortaya çıkan kanıtlar, IRE1'in genetik veya farmakolojik modülasyonunun hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini ve bu nedenle yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine yönelik ümit verici bir adım olabileceğini göstermektedir (Siwecka ve ark. 2021).

IRE1, hem bölgeye özgü bir endoribonükleaz hem de bir Ser/Thr kinazdır. Memelilerde, iki izoform halinde bulunur; IRE1 $\alpha$  ve IRE1 $\beta$ . IRE1 $\alpha$  tüm dokularda eksprese edilirken IRE1 $\beta$  sadece esas olarak gastrointestinal ve solunum yollarında bulunur. ER lümenindeki katlanmamış proteinlere yanıt olarak, IRE1 $\alpha$  dimerize ve oligomerize ederek kinaz bölgelerinin trans-otofosforilasyonuna neden olur. Bu durum, sitosolik RNaz domaininin aktivasyonuna ve yüksek sekansa spesifik endoribonükleolitik bölünmeye, ardından da X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) olarak adlandırılan bir transkripsiyon faktörünü kodlayan mRNA'nın eklenmesine yol açar (Storm ve ark. 2016). XBP1'ler tek başına ya da diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte, şaperonların üretimini, ER biyogenezinde yer alan proteinleri, ER stresi, ERAD ve sekresyon altında ER genişlemesi için gerekli fosfolipid sentezini aktive eden bir transkripsiyonel program başlatır. IRE1 $\alpha$ -XBP1s sinyali bu nedenle ER'nin katlanma kapasitesini arttırmak ve ER stresi ile başa çıkmak için ana yollardan biridir (Storm ve ark. 2016). IRE1 fonksiyonel transkripsiyon faktörü XBP1'leri oluşturan XBP1'i (XBP1u) kodlayan mRNA'nın alışılmadık bir şekilde birleştirilmesine aracılık eder ve NF $\kappa$ B sinyallemesini aktive edebilir. IRE1 RNaz, ER ile ilişkili RNA'ları RIDD (regüle edilmiş IRE1-bağımlı bozunma) yoluyla bozar (Santamaría ve ark. 2019). Kısaca, IRE1 $\alpha$ 'nın çeşitli aktiviteleri vardır: Şekil 2.19'da gösterildiği gibi, spesifik mRNA'ların düzenlenmiş IRE1-Bağımlı Bozulmasını (RIDD), XBP1 mRNA'nın geleneksel olmayan şekilde eklenmesini indükler ve ayrıca

JNK sinyal kaskadını başlatmak için TNF Reseptör İlişkili Faktör 2 (TRAF2) ile etkileşime girer (Siwecka ve ark. 2021).



**Şekil 2.19.** İnsan IRE1α'ya bağlı sinyal yolunun aktivasyonu (Siwecka ve ark. 2021).

IRE1 iki alandan oluşur; katlanmamış proteinleri algılayan ER lümenal alan ve serin/treonin kinaz N-terminali ve endoribonükleaz (RNaz) alanları yoluyla UPR'yi başlatan C-terminal sitoplazmik bölge. İkincisi, konformasyonel değişim, otofosforilasyon ve üst düzey montaj yoluyla aktive olur. IRE1 iki farklı yolla hücre kaderini indükleyebilir: Birincisi, transkripsiyon faktörü XBP1 mRNA'nın veya RIDD posttranskripsiyonel eklenmesi yoluyla uyarlanabilir hücresel tepkinin indüksiyonu ile modifikasyonlar; ikincisi ise Şekil 2.19'da görüldüğü gibi uzun süreli veya şiddetli stres koşulları altında gerçekleşen pro-apoptotik c-Jun N-terminal kinazın (JNK) aktivasyonu ile (Siwecka ve ark. 2021).

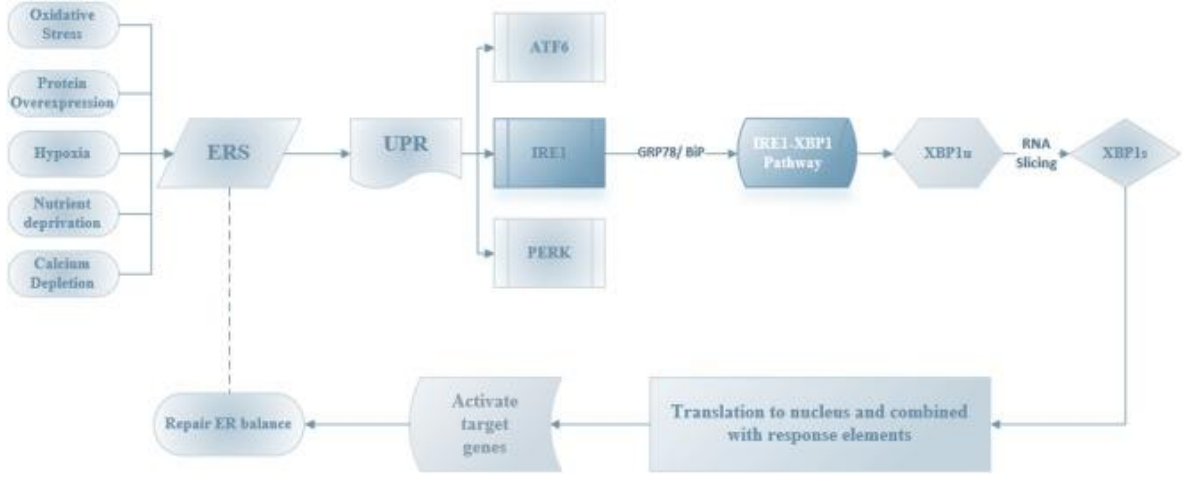
UPR ile ilişkili proteinler arasında, IRE1'in yalnızca hayvanlarda değil, bitkilerde ve *Saccharomyces cerevisiae* mayasında da bulunduğu için evrimsel olarak en korunmuş olduğu söylenir. Son çalışmalar, IRE1'i ER stres koşullarında hücre sağkalımı için pozitif bir düzenleyici yerine hücre kaderinin belirlenmesinde ana düzenleyici olarak tanımlamıştır. Yeni IRE1 bağımlı düzenleyici olayların keşfi, protein katlanma durumunun yanı sıra, hücre içindeki hücresel homeostazın sürdürülmesi için gerekli görüldüklerini göstermektedir (Siwecka ve ark. 2021).

### **2.2.9. XBP-1**

X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1), endoplazmik retikulumda homeostazın bozulması ve katlanmamış protein yanıtının aktivasyonu üzerine alternatif bir ekleme yanıtı tarafından kontrol edilen bir transkripsiyon faktörüdür. XBP1, ilk olarak B hücrelerinde majör histoyuymulluk kompleksi (MHC) sınıf II gen ekspresyonunun anahtar düzenleyicisi olarak ayırt edilmiştir. XBP1, UPR'nin en önde gelen korunmuş sinyal bileşeni ile iletişim kurar ve ER stresine yanıt olarak hücre kaderinin belirlenmesi için gereklidir. XBP1, önemli bir transkripsiyonel faktör olarak çalışır ve bağışıklık işlevi sergiler (Chen ve ark. 2020).

1990'ların başında, XBP1 ilk olarak klonlama yoluyla keşfedildi; insan MHC sınıf II gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan bZIP transkripsiyon faktörü olarak karakterize edildi. Yaklaşık on yıl sonra, birkaç rapor, XBP1'in IRE1 $\alpha$ 'nın aşağı yolunda olduğunu ve UPR'de hem omurgasız hem de omurgalı organizmalarda bulunan ve stres uyaranlarına yanıt olarak hücrenin hayatta kalması için önemli bir anahtar transkripsiyon faktörü olduğunu gösterdi. UPR'nin IRE1 $\alpha$ -XBP1 dalı, en yüksek oranda korunan ER stres (ERS) yoludur (Şekil 2.20.) (Chen ve ark. 2020).





**Şekil 2.20.** ER'nin UPR'sindeki XBP1 sinyal yolunun şematik diyagramı (Chen ve ark. 2020).

Protein aşırı ekspresyonu, oksidatif stres, besin yoksunluğu, kalsiyum tükenmesi ve hipoksi gibi çeşitli ER stresleri, 3 sensörü etkinleştiren UPR'yi tetikler: ER şaperonlarının GRP78/BiP'e bağlanmasına, ATF6, PERK, IRE1 ve XBP1 aktivasyonuna yol açar. XBP1u mRNA, çekirdeğe yer değiştiren ve ERS yanıtından etkilenen proteinleri onarmak için hedef genlerin transkripsiyonunu destekleyen aktif XBP1'lere eklenir (Chen ve ark. 2020).

IRE1, XBP1 mRNA'sından 26 nükleotid intronları birleştirerek XBP1 aktivasyonuna yol açar. ER stresi altında UPR sırasında uyarılan C-terminal endoribonükleaz alanının alternatif eklenmesi, mRNA'yı aktif olmayan "eklenmemiş" XBP1 u'dan aktif "eklenmiş" XBP1'lere dönüştürür. Bazal seviyelerde çekirdekte bulunan alternatif XBP1 mRNA izoformları vardır, ancak XBP1 mRNA'nın akut ER stresi ile indüklenen alternatif eklenmesinin esas olarak sitoplazmada meydana geldiği belirtilmiştir. Aşırı aktif IRE1 $\alpha$ , XBP1 mRNA eklenmesine müdahale etmenin yanı sıra, XBP1 yetersizliği ile aktive olan bir geri besleme mekanizması yoluyla sitozolik mRNA'ların kontrollü IRE1'e bağlı bozunmasını (RIDD) başlatır. RIDD daha sonra, bir ER alt kümesini kodlayan mRNA'ların veya yanlış katlanmaya meyilli salgı proteinlerinin bozulması ve lipid metabolizması genlerinin ve yağ asidi taşıma proteinlerinin düzenlenmesi dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreci yönetir (Chen ve ark. 2020).

### 2.2.10. ATF6'nın etkinleşmesi ve işlevi

ATF-6 bir transkripsiyon faktörü ve aynı zamanda bir diğer ER stres algılayıcısıdır. “Activating transcription factor 6” sözcüklerinden türetilmiştir. ER stresine yol açan bir sebep olmadığında ATF6, ER zarında Grp78'e bağlı olarak etkisiz bir şekilde bekler. Hatalı katlanan bir proteinin hidrofobik yüzeyi ortaya çıktığında işler değişir. Grp78 yanlış katlanmış bu hidrofobik kısmın çekim gücüne dayanamaz ve ATF6'dan ayrılır. Bir transmembran transkripsiyon faktörü olan ATF6, Golgi aygıtına taşınır ve S1P ve S2P gibi proteazlar tarafından bölünür, bu da ER şaperon genlerinin transkripsiyonunun artmasına yol açar (Yoshida 2007).

ATF6, Golgi aygıtındaki bölünmeden sonra, hücre koruyucu genleri aktive etmek için çekirdeğe girer. Aynı zamanda, hayatta kalma etkisini arttırmak için daha sonra IRE1 $\alpha$  tarafından eklenen XBP1 mRNA'yı da up-regüle eder (Siwecka ve ark. 2021).

ATF6 $\alpha$  ve ATF6 $\beta$ , transkripsiyon faktörlerinin temel lösün fermuarı (bZIP) ailesine ait ER stres transdüserleridir. Strese yanıt olarak ATF6, Golgi'ye taşınır ve burada ER luminal bölgesinde site-1 proteazları (S1P) ve Golgi bilayerini kapsayan bölgedeki site-2 proteazları (S2P) ile işlenir. Bu daha sonra çekirdeğe yerleşen ve hedef genlerde ER stres yanıtı elemanlarına (ERSE) bağlanan bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gören bir sitosolik fragmanı serbest bırakır. ER lümeni içindeki strese yanıt olarak BiP'in ATF6 $\alpha$ 'dan ayrılmasının, protein içinde bir Golgi-lokalizasyon sinyali maskesini çıkarması, COPII ile reaksiyona girmesi ve Golgi'ye taşınması önerilmektedir (Storm ve ark. 2016).

Golgi'ye taşınan 90 kDa'luk ATF6, bu organelde S1P ve S2P enzimleri tarafından kesilir ve asıl transkripsiyon faktörü olan 50 kDa'luk parçaya ayrılır. 50 kDa'luk parça, ER stresini giderebilecek, ERSE-UPRE (ER stress response element-Unfolding Protein response element) gibi genlerin ön kısmında bulunan “promoter” bölgelerine bağlanır. Bu sayede şaperon üretiminin artırılması, daha fazla ERAD yapılması gibi, endoplazmik retikulumu zor durumdan kurtaracak önlemler alınır (Schroder ve Kaufman 2005).

### 2.2.11. Kontrol altına alınamayan ER stresi durumunda hücrelerin apoptoz kararı

Hücreler yüksek oranlarda ortaya çıkan katlanma hatalarıyla başa çıkamaz ise ölüm kararı alır. Hücreleri katlanma hatalarına karşı direnmeye ve sorunları çözmeye programlı PERK, ATF-6 ve IRE-1 gibi stres proteinleri, hücreyi ölüme hazırlar ve gerekirse de ölümün başlamasına yol açar. Daha önce detaylı şekilde anlatıldığı gibi, hatalı katlanmış protein düzeylerinin artmasıyla Grp78, yanlış katlanan proteinlerin açıkta kalan hidrofobik yüzeylerine yapışmak üzere, üzerlerine konumlandığı ATF6, PERK ve IRE-1 adlı sensör proteinlerden ayrılır ve onları yalnız bırakır. Böylelikle bu transmembran proteinler aktive olur (Yoshida 2007).

Kinaz aktivitesi gösteren uçlar birbirlerinin serin ve treonin adlı amino asitlerine ait –OH gruplarına fosfat gruplarını takarak fosforiller. Fosforillenen bu sitoplazmik uçlar TRAF2 (tumour necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor-2) adlı molekül için bir bağlanma yüzeyi görevi görür ve TRAF2 bu bölgelere bağlanır. Bu molekülün iki önemli görevi vardır. Hem JNK'ı hem de DR5 üzerinden apoptozu başlatan kaspaz adlı enzimleri (örneğin, kaspaz 12) aktive ederek hücrelerin programlı ölüm kararı almasını sağlar (Yoshida 2007).

Grp78'in ayrılması ile aktive olan PERK, hücrenin ER stresine karşı koyması için önemli bir ER stres proteini olan ATF4 gibi birkaç özel protein dışında hemen hemen bütün proteinlerin yapımının geçici olarak durmasına yol açar. PERK'in translasyonunu engelleyemediği proteinlerden biri de CHOP'dur. CHOP, hem ATF4'ün translasyonunu indükler, hem de hücrenin ölüme direnen Bcl2 adı verilen apoptotik ölümü engelleyen proteinin yapılmasını önler. Bunlara ek olarak CHOP, ölümü hızlandıran mitokondrilerin sitokrom c sızıntısını ve ölümü başlatan kaspaz 3 adlı enzimin etkinleşmesini sağlar (Yoshida 2007).

## 2.2.12. ER stresine neden olan kimyasallar

Tunikamisin, tapsigargin ve ditiyotreitol gibi kimyasallar genellikle deneysel amaçlarla kültürlenmiş hücrelerde veya hayvanlarda ER stresini uyarmak için kullanılır (Yoshida 2007).

İlk ER stresör grubu, glikosilasyon inhibitörlerini içerir. ER'de sentezlenen proteinlerin çoğu, N-glikosillenmiştir ve N-glikosilasyon, protein katlanması için genellikle gereklidir. Bu nedenle, N-glikosilasyonu bozan kimyasallar, ER stresini indüklemeye potansiyeline sahiptir. Tunikamisin, *Streptomyces lysosuperificus* tarafından üretilen ve UDP-GlcNAc-dolikal fosfat GlcNAc-fosfat transferaz aktivitesini önleyerek N-glikosilasyonunu inhibe eden bir antibiyotiktir. 2-Deoksi-d-glukoz ayrıca N-glikosilasyonu inhibe etmek için kullanılır, ancak tunikamisine göre daha az etkilidir. Başka bir ER stresör sınıfı,  $Ca^{+2}$  metabolizması bozuculardır. ER'deki  $Ca^{+2}$  iyonu konsantrasyonu yüksek bir seviyede tutulduğundan ve BiP gibi ER şaperonları  $Ca^{+2}$  iyonlarına ihtiyaç duyduğundan, ER'deki  $Ca^{+2}$  metabolizmasını bozan kimyasallar ER stresini indükler. A23187 gibi  $Ca^{+2}$  iyonoforları ve  $Ca^{+2}$  pompa inhibitörü, tapsigargin, sıklıkla ER stresini uyandırmak için kullanılır. Üçüncü ER stresör kategorisi indirgeyici maddelerdir. ER'nin lümeni oldukça oksidatif olduğundan, burada sentezlenen proteinler, sistein kalıntıları arasında moleküller arası veya molekül içi disülfür bağları oluşturabilir. Disülfür bağlarının oluşumu salgı proteinlerinin katlanması için önemli olduğundan, disülfür bağlarını bozan indirgeme maddeleri ER stresini uyandırır. Dithiothreitol ve 2-merkaptoetanol bu amaçla sıklıkla kullanılır. Altta yatan mekanizma bilinmemekle birlikte, hipoksinin de ER stresini indüklediği bilinmektedir. Hipoksinin neden olduğu glikoz konsantrasyonundaki bir azalmanın (çünkü hipoksi, ATP üretimini sürdürmek için glikolitik enzimleri indükler ve daha sonra hücreler glikoz tüketir) N-glikosilasyonunu inhibe ederek ER stresine yol açar (Yoshida 2007).

### 2.2.13. Çalışma kapsamında araştırılacak ER stresi ile ilişkili genler

Bu çalışma kapsamında LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması yapılarak 14 adet genin ekspresyon seviyesindeki değişimler gözlenmiş ve *TBP* geni referans gen olarak kullanılmıştır. Bu genler;

- ***ATF4***; Protein kodlayıcı bir gendir. cAMP yanıt elemanını (CRE) bağlayan ve hem normal metabolik ve redoks işlemlerinin düzenleyicisi olarak hem de entegre stres tepkisi (ISR) sırasında bir ana transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır. Bir heterodimer olarak asimetrik CRE'lere ve bir homodimer olarak palindromik CRE'lere bağlanır. Endoplazmik retikulum stresi, amino asit açlığı, mitokondriyal stres veya oksidatif stres gibi çeşitli streslere uyum için gerekli olan ISR'nin çekirdek efektörüdür. ISR sırasında, ATF4 proteini, stresin neden olduğu eIF-2- $\alpha$ /EIF2S1 fosforilasyonuna yanıt olarak çevrilir ve hücre iyileşmesini desteklemek için strese duyarlı genlerin ana transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Amino asit yeterliliği ve oksidatif strese karşı dirençle bağlantılı genlerin ekspresyonunu teşvik ederek hücreleri ER oksidasyonunun metabolik sonuçlarına karşı korur. Amino asit yoksunluğu veya ER stresine yanıt olarak DDIT3/CHOP indüksiyonunu düzenler. DDIT3/CHOP ile birlikte, hücrel amino asit metabolik süreçlerinde yer alan genlerin ekspresyonunu, mRNA translasyonunu ve ER stresine yanıt olarak katlanmamış protein yanıtını teşvik ederek ER aracılı hücre ölümüne aracılık eder. Mitokondriyal strese yanıt olarak hücre iyileşmesini desteklemek için gereken genlerin ekspresyonunu etkinleştirir (Genecards 2021).
- ***ATF6***; Bir ER stres algılayıcısı transkripsiyon faktörüdür. Bu gen, ER stresi sırasında UPR için hedef genleri aktive eden bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bir transkripsiyon faktörü olmasına rağmen, bu protein, ER'ye gömülü bir transmembran proteini olarak sentezlendiğinden olağandışıdır. Bir ER stres sensörü/dönüştürücü olarak işlev görür ve ER stresinin neden olduğu proteolizi takiben, ER şaperonlarını kodlayan genlerin promotörlerinde bulunan cis-etkili bir ERSE aracılığıyla bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Bu protein, hareketsiz fakat proliferatif olmayan skuamöz karsinom hücreleri için bir hayatta kalma faktörü olarak tanımlanmıştır. Farklı popülasyonlarda bu gendeki polimorfizmlerin diyabet ile ilişkisi hakkında çelişkili raporlar vardır, ancak başka

bir polimorfizm, artan plazma kolesterol seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (GeneCards 2021).

- ***XBPI***; Bu gen X-box olarak adlandırılan bir promotör elemente bağlanarak MHC sınıf II genlerini düzenleyen bir transkripsiyon faktörünü kodlar. ER'de katlanmamış proteinlerin birikmesi üzerine, bu genin mRNA'sının, endonükleaz IRE1'in aracılık ettiği geleneksel olmayan bir ekleme mekanizması tarafından aktif bir forma işlendiği bulunmuştur. Eklenen mRNA'dan elde edilen 26 nt'lik kayıp, bir çerçeve kaymasına ve fonksiyonel olarak aktif transkripsiyon faktörü olan bir XBP1(S) izoformuna neden olur. Eklenmemiş mRNA, XBP1(U) tarafından kodlanan izoform, yapısal olarak eksprese edilir ve ER stresinin iyileşme fazı sırasında hedef genlerin transkripsiyonunu kapatan XBP1(S)'in negatif bir feedback düzenleyicisi olarak işlev gördüğü düşünülür. UPR'yi düzenleyerek ER stresi sırasında bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür (GeneCards 2021).
- ***DDIT3***; Endoplazmik retikulum stres yanıtında çok işlevli transkripsiyon faktörüdür. Çok çeşitli hücre streslerine yanıtta önemli bir rol oynar ve ER stresine yanıt olarak hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indükler (GeneCards 2021).
- ***DNAJB9***; Bu gen, J protein ailesinin bir üyesidir. J proteinleri, 70 kDa ısı şoku proteinlerinin ATPaz aktivitesini düzenleyerek birçok hücresel süreçte işlev görür. Bu gen, DnaJ proteinlerinin tip 2 alt grubunun bir üyesidir. Kodlanan protein, endoplazmik retikulumda lokalizedir. Bu protein endoplazmik retikulum stresi tarafından indüklenir ve stresli hücrelerin apoptozdan korunmasında rol oynar (GeneCards 2021).
- ***ERN1***; Transmembran protein kinaz inositol gerektiren enzim 1'i kodlar. Kodlanan protein, iki fonksiyonel katalitik alan, bir serin/treonin-protein kinaz alanı ve bir endoribonükleaz alanı içerir. Bu protein, endoplazmik retikulumda katlanmamış proteinlerin bir sensörü olarak işlev görür ve UPR olarak adlandırılan hücre içi sinyal yolunu tetikler. UPR, mayadan memelilere kadar korunan ve yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasında, protein sentezinin düzenlenmesinde ve moleküler şaperonların aktive edilmesinde rol oynayan genleri aktive eden bir ER stres yanıtıdır. Bu protein özellikle stres tepkisi

transkripsiyon faktörü X-box bağlayıcı protein 1'in eklenmesine ve aktivasyonuna aracılık eder (GeneCards 2021).

- **DNAJC10**; Bu gen, yanlış katlanmış proteinlerin tanınmasında ve parçalanmasında rol oynayan ERAD kompleksinin bir parçası olan bir endoplazmik retikulum yardımcı şaperonunu kodlar. Kodlanmış protein, yanlış katlanmış glikoproteinlerdeki yanlış disülfid bağlarını azaltır. Endoplazmik retikulum disülfid redüktaz, hem proteinlerin doğru katlanmasında hem de yanlış katlanmış proteinlerin bozulmasında rol oynar. LDLR gibi proteinlerin katlanması sırasında oluşan doğal olmayan disülfid bağlarının çıkarılmasını katalize ederek endoplazmik retikulumda proteinlerin verimli bir şekilde katlanması için gereklidir. Ayrıca, EDEM1 tarafından tanınan yanlış katlanmış glikoproteinlerdeki yanlış disülfid bağlarını azaltarak ERAD'da yer alır. Endoplazmik retikulum stresine yanıt olarak apoptotik sinyal yolunu destekler (GeneCards 2021).
- **EIF2AK3**; Çeşitli stres koşullarına yanıt olarak ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2'nin (EIF2S1/eIF-2- $\alpha$ ) alfa alt birimini fosforile eden metabolik stres algılayıcı protein kinazdır. UPR ve düşük amino asit mevcudiyeti gibi çeşitli streslere uyum için gerekli entegre stres yanıtının temel aktivatörüdür. Bu gen tarafından kodlanan protein, ökaryotik translasyon-başlatma faktörü 2'nin alfa alt birimini fosforile ederek, onun inaktivasyonuna ve dolayısıyla translasyon başlatmasının hızlı bir şekilde azalmasına ve global protein sentezinin baskılanmasına yol açar. PKR benzeri ER kinazı (PERK, EIF2AK3), protein translasyonunu engelleyen bir eIF2 $\alpha$  kinazdır (GeneCards 2021).
- **SVIP**; SVIP literatürde ilk tanımlanan endojen ERAD inhibitörü proteindir ve ERAD aktivitesini negatif yönde regüle eden önemli bir eleman olarak çalışmaktadır (Ballar ve ark. 2007). ERAD, endoplazmik retikulumdaki yanlış katlanmış proteinlerin bozunma için proteazoma hedeflendiği yoldur. Bu işlemi tamamlamak için ERAD sırasında birden fazla özel protein birbiriyle etkileşime girer. *SVIP* geni bir protein kodlama genidir. Bu gen tarafından kodlanan protein, bu protein bileşenlerinin etkileşimini bozma işlevi gören bir ERAD inhibitörüdür. ERAD'in bu down regülasyonu, hücreyi aşırı aktif protein degradasyonundan korumak için gerekli olabilir. (GeneCards 2021).

- **VCP**; P97/VCP geni ATPase protein ailesinin bir üyesini kodlar. Kodlanan protein, protein yıkımı, hücre içi membran füzyonu, DNA onarımı ve replikasyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve NF-kappa-B yolunun aktivasyonunda rol oynar. Ana işlevi protein moleküllerini, organel membranları ve kromatin gibi büyük hücresel yapılardan ayırmak ve böylece çoklu alt-birim proteazom tarafından salınan polipeptitlerin bozulmasını kolaylaştırmaktır (GeneCards 2021).
- **SYVN**; Ubikitini spesifik olarak endoplazmik retikulum ile ilişkili UBC7 E2 ligazından kabul eden ve substratlara aktararak bozunmalarını destekleyen E3 ubiquitin-protein ligazdır. Bu gen, ERAD'da yer alan bir proteini kodlar. Kodlanmış protein, ER stresi sırasında biriken katlanmamış proteinleri ER'den sitozole retrograd taşıma yoluyla uzaklaştırır. Bu protein aynı zamanda katlanmamış proteinlerin ilave bozunması için ubiquitin-proteazom sistemini kullanır (GeneCards 2021).
- **UFDI**; Ubikitin füzyon proteinlerini parçalayan ubiquitin bağımlı proteolitik yolun temel bileşenidir. Bu gen tarafından kodlanan protein, nükleer protein lokalizasyonu-4 ve valosin içeren protein ile bir kompleks oluşturur ve bu kompleks, ubiquitinlenmiş proteinlerin parçalanması için gereklidir. Yanlış katlanmış proteinlerin ER'den proteazom tarafından parçalandıkları sitoplazmaya aktarılması için gereklidir (GeneCards 2021).
- **AMFR**; Bu lokus, glikosile edilmiş bir transmembran reseptörünü kodlar. Ligandı, otokrin motilite faktörü, tümör hücreleri tarafından salgılanan bir tümör motilite uyarıcı proteindir. Kodlanmış reseptör aynı zamanda E3 ubiquitin ligaz protein ailesinin bir üyesidir. ERAD'ın son aşamasına katılan bir VCP/p97-AMFR/gp78 kompleksinin bileşenidir. Spesifik proteinlerin ubiquitinasyonu ve endoplazmik retikulum ile ilişkili yıkımını katalize eder (GeneCards 2021).
- **HSPA5**; Bu gen tarafından kodlanan protein, ısı şoku proteini 70 (HSP70) ailesinin bir üyesidir. Bu protein endoplazmik retikulumun lümeninde lokalize olur ve burada ER'de proteinlerin katlanması ve birleştirilmesinde yer alan tipik bir HSP70 şaperon olarak çalışır ve ER homeostazının ana düzenleyicisidir. Hücrel stres sırasında, viral enfeksiyon veya tümörögenез sırasında olduğu gibi, bu protein transmembran stres sensör proteinleri PERK, IRE1 ve ATF6 ile



etkileşime girer. Katlanmamış protein yanıtının bir baskılayıcısı olarak görev yapar ve ayrıca hücrel apoptoz ve yaşlanmada rol oynar (GeneCards 2021).

- **TBP**; RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonun başlatılması, 70'den fazla polipeptidin aktivitelerini gerektirir. Bu aktiviteleri koordine eden protein, polimerazı düzgün şekilde konumlandırmak için çekirdek promotöre bağlanan, transkripsiyon kompleksinin geri kalanının montajı için iskele görevi gören ve düzenleyici sinyaller için bir kanal görevi gören transkripsiyon faktörü IID'dir (TFIID). TFIID, TATA bağlayıcı proteinden (TBP) ve TBP ile ilişkili faktörler veya TAF'ler olarak bilinen bir grup evrimsel olarak korunmuş proteinden oluşur. Bu gen, TATA bağlayıcı protein olan TBP'yi kodlar. TBP'nin ayırt edici bir özelliği, N-terminalindeki uzun bir glutamin dizisidir. Proteinin bu bölgesi, C terminalinin DNA bağlanma aktivitesini modüle eder ve DNA bağlanmasının modülasyonu, transkripsiyon kompleksi oluşum hızını ve transkripsiyonun başlamasını etkiler (GeneCards 2021).

### 2.3. Bor Elementi

Bor, çeşitli yapısal ve fonksiyonel rollerle biyokimyasal yolları destekleyen, hayvanlar ve insanlar için gerekli bir element ve yararlı bir biyoaktif gıda maddesidir (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020). Bor, okyanuslarda, tortul kayalarda, kömürde ve bazı topraklarda boratlar şeklinde bulunan doğal olarak oluşan bir elementtir. En önemli ticari borat ürünleri ve mineralleri boraks pentahidrat, boraks, sodyum perborat, borik asit, kolemanit ve üleksittir (WHO 1998). Yüksek seviyede bor bulunan bölgede yaşayanların (bor yatakları etrafı), bor bileşenlerine çevre, gıda ve içecek yoluyla maruz kaldıkları bilinmektedir (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020).

İnsan organizmasına alınan bor ve türevleri vücut sıvılarında %96 oranında borik asit ( $B(OH)_2$ ) olarak temsil edilir (Korkmaz ve ark. 2007, Bakirdere ve ark. 2010, Nielsen ve Meacham 2011). Organizmada birçok önemli göreve sahip olan bor, insanlar için iz elementi olarak kabul edilir (Bradke ve ark. 2008, Nielsen ve Meacham 2011). İnsan vücudunda enzim aktivitesini düzenleyen bor, bunların yanında insülin metabolizmasında ve bağışıklık sisteminde de önemli görevlere sahiptir. Magnezyum, vitamin D ve

kalsiyum metabolizmasıyla ilişkili olan bor, kemik yapısını da korumaktadır (Korkmaz 2011, Duydu ve ark. 2011). Yapılan çalışmalarda yüksek miktarda bora maruz kalan erkeklerde prostat kanseri riskinde azalma gözlenmiştir. Sudaki bor oranının yükselmesiyle prostat kanseri riskinin ve ölüm oranlarının azaldığı literatürde yer almaktadır. (Müezzinoğlu ve ark. 2011).

Borik asitin DU145 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Barranco ve Eckhert 2004). Bununla birlikte Henderson ve arkadaşları cADPR (cyclic ADP ribose)'i BA'in moleküler hedefi olarak tanımlamışlar ve fizyolojik seviyedeki BA miktarının ER luminal  $Ca^{+2}$  seviyesini azalttığını göstermişlerdir. Yüksek  $Ca^{+2}$  seviyeleri ER'da protein katlanması için gerekli olan bir durum iken, düşük ER  $Ca^{+2}$  seviyesi katlanmamış ya da hatalı katlanmış proteinlerin birikimine yol açarak ER stresini tetiklemektedir (Henderson ve ark. 2014). Düşük  $Ca^{+2}$  seviyeleri PERK'i aktive etmekte, PERK ise protein sentezinin başlamasının en önemli regülatörü olan eIF2 $\alpha$ 'ı fosforile etmektedir. eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu ise hücrelerin strese nasıl yanıt vereceğine karar vermektedir. Orta seviyelerdeki fosforilasyon translasyonu kısa bir süreliğine durdurarak hatalı proteinlerin yeniden düzenlenmesine yol açarken, güçlü seviyedeki fosforilasyon apoptozu tetiklemektedir (Yamada ve Echert 2019).

### **2.3.1. Kullanım alanları**

Ekonomik borat yatakları enderdir ve Türkiye, ABD, Arjantin, Şili, Rusya, Çin ve Peru'nun kurak bölgelerinde görülür. Boraksın başlıca kullanım alanları arasındayalıtım ve tekstil sınıfı cam elyafı, çamaşır ağartıcı (sodyum perborat), borosilikat cam, yangın geciktiriciler, tarımsal gübreler ve herbisitler (iz elementi olarak) ve seramik sırlar gibi çeşitli uygulamalar bulunur (WHO 1998).

### **2.3.2. Bor çevreye nasıl ve nereden gelir?**

Bor çevreye esas olarak kayaların ayrışması, deniz suyundan borik asit buharlaşması ve volkanik aktivite yoluyla girer. Bor ayrıca antropojenik kaynaklardan daha az oranda salınır. Antropojenik kaynaklar arasında tarım, atık ve yakacak odun yakma, kömür ve yağ kullanarak enerji üretimi, cam ve ürün imalatı, evde ve endüstride borat/perboratların

kullanımı, borat madenciliği/işleme, işlenmiş odun/kağıdın süzülmesi ve kanalizasyon/çamur bertarafı yer alır (WHO 1998).

Bor atmosferde önemli miktarlarda bulunmaz, ancak herhangi bir zamanda atmosferde bulunan toplam miktar, atmosferin büyük hacmi nedeniyle önemlidir. Suda çözünürlüklerine bağlı olarak, boratların atmosferde önemli bir dereceye kadar kalması beklenmez (WHO 1998).

Bor, ayrıştırma süreçleri yoluyla ve çok daha küçük ölçüde, kanalizasyon deşarjları gibi antropojenik deşarjlar yoluyla suya ve toprak suyuna salınabilir. Adsorpsiyon desorpsiyon reaksiyonlarının, sudaki borun kaderini etkileyen tek önemli mekanizma olması beklenmektedir. Bor, toprak türüne, pH'a, tuzluluğa, organik madde içeriğine, demir ve alüminyum oksit içeriğine, demir ve alüminyumhidro içeriğine ve kil içeriğine bağlı olarak adsorpsiyon derecesi ile toprak partiküllerine adsorbe edilir (WHO 1998).

### **2.3.3. Borun insanlara etkisi**

Borun insan vücuduna yiyecek ve içeceklerle ağız yoluyla, tozlarla solunum yoluyla, krem ve ilaçların kullanımı aracılığıyla deri yoluyla girdiği bilinmektedir. Ancak vücuda nasıl girerse girsin, yaklaşık %90-95'i vücutta birikmez ve hemen idrar yoluyla vücuttan dışarı atılır. Yalnızca kemik, tırnak ve kıllarla, karaciğer ve dalak gibi organlarda biriktiği söylenebilir (Şaylı 2000).

Borun toksik etkisinin çok düşük olduğu yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır. Borun akut etkisi 15-30 g boraks ya da 2-5 g borik asit doğrudan alındığında ortaya çıkmaktadır. Kronik etkisi açısından günde 3 g borik asit ya da 5 g boraksın etkisinin olmadığı, 5-10 g boraksın protein metabolizmasını etkilediği ve idrardaki azot miktarını yükselttiği bulgulanmıştır (Moseman 1994).

Bor içeren gıdaların kemik erimesini engellemede rol oynadığı yapılan araştırmalar neticesinde kanıtlanmıştır. Yüksek kemik erimesi riski olan 48-82 yaşlarındaki kadınlar üzerinde yapılan araştırma ile borun Ca ve Mg metabolizmasını artırarak östrojenik katkı

sağladığı belirlenmiştir (Nielsen ve Schuler 1992). Bunun yanı sıra erkeklerde testesteron seviyesini yükselterek kas doku miktarında artışa sebebiyet verdiği bulgulanmıştır (Nielsen ve ark. 1987). Borun bazı kanser türlerine karşı da koruma etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Korkmaz ve ark. 2007).

#### **2.3.4. Borun prostat kanseri, ER stresi ile ilişkisi ve mekanizması**

Günümüzde, doğal bileşikler düşük yan etkileri nedeniyle kanser tedavisi için tercih edilen kaynaklardır. Bor ve bor bileşikleri bu kaynaklardan en önemlileridir. Prostat, meme, serviks, akciğer kanserleri ve melanoma bor bileşiklerinden en çok etkilenen kanser tipleri arasındadır. Bor düşük toksisiteye sahiptir ve vücutta birikmez. Bu nedenle çekici bir kanser tedavisi ajanı sayılır. Ancak mekanizması henüz tam olarak anlayamadığı için potansiyel kullanımını engellemektedir (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020).

Bor ile ilgili yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, borik asidin (BA) hidroksil gruplarına gösterdiği ilgiden dolayı borun biyolojik etkilerinin çok çeşitli olduğunu ortaya koymuştur. Artan araştırma ve bulgular, borun, bazı hayvanların yaşam döngülerini tamamlamaları için gerekli olduğunu ve hayvan hücrelerinin gelişiminde ve yenilenmesinde ise önemli görevler üstlendiğini göstermiştir. İnsan ve hayvanlarda borun, embriyo gelişimi, enerji substrat metabolizması, mineral metabolizması, hormon metabolizması, kemik yapısı ve fonksiyonu, enflamatuvar yanıt ve diğer fizyolojik fonksiyonlar üzerinde önemli düzenleyici roller üstlendiği kanıtlanmıştır (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020). Çeşitli çalışmalarda, farklı kanser türleri üzerinde bor bileşiklerinin anti-proliferatif etkisine dair de güçlü veriler toplanmıştır (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020). İnsan prostat hücreleri, BA'nın moleküler hücre biyolojisini araştırmak için bir model olarak geliştirilmiştir; epidemiyolojik kanıtlar, borun prostat kanseri riski azalması ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Kobylewski ve ark. 2016). Barranco ve Eckhert'in ilk çalışmaları, borik asitin DU145 prostat kanseri hücre hattının büyümesini tamamen inhibe ettiğini göstermiştir (Barranco ve Eckhert 2004). Daha sonra Carper ve ark.'ları 1mM borik asitin DU145 hücrelerinin büyümesini belirgin bir biçimde ve LNCaP hücrelerinin büyümesini ise kısmen inhibe ettiğini

gözlemlemişlerdir. 2004 yılında yapılan çalışmada proliferasyon inhibisyonu için LNCaP hücrelerinde DU145 hücrelerine göre 4 kat daha fazla borik asit konsantrasyonuna ihtiyaç olduğu ve dolayısıyla anti-proliferatif etkide hücresel mekanizmaların da önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte kandaki yüksek BA miktarının intrasellüler  $Ca^{+2}$  sinyalini ve depolanmasını azaltarak prostat kanseri riskini düşürdüğü düşünülmektedir (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020).

Plazma zarındaki çok işlevli bir enzim olan CD38, hücre dışı NAD'yi riyanodin reseptör kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) kanalının bilinen tek agonisti olan siklik ADP ribozuna (cADPR) dönüştürür. BA'nın bir moleküler hedefi olarak cADPR tespit edilmiştir ve fizyolojik BA seviyelerinin, saniyeler içinde tedavi edilebilmesi için cADPR ile aktive olan ER  $Ca^{+2}$  salımını inhibe ettiği ve ER  $Ca^{+2}$  konsantrasyonlarını azalttığı gösterilmiştir (Henderson ve ark. 2014).

Endoplazmik retikulumdaki yüksek [ $Ca^{+2}$ ], protein katlanması için son derece önemlidir. Bu hızlı  $Ca^{+2}$  sinyalizasyonu endoplazmik retikulum (100-500 mikrom) ve sitoplazma (20-100 nM) arasında dik bir geçiş sağlamaktadır. Bir bitki seskiterpen lakton olan tapsigargin uygulaması, ATP'ye bağlı ER  $Ca^{+2}$  pompasını (SERCA) inhibe eder ve böylelikle endoplazmik retikulumdaki [ $Ca^{+2}$ ] miktarı düşer. Bunun sonucu olarak yanlış katlanmış veya katlanamamış proteinler birikir. Katlanmamış proteinler, GRP78/BiP'e sınımsız tutunmaktadır. GRP78/BiP'in salınmasıyla PERK, eIF2 $\alpha$ 'nın serin 51 artığını dimerize edip fosforiller. Toksik olmayan BA düzeylerinin, memelilerde eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonunu aktive ettiği bildirilmiştir. eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonu, hücresel homeostazi koruyan hafif ER stresinde, entegre stres tepkisine (ISR) aracılık eder (Henderson ve ark. 2014). 2014 yılında Henderson ve ark. tarafından DU-145 prostat kanseri hücrelerinin fizyolojik BA konsantrasyonları ile tedavisinin, ER genişlemesi, sitoplazmik stres granüllerinin oluşumu ve eIF2 $\alpha$ , GRP78/BiP ve ATF4'ün hafif aktivasyonu ile ER stresine neden olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak; BA, eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonunu ve sitozolik stres granüllerinin oluşumunu başlatır. Hücreler, yeni koşullara uyum sağlamak için translasyonu yeniden programlayarak çevrelerindeki değişime tepki verirler. eIF2 $\alpha$ , translasyon ve protein sentezini başlatmak için başlatıcı metiyonini mRNA'nın ilk kodonuna yerleştiren büyük üçlü kompleks, eIF2-GTP-tRNAi

Met'in düzenleyici altbirimidir. eIF2 $\alpha$ 'nın serin 51 üzerindeki fosforilasyonu, kompleks oluşumunu inhibe eder, böylece global translasyonu inhibe eder ve böylece hücreler ER stresinden kurtulur. 50  $\mu$ M BA ile DU-145 hücrelerinin tedavisinden sonra eIF2 $\alpha$ 'nın 1-3 saat içinde fosforilasyonunda bir artış gözlemlenmiştir (Henderson ve ark. 2014).

Kanser tedavisinde yaygın şekilde kullanılan kemoterapi ilaçlarının ciddi yan etkileri, yüksek maliyeti ve düşük etkinliği, yeni ve alternatif terapilerin geliştirilmesi gerekliliğini göstermektedir. Yeni koruyucu ilaç tedavilerinin geliştirilmesi ve mevcut yan etkilerin azaltılması, kanser tedavisi ve sağlıklı hücrelerin korunması için çok önemlidir. Bununla birlikte, kanser hastalıklarından korunmak için DNA'yı koruyan ve hücrel stresini azaltan ajanlar kullanılmalıdır. Bu bağlamda, hayvanlar ve insanlar için olası temel elementler olarak kabul edilen bor ya da bor bileşikleri üzerine çalışmalar derinleşmektedir. Borik asit, boratlar, borat esterler anti-karsinojen etkileri olan bor bileşikleridir ve bunlar arasında borik asit en çok çalışılan bileşiktir. Bor bileşiklerinin anti-kanser aktivitesinin altında yatan mekanizma, serin proteazlar gibi birçok enzimatik sürecin inhibisyonunu, mRNA modifikasyonunu, nükleer reseptör bağlanma taklidini, hücre bölünmesi inhibisyonunu, apoptozun indüklenmesini, anti-oksidan ve anti-inflamatuar gibi etkileri içermektedir. Bununla birlikte, yakın zamanda yapılan çalışmalarla, bor ve bor bileşiklerinin DNA hasarı üzerinde koruyucu etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, borun düşük toksisiteye sahip olması ve vücutta birikmemesi dolayısıyla, bor çekici bir kanser tedavi ajanı olarak öngörülmektedir (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020).

Bu nedenle yakın gelecekte bor bileşiklerinin kanser başta olmak üzere birçok hastalığın patogenezi ile ilgili hücrel süreçleri etkileyebilmeleri nedeniyle koruyucu ve/veya tedavi edici amaçlarla kullanılması muhtemeldir. Ayrıca bireysel olarak uygun bor alımı miktarı belirlenerek DNA hasarı ve hücrel stres azaltılabilir, bu durumda hastalıklar önenebilir ve yeni tedaviler geliştirilebilir. Bu amaçla, borun biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarının daha detaylı açıklanması, bor ve bor bileşiklerinin kanser önleme ve tedavisindeki rolünün açıklanması daha önemli hale gelecektir (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü

Denemeler ATCC'den temin edilen 1 adet yüzeye bağımlı androjen-bağımlı prostat kanseri hücre hattı ile gerçekleştirildi;

- LNCaP (insan prostat karsinomu lenf nodu metastazı hücre hattı; CRL-1740TM)

##### 3.1.1. Materyal

- Sınıf II güvenlik kabini (Esco, Holanda)
- CO<sub>2</sub>'li inkübatör (Sanyo-MCO-18AIC, Japonya)
- Floresan ekli invörted ışık mikroskobu (Leica DMIL, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma- B6916, ABD)
- pH metre (Hanna- HI221, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Wisd-MSH20A, Almanya)
- 100x20 mm'lik kültür kapları (Greiner Bio-One CELLSTAR, Almanya)
- 60x15 mm hücre kültür kapları (Greiner Bio-One CELLSTAR, Almanya)
- 6 kuyucuklu kültür kapları (Greiner Bio-One CELLSTAR, Almanya)
- 2.5-5-10 ve 25 mL hacimli steril pipetler (Orange, İtalya)
- Pastör fırınında steril edilmiş pastör pipetleri
- 15 mL ve 50 mL'lik falkon tüpleri (Jet Biofil, İtalya)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µL otomatik pipetler (Brand-TransferpetteS, Amanya)
- Pipet uçları (VWR, ABD)
- Eppendorf tüpler (Greiner-Almanya)
- Hücre ortamı- RPMI 1640 (Gibco- 52400, ABD)
- Fötal dana serumu (FBS) (Gibco- 10270, ABD)
- Tripsin-EDTA (Gibco- 3103382, ABD)
- Aktif karbon (Merck, K34348983520)
- Penisilin/Streptomisin (Gibco- 15140, ABD)
- L-glutamin (Gibco- 25030, ABD)

- Sentetik androjen methyltrienolone (R1881, 17beta-hydroxy-17alphamethyl-estra-4,9,11-trien-3-one, Sigma, R0908)
- DMSO (Merck- K33960212-504, ABD)
- Hemositometre (Neubauer)
- % 0.4 Tripan mavisi solüsyonu (Sigma- T6146, ABD),
- Fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS)
  - 8 g NaCl (Sigma- S3014, ABD)
  - 0.2 g KCl (Merck-1049360250, ABD)
  - 1.57 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck- K22287176, ABD) ile dH<sub>2</sub>O içerisinde hazırlanarak 1M HCl ile pH 7.4'e ayarlandı.

### 3.1.2. Hücrelerin bakımı ve pasajlanması

Hücrelerin besin gereksinimlerini karşılamak amacıyla ortam olarak %5-10 FBS, % 1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 kullanıldı. Hücreler yüzeyi tamamen kapladığı zamana kadar rutin olarak beslendi. Bu işlem için yüzeye bağımlı hücrelerin ortamı pastör pipeti yardımıyla çekildi ve hücrelerin üzerine taze ortam eklenerek 2 günde bir ortam değiştirildi. Hücreler, 100 x 20 mm'lik veya 60 x 15 mm'lik hücre kültür kaplarında 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde büyütüldü. Hücreler tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıklarında pasajlandılar. Pasajlamalar şu şekilde gerçekleştirildi;

- Steril cam pastör pipetleri kullanarak vakum yardımıyla ortam uzaklaştırıldı.
- Kültür yüzeyi tripsin muamelesinin etkisini arttırmak için Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> içermeyen steril PBS ile bir kez yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 1-2 dakika hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi.
- Hücre yoğunluğuna uygun hacimde taze ortam hücreler üzerine ilave edildi ve hücreler pipet yardımıyla homojenize edildi.
- Homojenize edilen hücreler yeni kültür kabındaki ortamın üzerine yavaşça ilave edildi ve büyümeleri için 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre yerleştirildi.



### **3.1.3. Hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi**

In vitro kültürasyonlarda değerli hücre hatlarının korunabilmesi, pasaj sayısının ilerlemesine bağlı fenotipik ve genotipik değişimlerin önlenmesi ve ayrıca bu çalışmalar sırasında güvenli geriye dönebilme olasılığı nedeniyle hücre hatlarının kısa veya uzun süreli stoklanması gerekir. Hücrelerin saklanabilmesi için en uygun yöntem  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$  veya  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'in altında dondurma işlemidir. Dondurulan hücreler daha uzun süreler özelliklerinde değişim olmadan saklanabilir. Dondurma işlemi sırasında hücrenin organellerinin korunması için dimetilsülfoksit (DMSO) ya da gliserol gibi kriyoprotektan ajanlar kullanılmaktadır. Donmuş olarak saklanmış hücrelerden araştırma ya da üretim amacıyla yeni kültürler hazırlanabilir ancak çözündürme işlemi olabildiğince hızlı yapılmalıdır.

Hücreler pasajlandıktan sonra santrifüj edilerek elde edilen hücre pelleti %90 FBS ve %10 DMSO içeren hücre stok ortamı içerisinde süspansiyon edildi ve 1mL hacimde kriyotüplere aktararak  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuya kaldırıldı.

Çözündürülecek olan hücreler  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$  derin dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dk) bekletildi. Ardından hücre kültür kabındaki  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılmış 8 mL ortam üzerine dikkatlice pipetleme yaptıktan sonra ilave edildi.

### **3.1.4. Hücre sayımı**

Hücre süspansiyonunun yoğunluğunun belirlenmesi için hücre sayımı yapıldı. Hücreler pasajlanırken, yeni kültüre istenen miktarda hücre alabilmek amacıyla hemositometrede sayıldı. Sayım için hücre süspansiyonundan 10  $\mu\text{L}$  alınıp tripan mavisiyle 100  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandı. Karışım pipetle homojenize edildi. Hemositometre üzerine bir lamel koyuldu ve sayılacak hücre süspansiyonu bu ikisi arasına pipetle kenardan vererek yayıldı.

Hemositometre üzerinde yer alan 9 büyük kare içindeki hücre miktarı sayıldı. Mililitredeki hücre sayısını (hücre sayısı/mL) belirlemek için aşağıdaki formülden

yararlanıldı:

$$\text{Hücre sayısı} / \text{mL} = (\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oranı} (10) \times 10^4) / 9$$

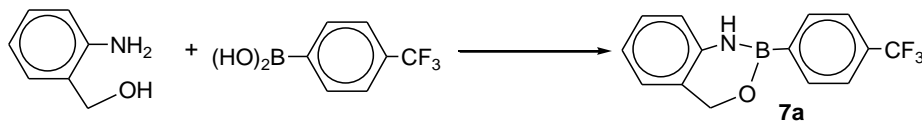
### 3.1.5. M7 bor bileşiğinin sentezi ve yapısı

Bor ve türevleri genel olarak suda çözünürlüğü yüksek olan bileşiklerdir. Bu durum ise hücre membranından geçişi bir miktar zorlaştırmakta ve bor bileşiklerinin etkinliğini azaltmaktadır (Greenhill-Hooper, 2012). Bu nedenle 113S700 no'lu Tübitak 1001 projesi kapsamında hücre membranından geçişi kolaylaştırmak amacıyla hem suda hem de yağda çözünebilecek ve borik asitten daha düşük konsantrasyonlarda etki gösterebilecek yeni bor bileşikleri sentezlendi. Bu çalışma kapsamında ise yeni sentez bor bileşiklerinden M7 olarak adlandırılan dietanolboranat bileşiği kullanıldı ve Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hayati Türkmen'den temin edildi.

M7 bileşiğinin sentezlenmesinde kullanılan yöntem şu şekildedir: İki boyunlu balona diethanol amin (1 mmol) ve üzerine aril boronik asit (1 mmol) koyuldu ve 20 mL Diklorometan(tolüen) eklenip karıştırılarak aril boronik asitin iyice çözünmesi sağlandı. Oda sıcaklığında 1 gün karıştırıldı. Reaksiyon sonunda çözelti bir miktar deriştirildi ve üzerine dietil eter eklenerek kristallendirildi.

Yeni sentezlenen bu bor bileşiğinin yapısının aydınlatılması elementel analiz,  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir ve sentezine ilişkin ayrıntılı bilgi aşağıda sunulmuştur.

#### Madde 7 (M7) sentezi



**Şekil 3.1.** Yeni sentez bor bileşiği M7'nin sentez yolu ve yapısı

NMR spektroskopisi verileri şu şekildedir:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  7.79 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H, Ph-CH), 7.24 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H, Ph-CH), 7.16 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1 H, Ar-CH),

7.00 (d,  $J=7.2$  Hz, 1 H, Ar-CH), 6.93 (t,  $J=7.2$  Hz, 1 H, Ar-CH), 6.74 (d,  $J=7.2$  Hz, 1 H, Ar-CH), 5.79 (s, 1 H, NH), 5.24 (s, 2 H, Ar-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  151.2, 138.6, 134.4, 128.2, 124.9, 122.5, 121.7, 121.4, 120.0, 119.2, 115.4, 64.8. Anal. Hes. C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>BF<sub>3</sub>NO (M = 277.05); Teorik: C, 60.69; H, 4.00; N, 5.06; Bulunan: C, 60.71; H, 4.16; N, 5.11.

### **3.1.6. Serum yoksunluğu ve madde (M7, androjen (R1881) ve ER stres ajanları) uygulamaları**

Öncelikle aktif karbon ile muamele edilmiş fetal dana serumu (CT-FBS; charcoal treated-FBS) hazırlandı: Fetal dana serumu içerisine %3 oranında aktif karbon ilave edildi. Gece boyu +4 °C’de karıştırılarak inkübe edildi. Süpernatant tamamen berraklaşana dek birkaç kez 4 °C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 2 defa filtrelenerek -20 °C’ye kaldırıldı.

Hormon deprivasyon örneklerini hazırlamak için LNCaP hücrelerini androjen uygulamasından önce büyüme faktörlerinden yoksun bırakmak amacıyla hücreler aktif karbon ile muamele edilmiş FBS içeren RPMI ortamı içerisinde büyütüldü. Pasajlamadan 48 saat sonra hücreler bir kez PBS ile yıkanarak %2’ lik CT-FBS ortamına alındı. 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından hücreler %0,5 CT-FBS ortamına alınarak 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Son olarak hücrelere 48 saatlik 200 µM M7 uygulaması yapıldı. Bu 48 saatlik uygulama süresinin 24. saatinde 10 nM sentetik androjen R1881 uygulaması ve 32. saatinde ise ER stresi yaratmak amacıyla 1 µM Tunukamisin ve 1 µM Tapsigargin uygulaması yapıldı. Sonuç olarak starve edilmiş LNCaP hücrelerinde 48 saatlik bor uygulaması, 24 saatlik androjen uygulaması ve 16 saatlik ER stresi uygulaması gerçekleştirildi.

Hormon deprivasyonsuz normal örnekleri hazırlamak için LNCaP hücreleri %60 yoğunlukta 10 cm’lik hücre kültürü kaplarına pasajlandı. Pasajlamadan 48 saat sonra hücrelerin ortamı değiştirildi ve 2 saat sonrasında 200 µM M7 uygulaması yapılarak 48 saat inkübe edildi. Bu inkübasyonun 32. saatinde ise ER stresi yaratmak amacıyla 1 µM Tunukamisin ve 1 µM Tapsigargin uygulaması yapıldı.

### 3.1.7. Sitotoksisite analizleri (MTT)

Sitotoksisite analizleri için kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3- [4,5- dimethylthiazol-2- yl]- 2,5- diphenyl- tetrazolium bromide ) oluşumu ölçüldü. Hücre çoğalması; steril PBS tamponunda hazırlanan 5 mg/mL MTT stok solüsyonunun, kullanımdan az önce 1:10 oranında üretme ortamı ile dilüe edilip, 0,5 mg/mL oranında hücreler üzerine eklenmesi ile saptandı. 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatörde 4 saat süreli inkübasyonun ardından MTT içeren ortam atılıp, oluşan mavi formazan kristallerinin 200 µL %100 DMSO içerisinde çözülmesi sağlandı. Oluşan mavi formazan miktarı 570-690 referans aralıklarında mikroparka okuyucu kullanılarak ölçüldü. % Hücre canlılığı, madde uygulanan hücrelerin absorbansı / kontrol hücrelerinin absorbansı olarak hesaplandı. Sonuçlar Microsoft Excel (XP) ve GraphPad yazılımı aracılığıyla grafiksel olarak değerlendirildi, her bir maddenin IC<sub>50</sub> değeri (hücre proliferasyonunun %50 oranında inhibe eden konsantrasyon değeri) hesaplandı.

### 3.2. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR yöntemi, SYBR Green boyasını kullanarak PCR sırasında PCR ürününün saptanması ve logaritmik siklus döneminde PCR ürün miktarının analizine olanak sağlar. Analiz rölatif kantitasyona dayandığından deney kontrol örneği de içermelidir. Normalizasyon için analiz edilecek gen ile birlikte housekeeping bir gen de amplifiye edilmelidir.

#### 3.2.1. Materyal

- 1,5 mL’lik Eppendorf tüpler (RNase içermeyen)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µL otomatik pipetler
- Pipet uçları
- Santrifüj (Eppendorf, centrifuge, 5415 D)
- SYBR Green
- dH<sub>2</sub>O
- cDNA

- Primerler
  - *ATF4*
  - *ATF6*
  - *XBP1*
  - *DDIT3*
  - *DNAJB9*
  - *ERN1*
  - *DNAJC10*
  - *EIF2AK3*
  - *NFE2L2*
  - *SVIP*
  - *VCP*
  - *SYVN*
  - *UFD1*
  - *AMFR*
  - *HSPA5*
  - *TBP*
- RT-PCR Cihazı (CFX-Connect, Bio-Rad)
- Aurum™ Total RNA İzolasyon Mini Kiti (Bio-Rad)
  - Aurum RNA bağlama mini kolonları
  - Toplama tüpleri
  - % 70'lik Etanol
  - Lizis Buffer
  - Yıkama solusyonu
  - Elusyon Buffer
  - DNaz I
  - High Stringency
  - Low Stringency
- BioRad's iScript™ Revers Transcription Supermix
  - dH<sub>2</sub>O
  - Master Mix

- Örnek Seti;
- 1. Kontrol
- 2. Tunukamisin uygulanmış LNCaP hücresi
- 3. Tapsigargin uygulanmış LNCaP hücresi
- 4. M7 (bor maddesi) uygulanmış LNCaP hücresi
- 5. M7+Tunukamisin uygulanmış LNCaP hücresi
- 6. M7+Tapsigargin uygulanmış LNCaP hücresi

### 3.2.2. RNA izolasyonu

LNCaP hücrelerinden RNA izolasyonu Aurum™ Total Rna İzolasyon Mini Kiti (Bio-Rad)'nin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

- Toplama tüplerine mini kolonlar yerleştirildi.
- 350 µl Lizis Buffer hücreler üzerine ilave edildi ve hücreler bir kazıyıcı yardımıyla kazınarak ependorf tüplerine aktarıldı. Kullanımdan önce Lizis Buffer içerisine %1 oranında β-merkaptoetanol ilave edildi.
- Pelletlerin tamamen parçalanması amacıyla insülin enjektörü ile homojenizasyon yapıldı.
- Homojenat üzerine kendi hacmi kadar %70 etanol eklendi ve pipetlenerek homojen hale getirildi.
- Homojenat Aurum RNA bağlama mini kolonlarına aktarılarak 30'' 13000'rpm de santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki süpernatant uzaklaştırıldı.
- 700 µl Low Stringency yıkama solüsyonu kolona eklendi ve 30'' 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki süpernatant uzaklaştırıldı.
- 80 µl DNaz eklendi ve inkübasyon için 15' beklendi.
- İnkübasyon sonrası 700 µl High Stringency yıkama solüsyonu eklenerek 30'' 13000 rpm'de santrifüj yapıldı.
- 700 µl Low Stringency yıkama solüsyonu eklenerek 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki süpernatant uzaklaştırıldı.
- 2 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü atıldı ve yerine ependorf yerleştirildi.

- 50 µl Elüsyon Tamponu eklendi ve 1 dakika beklendi.
- 2 dakika 13000 rpm’de santrifüj yapıldı.
- Kolon atıldı ve hücrelerden izole edilen RNA’lar ependorf tüpe aktarıldı.
- Nanodropta 260/280 nm’de ölçüm yapıldı.

### 3.2.3. cDNA sentezi

LNCaP hücrelerinden izole edilen RNA’lar BioRad’s iScript™ Revers Transcription Supermix Kiti’nin protokolüne uygun şekilde cDNA’ya çevrildi.

Elüsyon Tamponu kör olarak kullanılmıştır.

Konsantrasyon = nanogram / µl

1 nanogram =  $10^{-3}$  µg

- Her örnek için 2 µg RNA olacak şekilde gerekli örnek hacmi alındıktan sonra, son hacmi 15 µl’ye tamamlamak için gerekli olan dH<sub>2</sub>O miktarları eklendi.
- Ardından bütün örneklerin üzerine 4 µl reaksiyon karışımı ve 1 µl ters transkriptaz enzimi eklenerek toplam reaksiyon hacmi 20 µl’ye tamamlandı.
- Kısa bir santrifüj yapıldıktan sonra gerekli reaksiyon koşullarının sağlanması için örnekler konvansiyonel PCR cihazına yerleştirildi.
- RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılması için örnekler 5 dakika 25 °C, 30 dakika 42 °C ve 5 dakika 85 °C’ de inkübe edildi.
- Elde edilen cDNA’lar -20°C’ye kaldırıldı.

### 3.2.4. Real-Time PCR

LNCaP hücrelerine yapılan uygulamalardan sonra elde edilen cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak Çizelge 3.1’de belirtilen 15 adet genin ekspresyon profilleri RT-PCR amplifikasyonu ile analizlendi.

**Çizelge 3.1.** Real-Time PCR’da ekspresyon profilleri analizlenecek genler

	<b>Gen</b>	<b>Gen İsmi</b>	<b>Kodladığı Protein</b>
<b>P1</b>	<i>ATF4</i>	Aktive edici transkripsiyon faktörü 4	CREB-2
<b>P2</b>	<i>ATF6</i>	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha
<b>P3</b>	<i>XBP1</i>	X-box bağlayıcı protein 1	X-box bağlayıcı protein 1
<b>P4</b>	<i>DDIT3</i>	DNA damage inducible transcript 3	CHOP
<b>P5</b>	<i>DNAJB9</i>	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B9	ERdj4
<b>P6</b>	<i>ERN1</i>	Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signalling1	Serin/treonin-protein kinaz/endoribonükleaz IRE1
<b>P7</b>	<i>DNAJC10</i>	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C10	ERdj5
<b>P8</b>	<i>EIF2AK3</i>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3	PERK
<b>P9</b>	<i>SVIP</i>	Small VCP Interacting Protein	Small VCP/P97-Interacting Protein
<b>P10</b>	<i>VCP</i>	Valosin Containing Protein	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
<b>P11</b>	<i>SYVN</i>	Synoviolin	HRD1
<b>P12</b>	<i>UFD1</i>	Ubiquitin Recognition Factor in ER Associated Degradation 1	Ubiquitin fusion degradation protein 1
<b>P13</b>	<i>AMFR</i>	Autocrine Motility Factor Receptor	E3 ubikuitin-protein ligaz AMFR
<b>P14</b>	<i>HSPA5</i>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5	Endoplazmik retikulum şaperon BiP (GRP78)
<b>P15</b>	<i>TBP</i>	TATA-Box Binding Protein	TFIID



- Bir reaksiyon için 10 µl hacim kullanıldı.
- Reaksiyon başına 5 µl SYBR-Green master mix (2X) ve 1 µl cDNA kullanıldı.
- F+R primerler için ; 1 µl primer ve 3 µl dH<sub>2</sub>O kullanıldı.
- PCR amplifikasyonu
  - 1. Denatürasyon;
    - 95 °C'de 3', 1 döngü
  - 2. Amplifikasyon;
    - 95 °C'de 3', (95 °C'de 10", 58 °C'de 10", 72 °C'de 10") 45 döngü
  - 3. Çift zincirin açılması
    - Amplifikasyon basamağındaki her döngüden sonra 95 °C'de 30 sn.
  - Soğutma;
    - 37 °C 'de 10 sn
- Amplifikasyonun sonunda gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin miktarını (kat cinsinden) belirlemek amacıyla yapılan erime eğrisi ve relatif kantitasyon analizleri TATA-Binding Protein (TBP) referans geni (housekeeping genes) kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.3. Western Blot (İmmünooblottlama)

Western blot immünojenetik, biyoloji ve moleküler biyoloji dallarında bir doku homojenatı veya ekstraktı numunesi içerisinde spesifik proteinlerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir analitik metottür. Hedef proteinle etkileşmesi amacı ile sentetik veya hayvan kökenli antikolar kullanılmaktadır.

#### 3.3.1. Materyal

- Modifiye RIPA tamponu:
  - 10 mM trizma baz pH=8.0 (Sigma- T5941, Almanya)
  - % 0,1 SDS (Sigma- L4390, Almanya)
  - % 1 triton x-100 (Sigma- T8787, Almanya)
  - % 0,1 sodyum deoksikolat (Sigma- D6750, Almanya)
  - 1 mM EDTA (Sigma- K5134, Almanya)

- 1 mM EGTA (Sigma- E3889, Almanya)
- 140 mM NaCl (Sigma- S3014, Almanya)
- Proteaz inhibitörleri; PIC (roche cocktail, 14X), NaF (Son konsantrasyon 1mM, stok 30X), NaVO<sub>3</sub> (Son konsantrasyon 1mM, stok 100X), PMSF (100 X'lik hazır stok, son konsantrasyon 1mM)
- Fosfataz inhibitörü (Hazır stok, roche cocktail, 20X seyreltme)
- NaF 100X (100mM), (Merck- B815549 606, ABD)
- NaVO 3 100X (200mM) (Fluka- 72060, Almanya)
- PMSF 100X (100 mM) (Fluka- 93482, Almanya)
- BCA kiti (Sigma- 088K6138, Almanya)
- Kuars küvet (Hellma- 105.202QS, Almanya)
- İzopropanol (Merck- K35707095 607, ABD)
- Metanol (Merck, K34212908503)
- % 30 akrilamid karışımı için
  - % 29 akrilamid (Sigma- A9099, Almanya)
  - % 1 N, N- metilenbisakrilamid (Sigma- M2022, Almanya)
 karışımı hazırlanarak filtrelendi ve gazı alınarak kullanıldı.
- 4X SDS-PAGE ayırma jel tamponu
  - 1.5 M trizma baz (pH: 8.8)(Sigma- T5941, Almanya)
  - % 0.4 SDS (Sigma- L4390, Almanya), pH 8.8
- 4X SDS-PAGE depolama jel tamponu
  - 0.5 M trizma baz (pH: 6.8) (Sigma- T5941, Almanya)
  - % 0.4 SDS (Sigma- L4390, Almanya), pH 6.8
- Amonyum persülfat solüsyonu (% 10) (Sigma- A9164, Almanya)
- TEMED (Sigma- T9281, Almanya)
- 1L hacim için SDS-PAGE jel 10X yürütme tamponu (1X olarak kullanılır)
  - 30 g trizma baz (Sigma- T6066, Almanya)
  - 144 g glisin (Biochemika/FLUKA- 50046, Almanya)
  - 10.0 g SDS (Sigma- L4390, Almanya)
- 4X yükleme tamponu
  - 40 mM trizma baz (pH 8.0) (Sigma- T6066, Almanya)

- 0.4 mM EDTA (Sigma- K5134, Almanya)
- % 4 SDS (Sigma- L4390, Almanya)
- % 20 gliserol (Sigma- G5150, Almanya)
- Brom fenol mavisi 200 µl (Merck- L54971322525, ABD)
- 1L hacim için SDS-PAGE jel 10X transfer tamponu
  - % 20 metanol (Merck- K34212908503, ABD)
  - 30.0 g trizma baz (Sigma- T6066, Almanya)
  - 144.0 g glisin (Biochemika/FLUKA- 50046, Almanya)
- Beta-merkaptoetanol (Sigma, M3148)
- 10 X TBS (pH 7.6), toplam hacim 1L
  - 12.1 g trizma baz (Sigma, T6066)
  - 80.0 NaCl (Sigma, S3014) TBS-T için
  - 1X TBS içine % 0.1 Tween 20 (Sigma, E1383) ilave edilmiştir.
- Yağsız süt tozu (Saliler, Almanya)
- BSA (USB- 10857, ABD)
- Anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham- NA934, ABD)
- Anti-mouse IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham- NA931, ABD)
- $\beta$  -Actin antikoru (Cell signaling, 4967)
- PSA antikoru (Proteintech, 10679-1-AP)
- GAPDH antikoru (Ambion, AM4300)
- AR antikoru (Milipore, 06-680)
- eIF2  $\alpha$  antikoru (Cell signaling, 9721)
- peIF2  $\alpha$  antikoru (Cell signaling, 9722)
- PERK antikoru (Cell signaling, 3192)
- CHOP antikoru (Cell signaling, 2895)
- BiP antikoru (Cell signaling, 3183)
- Clarity Western ECL Substrate kiti (Biorad, 1705061)
- Hücre kazıyıcı (Cell Scraper- TPP 9903, İsviçre)
- Soğutmalı santrifüj, +4 °C için (Sigma- B6916, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf, 5415D ve 5415R, ABD)
- Blok ısıtıcı (Grant- QBA2, İngiltere)

- Spektrofotometre (Amersham- Ultraspec 1100 pro., ABD)
- Yürütme aparatı (C.B.S. Scientific- MG202, ABD)
- Transfer aparatı (C.B.S. Scientific- EBX700, ABD)
- Whatman kağıtlar
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membranı (Roche- 03010040001, Almanya)
- Çalkalayıcı (Heidolph- ROTAMAX 120, Almanya)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl otomatik pipetler (Brand- TransferpetteS, Almanya)
- Pipet uçları (VWR, ABD)
- Eppendorf tüpler (Grainer, Almanya)
- Örnek Seti;

### **1. Set**

1. Kontrol
2. Tunukamisin uygulanmış LNCaP hücresi
3. Tapsigargin uygulanmış LNCaP hücresi
4. M7 (bor maddesi) uygulanmış LNCaP hücresi
5. M7+Tunukamisin uygulanmış LNCaP hücresi
6. M7+Tapsigargin uygulanmış LNCaP hücresi

### **2.Set (Hormon Deprivasyon Örnekleri)**

1. Kontrol
2. Tunukamisin uygulanmış LNCaP hücresi
3. Tapsigargin uygulanmış LNCaP hücresi
4. M7 (bor maddesi) uygulanmış LNCaP hücresi
5. M7+Tunukamisin uygulanmış LNCaP hücresi
6. M7+Tapsigargin uygulanmış LNCaP hücresi
7. R1881 uygulanmış LNCaP hücresi
8. R1881+Tunukamisin uygulanmış LNCaP hücresi
9. R1881+Tapsigargin uygulanmış LNCaP hücresi
10. R1881+M7 uygulanmış LNCaP hücresi
11. R1881+M7+Tunukamisin uygulanmış LNCaP hücresi
12. R1881+M7+Tapsigargin uygulanmış LNCaP hücresi

### 3.3.2. Protein izolasyonu

İmmüno blot deneylerinde kullanılmak üzere hücrelerden RIPA modified tamponu kullanarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla;

- Ortam uzaklaştırıldıktan sonra hücreler soğuk PBS ile bir defa yıkandı.
- Hücreler üzerine RIPA Modified Lysis Buffer ilave edilerek (0,5 mL →  $10^7$  cells/100mm petri/ 150 cm<sup>2</sup> flask; 0,25 mL →  $10^6$  cells/ 60 mm petri/ 75 cm<sup>2</sup> flask) hücreler bir kazıyıcı yardımıyla kazındı ve pipetleme yapıp ependorf tüplerine aktarıldı (tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.).
- Örnekler buz üzerinde arada bir karıştırılarak 45 dk inkübe edildi.
- Tamamen hücre parçalanması/homojenizasyonu için 10 dk' da bir 10 saniye vorteks yapıldı.
- Örnekler +4° C'de 12000 ref'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant toplam hücresel protein olarak yeni ependorf tüplerine aktarıldı (protein lizatı örneği).
- BCA tayini ile protein ölçümü yapıldı.

### 3.3.3. Protein miktarının belirlenmesi

Elde edilen lizatlardaki protein miktarı BCA protein miktarı ölçüm kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre belirlendi.

- Eppendorf tüplere dağıtılan 149'ar µl RIPA tamponu üzerine 1'er µl protein lizatı örneği eklendi.
- BCA çalışma reaktifi- her örnek başına 75 µl QA, 75 µl QB ve 3 µl QC olacak şekilde bütün örnekler için toplam bir karışım hazırlanarak vortekslendi ve her örnek başına 150 µl olacak şekilde eppendorf tüplere dağıtıldı.
- Kör olarak protein lizatı bulunmayan RIPA tamponu kullanıldı.
- Tüpler vortekslenip kısa santrifüjden sonra 60 °C'de ısıtıcı blokta 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kısa bir santrifüjden sonra örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenerek spektrofotometrede 562 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı.
- Elde edilen absorbans değerleri referans değer ile normalize edilerek protein miktarları µg/µl olarak belirlendi.

### 3.3.4. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması

SDS-PAGE bir poliakrilamid jel elektroforez varyantı olan ve biyokimyada karışımlardaki yüklü molekülleri elektrik alan varlığında moleküler kütlelerine göre ayıran analitik bir yöntemdir. Sodyum dodesil sülfat molekülleri proteinlerin izolasyon ve tanımlanmasına yardımcı olurlar.

### 3.3.5. Jel hazırlama

- SDS-PAGE aparatının camları sırasıyla dH<sub>2</sub>O-etanol-izopropanol ile silindi ve jelin dökülmesi için camlar ve spacerlardan oluşan aparat hazır hale getirildi.
- Jel konsantrasyonu proteinin moleküler ağırlığına göre seçildikten sonra ayırma jeli (seperating) hazırlandı, aparata döküldü (hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi).
- Üst yüzeyi izopropanol ile düzleştirilerek donması için 30-40 dakika beklendi.

**Çizelge 3.2.** Protein moleküler ağırlığına göre jel konsantrasyon yüzdeleri

Protein Büyüklüğü (kDa)	Jel Yüzdesi (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12
15-100	10
25-200	8

- Donan ayırma jelinin üzerinden izopropanol uzaklaştırıldı.
- Depolama jeli (stacking) hazırlandıktan sonra aparata dökülerek tarak yerleştirildi ve donması için 30-40 dakika beklendi.
- Camlar yürütme aparatı üzerine yerleştirilerek alt ve üst hazneler yürütme tamponu (1X SDS-PAGE Running Buffer) ile dolduruldu.
- Tarak donmuş jelden yavaşça çıkartıldı ve kuyucuklar içerisinde kalan jel parçaları yüklemeyen önce tampon ile temizlendi.

**Çizelge 3.3.** Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

<b>Ayırma Jeli (10 mL)</b>	<b>%6</b>	<b>%8</b>	<b>%10</b>	<b>%12</b>	<b>%15</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	5,4 mL	4,7 mL	4,1 mL	3,4 mL	2,4 mL
<b>%30 akrilamid mix</b>	2,0	2,7	3,3	4	5
<b>4x ayırma jeli tamponu</b>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>%10 APS</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>TEMED</b>	0,008	0,006	0,004	0,004	0,004

**Çizelge 3.4.** Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

<b>Depolama Jeli (10 mL)</b>	<b>10 mL</b>	<b>5 mL</b>	<b>2,5 mL</b>
<b>dH<sub>2</sub>O (mL)</b>	5,7	2,85	1,425
<b>%30 akrilamid mix (mL)</b>	1,7	0,85	0,425
<b>4x depolama jeli tamponu (mL)</b>	2,5	1,25	0,625
<b>%10 APS (mL)</b>	0,1	0,05	0,025
<b>TEMED (mL)</b>	0,010	0,005	0,005

### 3.3.6. Örnek hazırlama

- Protein örneklerinden 100 µg proteine eşit miktarda hacim alınarak dH<sub>2</sub>O ile 20 µl'ye tamamlandı.
- 20µl örnek solüsyonu üzerine anyonik bir denatürasyon deterjanı olan Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) içeren 4X yükleme tamponundan (4X Loading Buffer) 7,5 µl eklendi (kullanımdan önce gerekli hacimde 4X yükleme tamponu içerisine %10 oranında beta-merkaptolanol eklendi ve kısa bir santrifüj yapıldı.).
- Hazırlanan örnekler 95-100 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında örnekler hemen buz üzerine alındı.

### 3.3.7. Proteinlerin jele yüklenmesi ve jelde yürütme

- Buz üzerinde bekleyen örnekler kısa bir santrifüj sonrası 25 µl hacimde jele yüklendi.

- Bir kuyucuğa protein boyutunun belirlenebilmesi ve elektroforetik yürüyüşün izlenebilmesi amacıyla moleküler ağırlık markerından 5 µl yüklendi.
- Üst hazne elektrodu katod (-) ve alt hazne elektrodu anot (+) olacak şekilde bağlantılar yapılarak jelde yürütme işlemi başlatıldı (80V'da ~3-4 saat)

### **3.3.8. Jelden membrana transfer**

- Transfer için jel boyutundan büyük 4 adet whatman kağıdı ve bir adet jel boyutunda PVDF membran kesildi.
- İlk olarak Western-blot sandviç aparatının (-) kutbuna (siyah kapak üzerine) 1X transfer tamponundan ıslatılan süngerlerden biri konuldu.
- Sünger üzerine 1x transfer tamponu ile ıslatılmış 2 adet whatman kağıdı yerleştirildi.
- Jel, yürütme biçiminin tersi yönünde whatman kağıtları üzerine kondu.
- Metanol ile ıslatılmış olan PVDF membranı jel üzerine dikkatlice (jel ile membran arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde) yerleştirildi.
- Membran üzerine tekrar 2 adet transfer tamponuyla ıslatılmış whatman kağıdı kondu.
- Son olarak whatman kağıtlarının üzerine ıslak bir sünger daha konularak aparat hazır hale getirildi.
- Sanviç aparatı jeldeki proteinlerin membrana transfer edilebilmesi (negatif kutuptan pozitif kutuba doğru) amacıyla transfer aparatına yerleştirildi.
- Transfer aparatının içerisine 1X transfer tamponu döküldü ve aparatın kenarlarına soğutucu bloklar yerleştirildi. Gece boyu +4'de 90-120 mA'de transfer gerçekleştirildi.

### **3.3.9. Antikor işaretleme**

- Western blot aparatından çıkartılan membran 2 kez TBS-T ile hafifçe çalkalayarak kısa bir şekilde yıkandı.
- Bloklama solüsyonuyla (TBS-T içinde %5 süt tozu) oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı.
- Bloklamadan sonra membran TBS-T ile kısaca 2 kez yıkandı.



- Primer antikor solüsyonu %0,5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde (10 mL) uygun dilüsyonda hazırlandı ve membran primer antikor ile gece boyu +4 °C’de hafifçe karıştırılarak inkübe edildi. İşlem sonrası primer antikorlar saklandı.
- Membran TBS-T ile 2 defa kısaca, 1 defa 15 dakika ve 3 defa 5 dakika olacak şekilde yıkandı.
- Ardından sekonder antikor solüsyonu %0,5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde (10 mL) uygun dilüsyonda hazırlandı ve membran sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- Membran TBS-T ile 2 defa kısaca, 1 defa 15 dakika ve 3 defa 5 dakika olacak şekilde yıkandı.

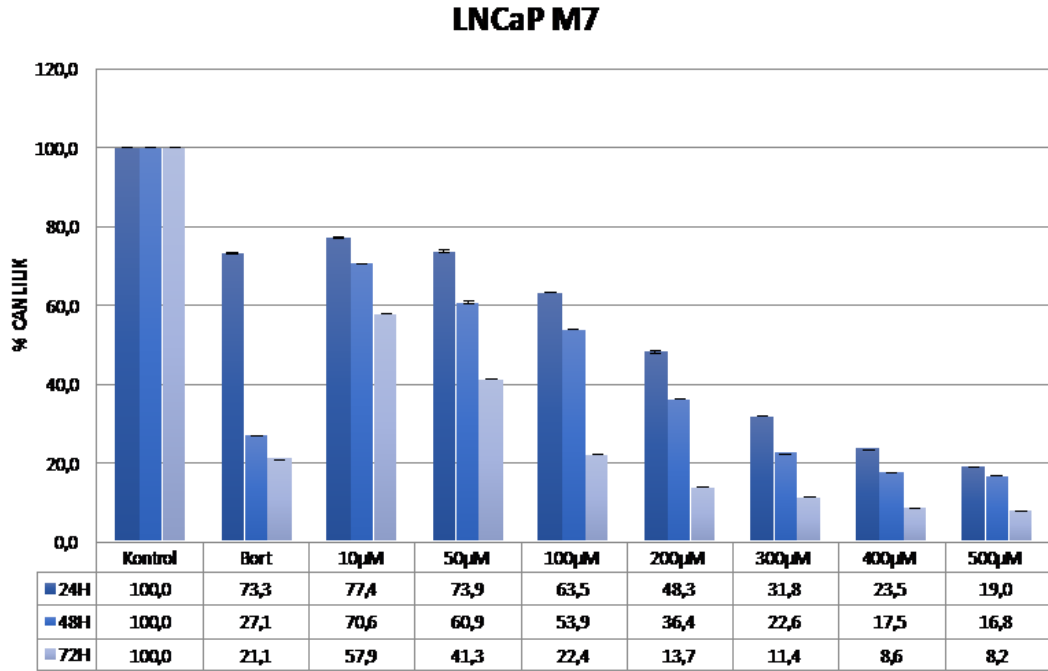
### 3.3.10. Bantların görüntülenmesi

- HRP enzimi ile işaretli ikincil antikor uygulanmış membranların kemilüminesans görüntülenmesi için Clarity Western ECL Substrat (Bio-Rad) kiti kullanıldı. Substrat olarak kullanılan lüminol, HRP ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında okside olarak uyarılmış ürün 3-aminofталatı oluşturur. Bu ürün, 425 nm’de ışımaya verir. Bu ışımaya, yalnızca enzim-substrat reaksiyonu sırasında oluşur. Yani geçici ve kısıtlı süre zarfında gözlenebilir. Substratın aşırı yoğun sinyal çıkışı pikogram düzeyindeki antijenin tespitini mümkün kılar. Sinyalin hassasiyeti, yoğunluğu ve süresi fotoğraflanarak kolaylıkla belirlenmektedir.
- Clarity Western ECL Substrate çalışma solüsyonları membran başına 3 ml olacak şekilde 1:1 oranında karıştırılarak görüntülenmeden hemen önce taze hazırlanır. Görüntüleme işlemi için membran hazırlanan substrat solüsyonuyla direkt ışıktan kaçınılacak şekilde 1 dakika süre ile inkübe edilir.
- Kemilüminesans görüntüleme için Vilber Lourmat FX-7 cihazı (Thermo) kullanıldı.
- Cihaz ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar çalıştırılarak FX-7 yazılımı açıldı.
- Kamera sisteminin soğutma işlemini tamamlaması beklendikten sonra cihazın odak noktası ayarlanarak kemilüminesans görüntülenmeye geçildi.
- Tüm ayarlamalar yapıldıktan sonra membran cihazın tablasına yerleştirilerek görüntüleme süreleri saniye ve dakika cinsinden seçilerek fotoğraflama işlemi yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksosite Sonuçları (MTT)

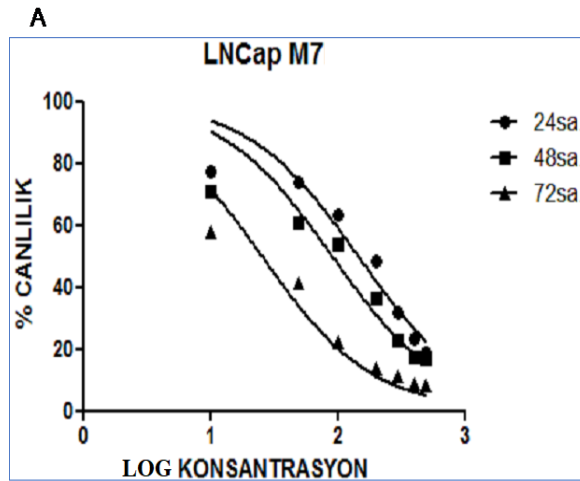
Tez çalışması kapsamında MTT ile sitotoksosite denemeleri yeni sentez bor bileşiği M7'nin uygulama süreleri ve dozuna bağlı olarak gözlenecek sitotoksik veya anti-proliferatif etkilerin ve bu etkilerin gözlemlendiği optimum konsantrasyon değerlerinin (IC<sub>50</sub> değerlerinin) belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. LNCaP hücrelerinin belirlenen optimum sayıda (10x10<sup>3</sup> hücre / kuyucuk) 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmesinden sonra 10-50-100-200-300-400-500 µM konsantrasyon değerlerinde 24, 48 ve 72 saat süreyle madde uygulaması yapıldı ve 570-690 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapılarak sonuçlara ulaşıldı. Denemeler en az 3 defa tekrar edildi.



**Şekil 4.1.** M7'nin LNCaP hücre hattında zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.1' de görüldüğü gibi MTT denemesi sonucunda oluşturulan % canlılık grafiği incelendiğinde, M7'nin LNCaP hücrelerinde zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Tüm uygulama süreleri için özellikle canlılığın

azalma gösterdiği konsantrasyon değerinin 100  $\mu\text{M}$  ve üzerinde olduğu gözlemlendi. 48 saat uygulama süresi için pozitif kontrol olarak kullanılan 20  $\mu\text{M}$  bortezomibte % 27 oranında bir canlılık var iken, bu canlılık değeri M7 için yaklaşık olarak 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyon değerinde saptandı. Sonuç olarak M7 bor bileşiği bortezomibe kıyasla bir miktar daha yüksek konsantrasyonda etki göstermiş olmasına rağmen, LNCaP hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmede etkili bir ajan olduğu belirlendi.



**B**

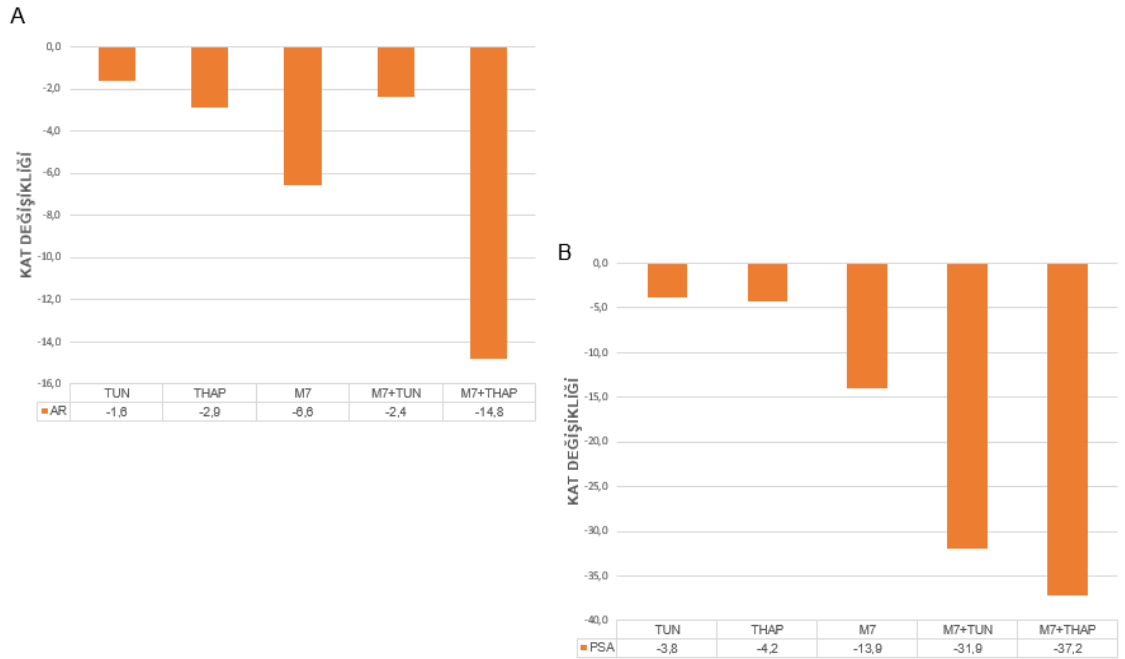
	LNCAP		
	24sa.	48sa.	72sa.
M7	145,7	90,99	25,50

**Şekil 4.2. A)** M7'nin LNCaP hücre hattında GraphPad yazılım programı ile % canlılık değerlerine karşı logaritmik konsantrasyonlarından elde edilen proliferasyon eğrileri. **B)** LNCaP hücre hattında M7 uygulamalarının GraphPad yazılım programı ile elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değerleri

MTT analizi sonucunda elde edilen absorbans değerleri Graphpad yazılımı aracılığıyla analizlenerek Şekil 4.2'de görüldüğü gibi % canlılık proliferasyon eğrisi çizildi ve  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplandı. Yapılan analiz sonucunda M7 uygulamasıyla 24 saat için  $\text{IC}_{50}$  değeri 145,7  $\mu\text{M}$  iken; 48 saat sonunda bu değer 90,99  $\mu\text{M}$ 'a düştüğü belirlendi. 72 saat sonunda ise daha da azalma göstererek 25,50  $\mu\text{M}$  gibi oldukça düşük bir konsantrasyon değerine gerilediği gözlemlendi. Elde edilen verilere göre M7 bor bileşiğinin uygulama süresi ve konsantrasyon değeri arttıkça LNCaP hücrelerinin canlılığını azaltarak anti-proliferatif etki gösterdiği belirlendi.

## 4.2. QRT PCR Sonuçları

QRT-PCR (Kantitatif Gerçek-Zamanlı PCR) metodolojisi, LNCaP hücrelerinde yeni sentez bor bileşiği M7 varlığında ve/veya yokluğunda özellikle AR ve PSA gibi prostat kanseri gelişimi ile ilişkili olan ve aynı zamanda ER stresi ve ERAD ile ilişkili olan hedef genlerin transkripsiyonel regülasyonlarını belirleyebilmek amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla LNCaP hücrelerine 200µM konsantrasyonda 48 saat süreyle M7 uygulaması yapıldı ve 32. Saatte Tunukamisin ve Tapsigargin uygulamaları ilave edildi. Ardından RNA izolasyonları ve cDNA çevrimleri yapılarak Çizelge 3.1’de sunulan primerler ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyonun sonunda elde edilen C<sub>t</sub> değerleri (eşik değeri) kullanılarak gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin miktarını (kat cinsinden) belirlemek amacıyla *TBP* referans geni ile relatif kantitasyon analizleri yapıldı ve elde edilen değerler (kat değişiklikleri) grafiğe aktarıldı.



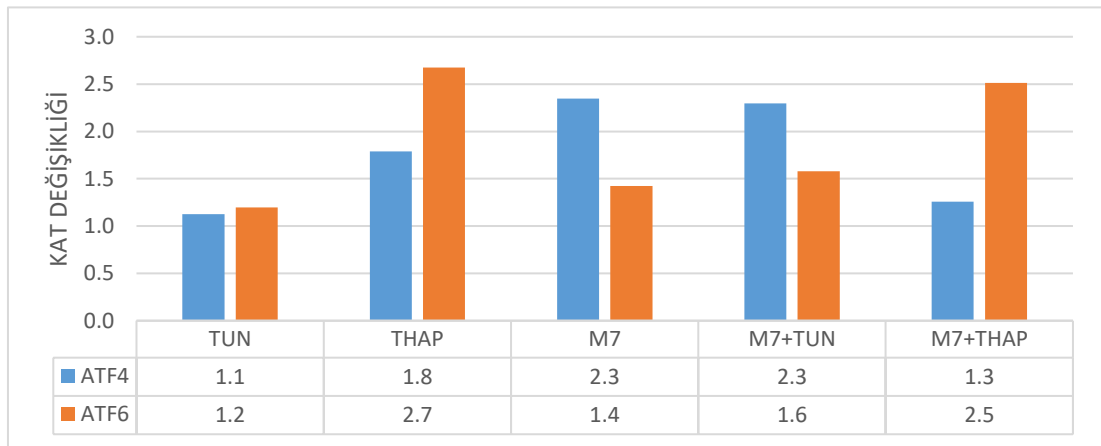
**Şekil 4.3. A)** ER stresi ajanları ve M7 uygulamalarının AR mRNA seviyesine etkileri **B)** ER stresi ajanları ve M7 uygulamalarının PSA mRNA seviyelerine etkisi

Şekil 4.3.’deki sonuçlara göre yapılan bütün madde uygulamalarında AR ve PSA mRNA seviyelerinin belirgin bir biçimde azaldığı gözlemlendi. İlk olarak Şekil 4.3.A’da görülen AR

mRNA seviyesinin değişimine bakıldığında, tek başına yeni sentez bor bileşiği M7 uygulamasında LNCaP hücrelerinde *AR* mRNA seviyesinde 6,6 kat azalma olduğu belirlendi. Tunukamisın uygulanan LNCaP hücrelerinde *AR* mRNA seviyesinde 1,6 kat azalma gözlenirken; bu değerin M7 ile birlikte 2,4 kata kadar yükseldiği saptandı. Benzer şekilde tek başına Tapsigargin uygulandığında *AR* mRNA seviyesinde 2,9 kat azalma gözlenirken; M7 ile birlikte bu azalmanın 14,8 kata kadar yükseldiği belirlendi.

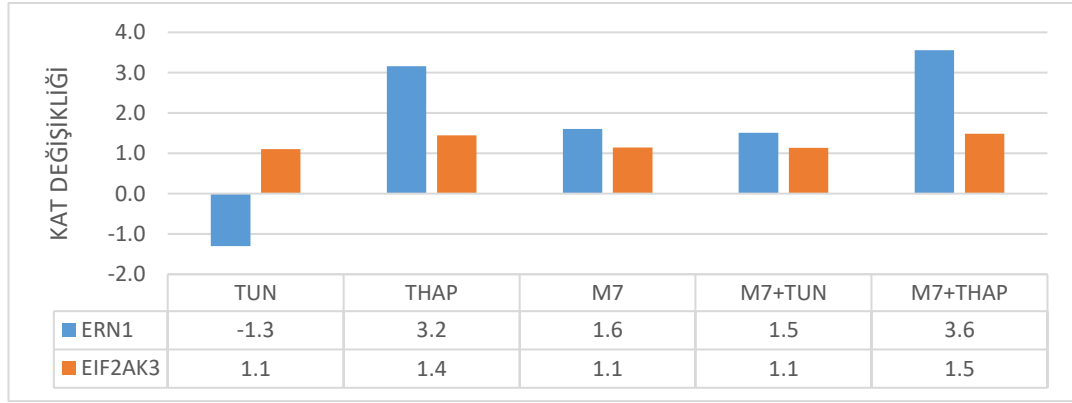
Şekil 4.3.B’de *PSA* mRNA seviyesi değişimleri incelendiğinde, *AR* mRNA’sında gözlenen değişikliklere benzer şekilde tek başına M7 uygulanan LNCaP hücrelerinde *PSA* mRNA seviyesinde de 13,9 kat azalma olduğu gözlendi. Tunukamisın uygulanan LNCaP hücrelerinde *PSA* mRNA seviyeleri 3,8 kat azalırken; M7 ile birlikte 31,9 kat azalma olduğu belirlendi. Tapsigargin uygulanan LNCaP hücrelerinde *PSA* mRNA seviyesi 4,2 kat azalırken; Tapsigargin ile birlikte M7 uygulandığında azalma seviyesinin 37,2 kat olduğu gözlendi.

Prostat kanseri gelişiminin en önemli moleküler belirteçleri olan *AR* ve *PSA* genlerinin M7 bor bileşiği ile transkripsiyonel regülasyonlarının incelenmesinin ardından, *BiP* ve *CHOP* gibi belirteçler de dahil olmak üzere ER stresi ile ilişkili olan 14 hedef genin mRNA seviyeleri QRT-PCR ile araştırıldı.



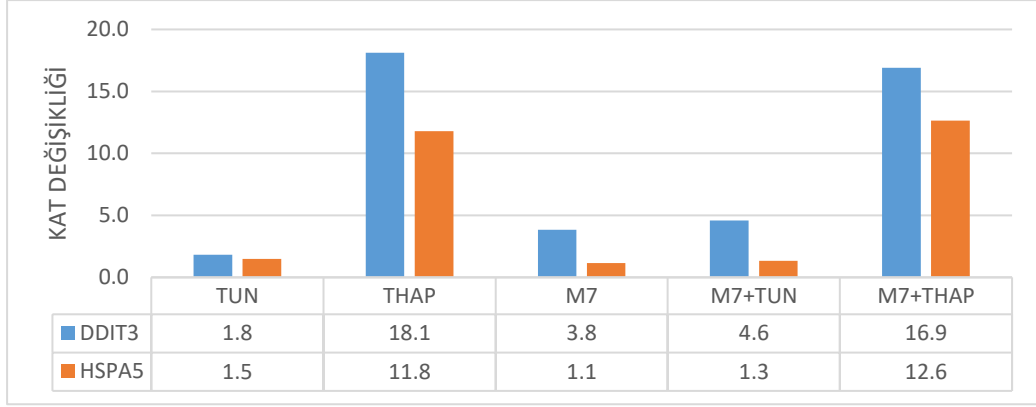
**Şekil 4.4.** *ATF4* ve *ATF6* genlerinin Tunukamisın, Tapsigargin ve M7 uygulamalarına göre mRNA seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi

İlk olarak Şekil 4.4.'te görülen *ATF4* ve *ATF6* genlerinin değişimine bakıldığında, M7 uygulanan LNCaP hücrelerinde *ATF4* gen ekspresyonunun 2,3 kat arttığı, bununla birlikte *ATF6* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmadığı saptandı. Tunukamisin uygulanan LNCaP hücrelerinde her iki gende de anlamlı bir artış gözlenmezken; M7 ile birlikte *ATF4* gen ekspresyonunun 2,3 kat arttığı, *ATF6* gen ekspresyonunda ise yine anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi. Tapsigargin uygulaması yapıldığında ise *ATF4* gen ekspresyonunda 1,8 katlık bir artış gözlenirken; *ATF6* gen ekspresyonunda 2,7 kat artış olduğu saptandı. Tek başına Tapsigargin ile gözlenen bu etkilerin M7 ile birlikte anlamlı bir şekilde değişmediği gözlemlendi.



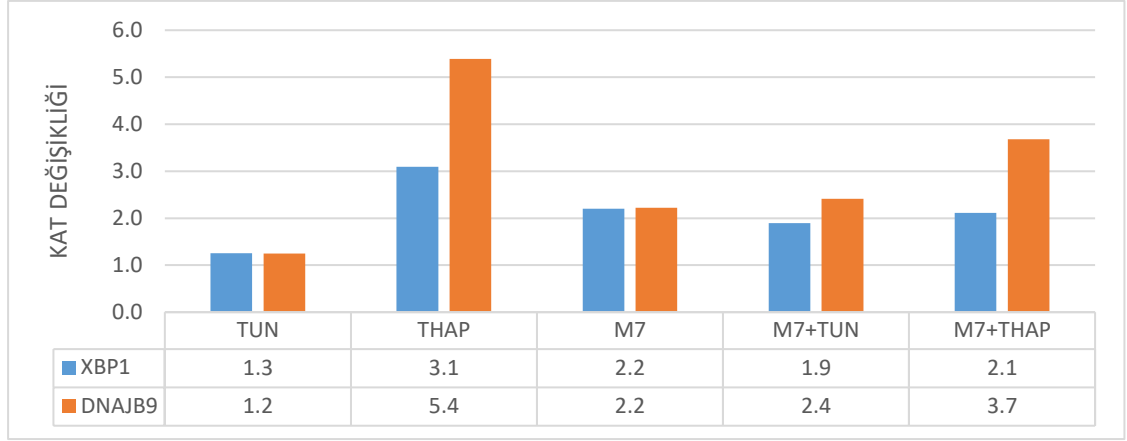
**Şekil 4.5.** *ERN1* ve *EIF2AK3* genlerinin Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarına göre mRNA seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi

Şekil 4.5.'te görüldüğü üzere, tek başına M7 uygulanan LNCaP hücrelerinde *ERN1* (*IRE1*) ve *EIF2AK3* (*PERK*) genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış saptanmadı. Tunukamisin uygulandığında *ERN1* geni ekspresyon seviyesi 1,3 kat azalırken, *EIF2AK3* geni ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olmadığı belirlendi. Tunukamisinle birlikte M7 uygulandığında ise *ERN1* geni ekspresyon seviyesi 1,5 kat artış gösterirken; *EIF2AK3* geni ekspresyon seviyesinde bir değişiklik gözlenmedi. Tapsigargin uygulaması yapılan LNCaP hücrelerinde *ERN1* geni ekspresyon seviyesinde 3,2 kat artış gözlenirken; *EIF2AK3* geni ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış belirlenmedi. Bununla birlikte Tapsigargin ile beraber M7 uygulandığında ise *ERN1* gen ekspresyonundaki artış 3,6'ya yükselirken; *EIF2AK3* geni ekspresyon seviyesindeki yine anlamlı bir artış gözlenmedi.



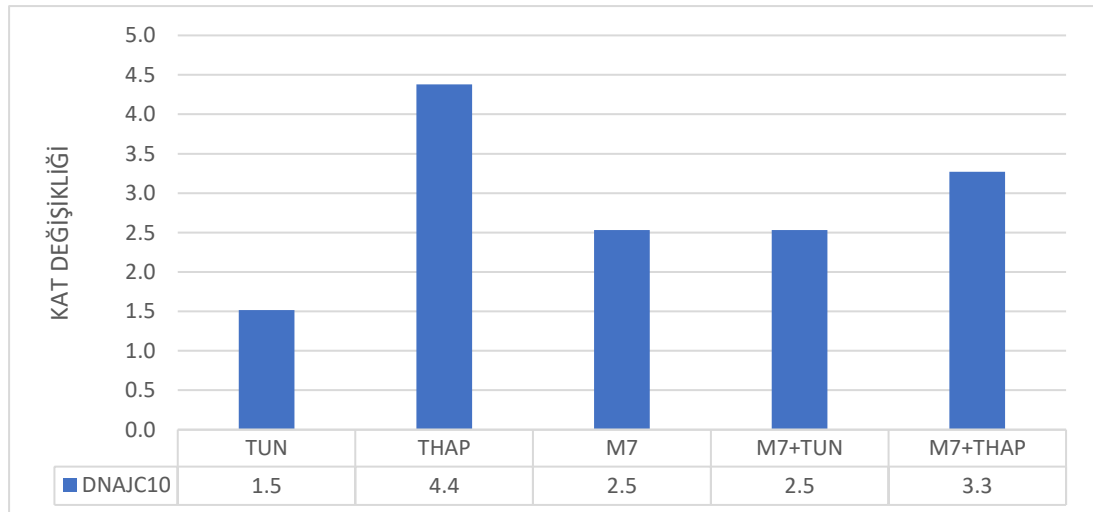
**Şekil 4.6.** *DDIT3* ve *HSPA5* genlerinin Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarına göre mRNA seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi

ER stresi belirteçleri olarak kullanılan *DDIT3* (CHOP) ve *HSPA5* (BiP) genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi tek başına M7 uygulanan LNCaP hücrelerinde *DDIT3* geninin ekspresyon seviyesinde 3,8 kat artış olduğu; *HSPA5* (BiP) geninin ekspresyon seviyesinde ise anlamlı bir artış olmadı gözlemlendi. Tunukamisin uygulanan LNCaP hücrelerinde her iki gende de yüksek bir artış saptanmadı. Tunukamisin'e ek olarak M7 uygulandığında ise *DDIT3* gen ekspresyonu 4,6 kat artarken; *HSPA5* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi. Tapsigargin uygulaması yapıldığında *DDIT3* gen ekspresyonu 18,1 kat artarken M7 ile birlikte uygulandığında oldukça yüksek seviyede olan bu artışın anlamlı bir şekilde değişmediği gözlemlendi. *HSPA5* gen ekspresyonu ise Tapsigargin uygulamasıyla 11,8 kat artış gösterirken; Tapsigarginle birlikte M7 uygulaması yapıldığında kat değişikliğinin 12,6'ya yükseldiği belirlendi.



**Şekil 4.7.** *XBP1* ve *DNAJB9* genlerinin Tunukamisın, Tapsigargin ve M7 uygulamalarına göre mRNA seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi

M7 uygulanan LNCaP hücrelerinde *XBP1* ve *DNAJB9* genlerinin her ikisinin de ekspresyon seviyesinde 2,2 kat artış olduğu belirlendi (Şekil 4.7.). Tunukamisın uygulaması yapıldığında her iki gende de anlamlı bir artış saptanmadı. Tunukamisınle birlikte M7 madde uygulaması yapıldığında *XBP1* geninde anlamlı bir değişim gözlenmezken; *DNAJB9* geninin ekspresyon seviyesinin 2,4 kat arttığı gözlemlendi. Tapsigargin uygulanan LNCaP hücrelerinde *XBP1* ve *DNAJB9* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla 3,1 ve 5,4 kat artış gösterdi. Tapsigarginle birlikte M7 uygulandığında ise bu kat değişikliklerindeki artışlar sırasıyla 2,1 ve 3,7'ye düştüğü belirlendi.

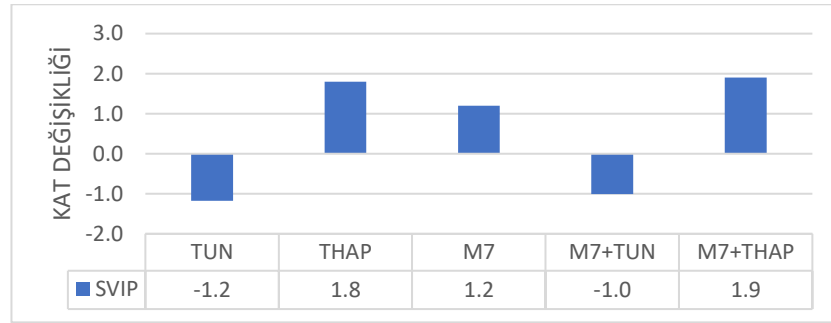


**Şekil 4.8.** Tunukamisın, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla *DNAJC10* geninin ekspresyon seviyesindeki kat değişikliği çizelgesi

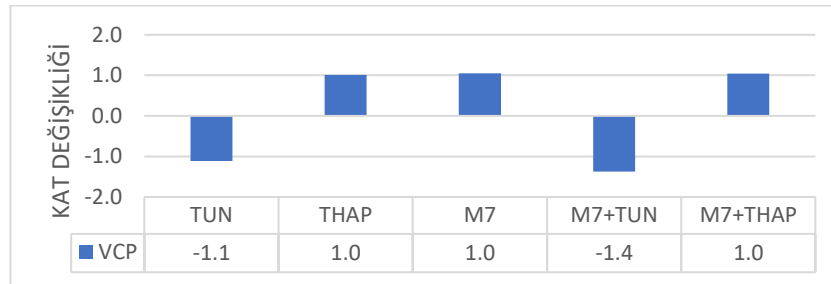


Şekil 4.8’de görüldüğü gibi tek başına M7 uygulanan LNCaP hücrelerinde *DNAJC10* geninin ekspresyon seviyesinde 2,5 kat artış olduğu belirlendi. Tunukamisin uygulandığında anlamlı bir artış gözlenmezken; Tunukamisin ile birlikte M7 uygulandığında *DNAJC10* geninin ekspresyon seviyesinde 2,5 kat artış olduğu saptandı. Tapsigargin uygulandığında bu genin ekspresyon seviyesi 4,4 kat artarken; Tapsigargin ile birlikte M7 uygulaması yapıldığında bu artan kat sayısının 3,3’e gerilediği gözlemlendi.

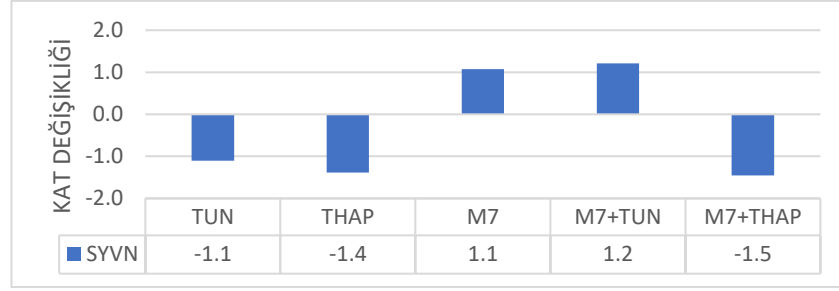
Son olarak M7 bor bileşiği varlığında ve yokluğunda ERAD sinyal yolağı ile ilişkili olan hedef genlerin regülasyonlarının değişip değişmediğini sorgulamak amacıyla QRT-PCR yapılarak kat değişiklikleri belirlendi.



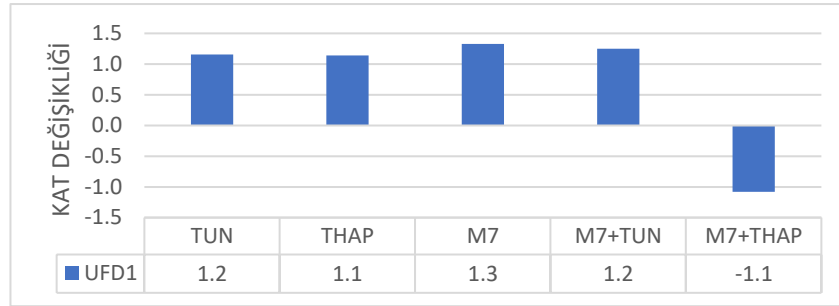
**Şekil 4.9.** Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla *SVIP* geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi



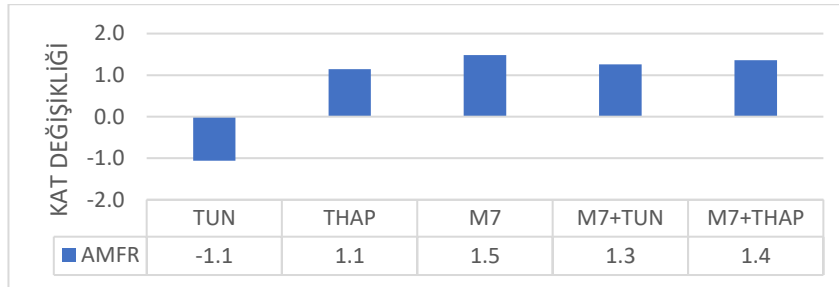
**Şekil 4.10.** Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla *VCP* geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi



**Şekil 4.11.** Tunukamisın, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla *SYVN* geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi



**Şekil 4.12.** Tunukamisın, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla *UFD1* geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi



**Şekil 4.13.** Tunukamisın, Tapsigargin ve M7 uygulamalarıyla *AMFR* geninin ekspresyon seviyelerindeki kat değişikliği çizelgesi

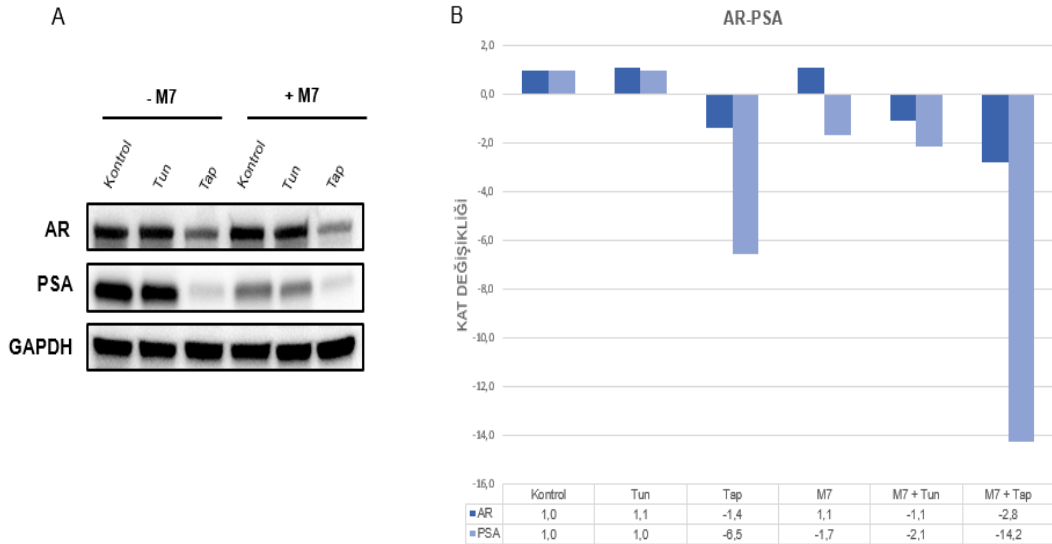
LNCaP hücrelerine Tunukamisın, Tapsigargin gibi ER stresi ajanları ve M7 bor bileşiği uygulamaları yapıldı ve ERAD ile ilişkili *SVIP*, *VCP*, *SYVN*, *UFD1* ve *AMFR* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki kat değişiklikleri hesaplandı (Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.). Ancak yapılan tüm uygulamalarda araştırılan hedef genlerin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı saptandı.

### 4.3. Western Blot Sonuçları

Bu tez çalışması kapsamında western-blot uygulaması ile M7'nin LNCaP hücre hattında ER stresine olan etkisi hedef proteinler incelenerek sorgulanmaya çalışıldı. Bu amaç doğrultusunda hem normal hem de hormon deprivasyon yapılan LNCaP hücrelerine 48 saat süreyle 200  $\mu$ M M7, 24 saat süreyle R1881 ve 16 saat süreyle de 1  $\mu$ M Tunukamisin ve 1  $\mu$ M Tapsigargin uygulamaları yapılarak protein izolasyonları gerçekleştirildi ve SDS-PAGE jellerinde yürütüldü. M7 varlığında ve yokluğunda seviyesi değişen proteinler western-blot ile belirlendi. ER stresinde rol oynayan hedef moleküllerin ekspresyon değişiklikleri "Image J" programıyla GAPDH seviyelerine göre normalize edilerek grafiğe geçirildi.

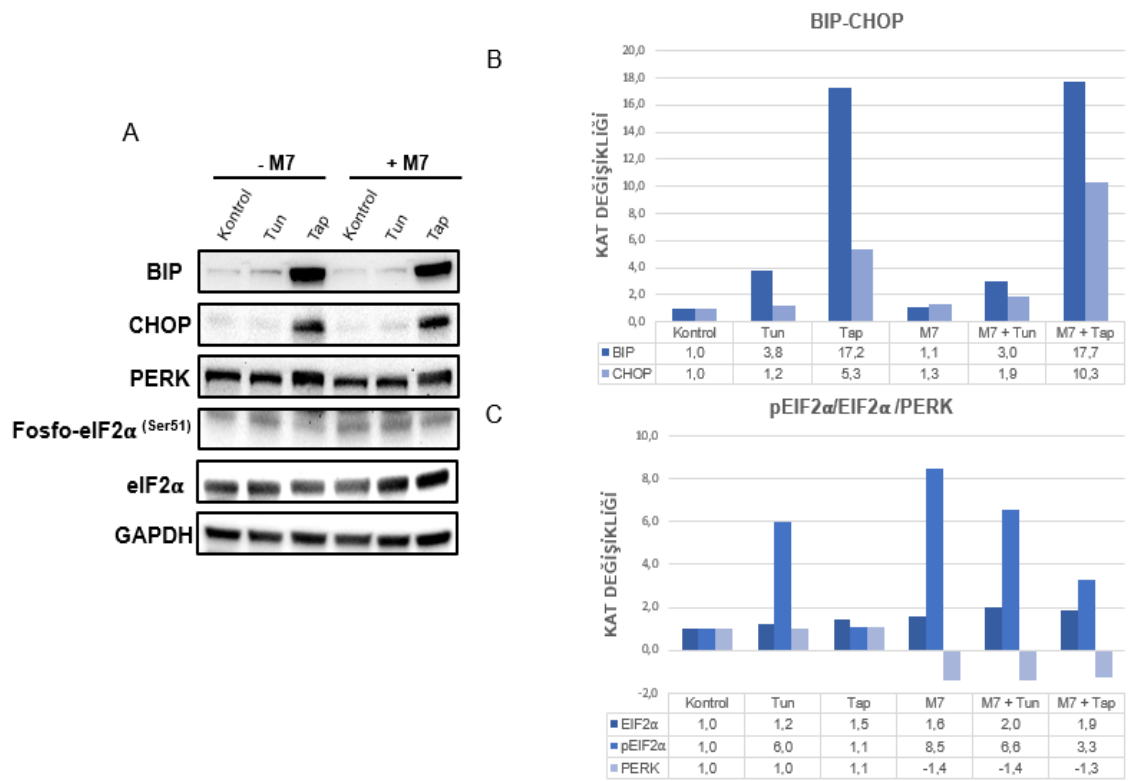
#### 4.3.1. Örnek seti-1 (normal koşullar)

İlk olarak normal koşullarda diğer bir deyişle hormon deprivasyon yapılmayan LNCaP hücrelerinde prostat kanseri gelişimi ile ilgili olan AR ve PSA protein seviyelerindeki değişiklikler araştırıldı.



**Şekil 4.14.** **A)** LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması sonucu gözlenen prostat kanseriyle ilişkili proteinlerin (AR ve PSA) ifadelerinin karşılaştırmalı şekilde incelenmesi (GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.) **B)** LNCaP hücrelerine ER

stresi ajanları ve M7 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile AR ve PSA'nın kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri Şekil 4.14'de verilen sonuçlar incelendiğinde tek başına M7 uygulanan LNCaP hücrelerinde AR protein seviyesinde belirgin bir değişiklik gözlenmezken, PSA protein seviyesinin 1,7 kat azaldığı belirlendi. Tek başına tunukamisin uygulamasında hem AR hem de PSA protein seviyelerinde belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte tek başına Tapsigargin uygulanmış LNCaP hücrelerinde ise AR protein seviyesi 1,4 kat azalırken, PSA seviyesinin de koordineli bir şekilde 6,5 kat azaldığı belirlendi. ER stresi ajanları ile birlikte M7 uygulanan örnekler bakıldığında tek başına Tunikamisin uygulamasında değişiklik elde edilemeyen AR ve PSA protein seviyelerinin, M7 ile birlikte yaklaşık olarak 2 kat azaldığı saptandı. Ek olarak M7'nin tapsigarginin tek başına yaptığı etkiyi neredeyse 2 kat artırarak sırasıyla AR ve PSA protein seviyelerinin 2,8 ve 14,2 kat azalmasına yol açtığı belirlendi.



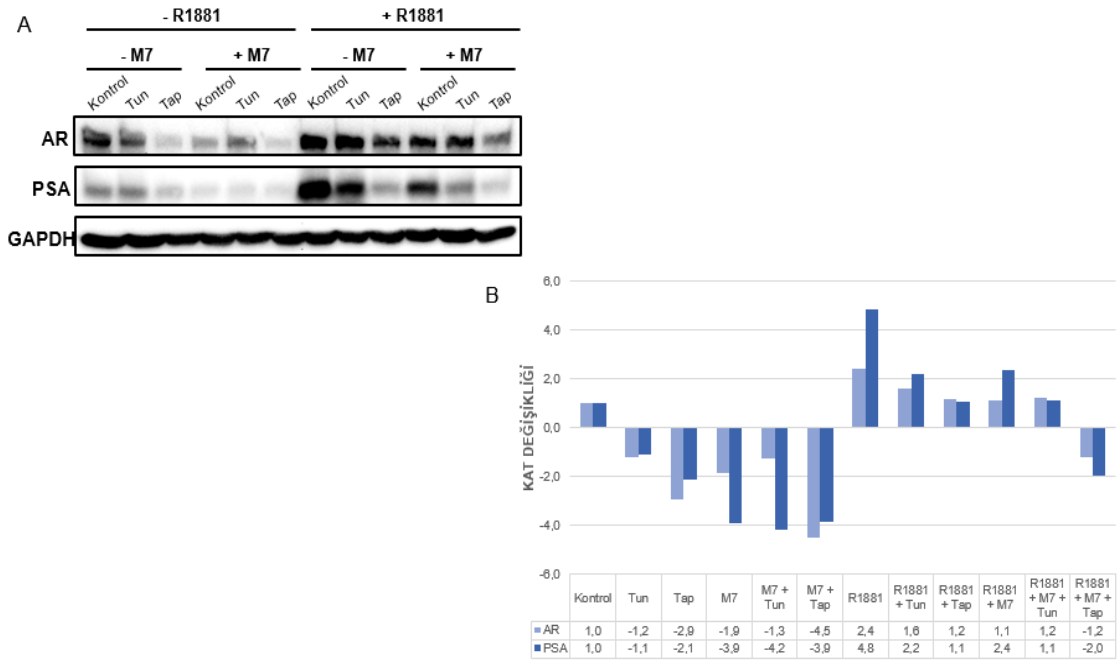
**Şekil 4.15.** A) LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması sonucu gözlenen ER stresi ile ilişkili proteinlerin ifadelerinin karşılaştırmalı şekilde incelenmesi (GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.) B) LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile BiP ve CHOP'un kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri. C) LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve M7 uygulaması

sonucunda Image J yazılımı ile EIF2 $\alpha$ , pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$  ve PERK'in kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri AR ve PSA protein seviyelerinin incelenmesinin ardından ER stresinde rol oynayan hedef proteinlerin seviyesindeki değişiklikler araştırıldı. Şekil 4.15.A ve B'de görüldüğü üzere, tek başına M7 uygulanan LNCaP hücrelerinde BiP ve CHOP proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 1,1 ve 1,3 kat artış olduğu belirlendi. Tunukamisın tek başına uygulandığında BiP'te 3,8 kat artış gözlenirken; M7 ile birlikte uygulandığında 3 kat artış olduğu gözlemlendi. Ek olarak Tunukamisın uygulaması yapıldığında CHOP'un ekspresyon seviyesi 1,2 kat artarken; M7 ve Tunukamisın birlikte uygulandığında CHOP'un ekspresyon seviyesindeki artışın 1,9'a yükseldiği saptandı. Tek başına Tapsigargin uygulamasında BiP'in ekspresyon seviyesi 17,2 kat artarken; M7 ve Tapsigargin uygulamasıyla bu artış seviyesi 17,7'ye yükseldi. Tek başına Tapsigargin uygulandığında CHOP ekspresyon seviyesinde 5,3 kat artış saptandı ve M7 ile birlikte uygulandığında ise bu artış seviyesi yaklaşık 2 kat artarak 10,3'e yükseldi.

Şekil 4.15 A ve C incelendiğinde, LNCaP hücrelerine tek başına M7 uygulandığında EIF2 $\alpha$  ve pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$  ekspresyon seviyeleri sırasıyla 1,6 ve 8,5 kat artarken; PERK'in ekspresyon seviyesi 1,4 kat azalış gösterdi. Tunukamisın uygulaması yapıldığında EIF2 $\alpha$  ve pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$ 'nin ekspresyon seviyeleri sırasıyla 1,2 ve 6 kat artarken; Tunukamisın ile birlikte M7 uygulandığında ise bu artış seviyeleri sırasıyla 2 ve 6,6 kata yükseldi. Yalnızca Tapsigargin uygulamasıyla EIF2 $\alpha$  ve pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$ 'nin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 1,5 ve 1,1 kat artış gözlenirken; M7 ile birlikte uygulandığında sırasıyla 1,9 ve 3,3 kat artış olduğu belirlendi. Tunukamisın uygulaması yapıldığında PERK'te anlamlı bir değişiklik gözlenmezken; M7 ile birlikte uygulandığında PERK'in ekspresyon seviyesinin 1,4 kat azaldığı belirlendi. Tapsigargin uygulaması yapıldığında ise PERK'in ekspresyon seviyesi 1,1 kat artarken; M7 ile birlikte uygulandığında 1,3 kat azalış gözlemlendi.

### 4.3.2. Örnek seti-2 (hormon deprivasyonlu koşullar)

Normal koşullarda hedef protein seviyelerinin incelenmesinin ardından, aktif karbon ile muamele edilmiş serum kullanılarak starve edilen LNCaP hücrelerinde hedef protein değişiklikleri araştırıldı. Yine aynı şekilde ilk olarak prostat kanseri gelişimi ile ilgili olan AR ve PSA protein seviyelerindeki değişiklikler sorgulandı.



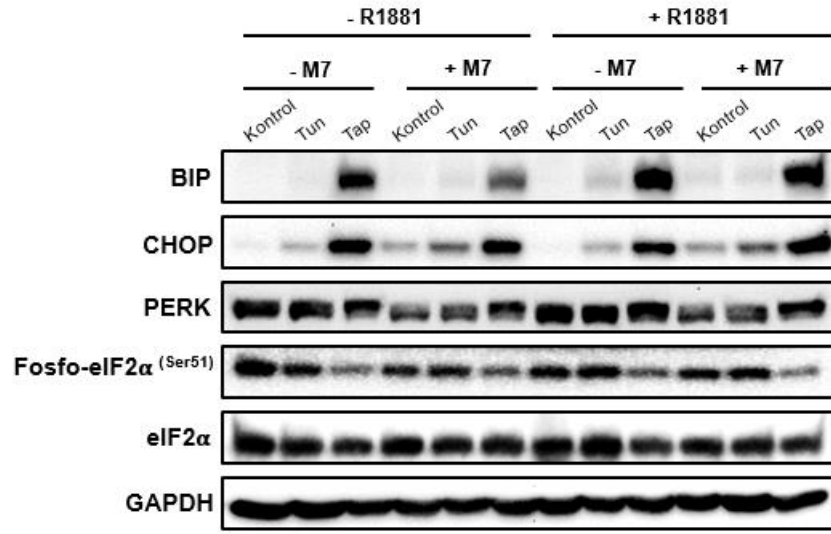
**Şekil 4.16. A)** Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucu gözlenen AR ve PSA protein ifadelerinin karşılaştırmalı şekilde incelenmesi (GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.) **B)** Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile AR ve PSA'nın kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, genel bir inceleme yapıldığında tüm uygulamalar için AR ve PSA seviyelerinin normal koşullara göre hormon deprivasyon koşullarında seviyelerinin azaldığı ve sentetik androjen R1881 uygulaması ile birlikte ise seviyelerinin artmış olduğu belirlendi. Spesifik olarak yapılan uygulamalardaki değişiklikler göz önüne alındığında ise tek başına M7 uygulanan hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerinde AR ekspresyon seviyesinin 1,9 kat azaldığı saptandı. Tunukamisin ve Tapsigargin uygulamalarında AR'nin ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1,2 ve 2,9 katlık azalış olduğu

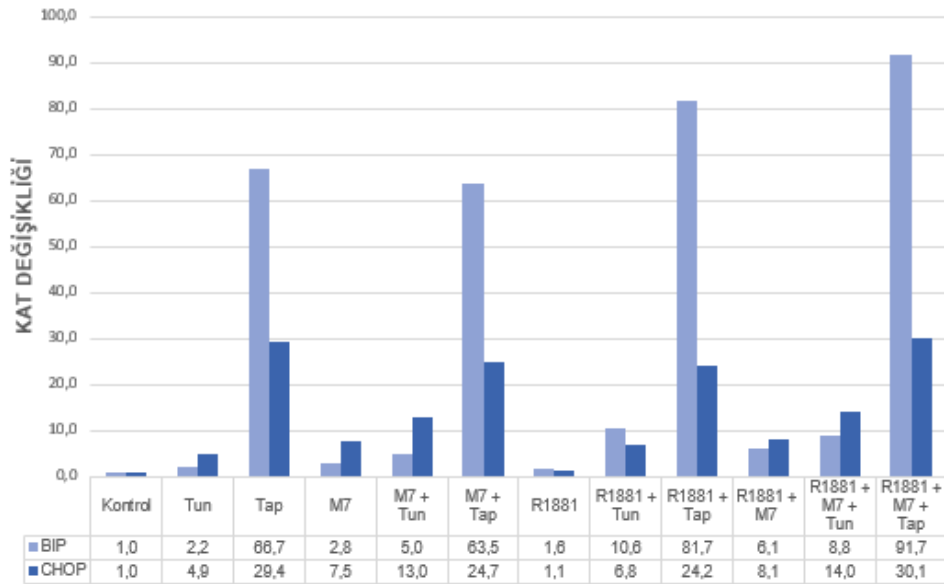
gözlendi. Tunukamisin ve Tapsigargin ile birlikte M7 uygulandığında ise AR'nin ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1,3 ve 4,5 katlık azalış olduğu belirlendi. R1881 ile birlikte 2,4 kat artan AR seviyesinin, M7 ile birlikte 1,1 kata gerilediği gözlemlendi. Yine aynı şekilde R1881 ile artan AR seviyesinin Tunakamisin ve Tapsigargin uygulamasıyla birlikte sırasıyla 1,6 ve 1,2 kata gerilediği saptandı. R1881+M7+Tunukamisin ve R1881+M7+Tapsigargin kombinasyonlarında ise artan AR seviyelerinin azaldığı, R1881'e kıyasla sırasıyla 2 ve 3 katlık azalışlar olduğu belirlendi.

AR seviyesindeki değişiklikler ile uyumlu olacak şekilde tek başına M7 uygulanan hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerinde PSA'nın ekspresyon seviyesi 3,9 kat azalırken; Tunukamisin ve Tapsigargin uygulaması ile sırasıyla 1,1 ve 2,1 kat azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte M7 ile birlikte Tunukamisin ve Tapsigargin'in gösterdiği inhibisyon etki artarak PSA ekspresyon seviyesinin sırasıyla 4,2 ve 3,9 kat azaldığı belirlendi. R1881 uygulaması yapıldığında PSA'nın ekspresyon seviyesi 4,8 kat artarken; M7 ile birlikte bu artışın 2 kat azaldığı gözlemlendi. Tunakamisin ve Tapsigargin varlığında ise R1881 ile artan PSA seviyesinin azalarak sırasıyla 2,2 ve 1,1 kata gerilediği saptandı. R1881, M7 ve Tunukamisin birlikte uygulandığında PSA düzeyi bazal seviyeye gerilerken, R1881, M7 ve Tapsigargin birlikte uygulandığında ise bazal seviyenin altında olacak şekilde 2 kat daha fazla azaldığı belirlendi. Sonuç olarak M7 bor bileşiğinin inhibisyon etkisi göstererek, PSA ve AR seviyelerini hem normal koşullarda hem de R1881 ile ekspresyonlarının indüklendiği koşullarda azalttığı saptandı.

Hormon deprivasyonlu koşullarda AR ve PSA protein seviyelerinin incelenmesinin ardından ER stresinde rol oynayan hedef proteinlerin seviyesindeki değişiklikler araştırılarak, bor bileşiği M7'nin Hormon deprivasyonlu koşullardaki etkinliği sorgulanmaya çalışıldı.

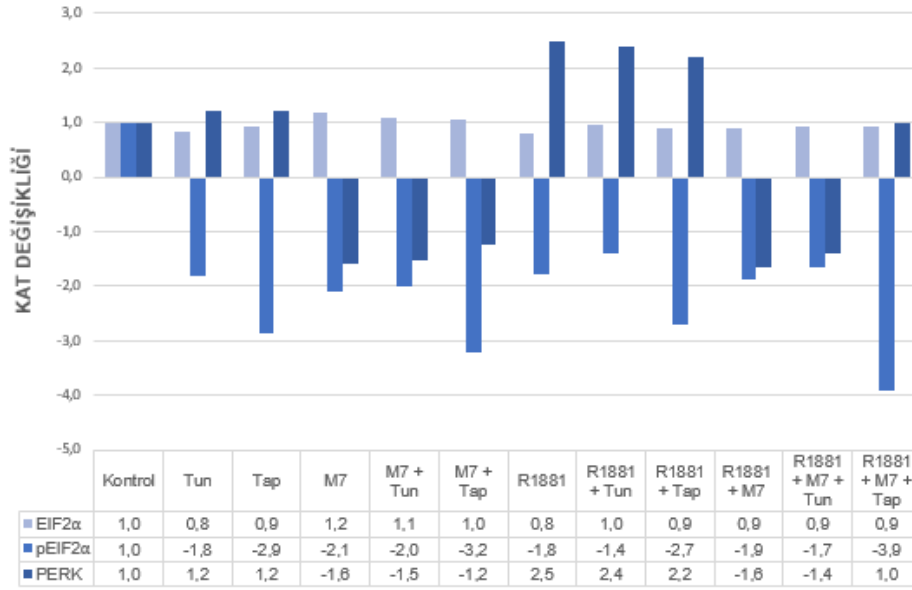


**Şekil 4.17.** Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucu gözlenen ER stresi ile ilişkili proteinlerin ifadelerinin karşılaştırmalı şekilde incelenmesi (GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.)



**Şekil 4.18.** Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile BİP ve CHOP'un kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri





**Şekil 4.19.** Hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerine M7, ER stresi ajanları ve R1881 uygulaması sonucunda Image J yazılımı ile EIF2α, pEIF2α<sup>(Ser51)</sup> ve PERK'in kat cinsinden elde edilen ekspresyon değişiklikleri

Şekil 4.17'deki western görüntüleri ile Şekil 4.18'deki kat değişiklikleri incelendiğinde, tek başına M7 uygulanan hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerinde BiP ekspresyon seviyesinin 2,8 kat, CHOP ekspresyon seviyesinin 7,5 kat arttığı belirlendi. Tek başına Tunikamisin uygulamasında BiP ve CHOP seviyesi sırasıyla 2,2 ve 4,9 kat; tek başına Tapsigargin uygulamasında BiP ve CHOP seviyesi sırasıyla 66,7 ve 29,4 kat arttığı gözlemlendi. M7 varlığında Tunikamisin'in daha da fazla ER stresine yol açarak sırasıyla BiP ve CHOP seviyelerinin 5 ile 13 kat artmasına neden olduğu saptandı. Tapsigargin uygulamasında oldukça yüksek olan BiP ve CHOP kat artışlarının, M7 varlığında çok anlamlı değişiklik göstermediği gözlemlendi. Sentetik androjen R1881 uygulamasında BiP ekspresyon seviyesinin 1,6 kat arttığı ancak CHOP ekspresyon seviyesinin değişmediği saptandı. BiP ekspresyon seviyesinde R1881 ile birlikte Tunikamisin ve Tapsigargin uygulaması yapıldığında sırasıyla 10,6 ve 81,7 kat artış gözlemlendi. CHOP ekspresyon seviyesinde ise R1881 ile birlikte Tunikamisin ve Tapsigargin uygulaması yapıldığında sırasıyla 6,8 ve 24,2 kat artış gözlemlendi. M7 varlığında R1881 uygulaması yapıldığında BiP ve CHOP ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 6,1 ve 8,1 kat arttığı belirlendi. R1881, M7 ve Tunikamisin maddeleri beraber uygulandığında BiP ekspresyon seviyesinin 8,8

kat artış gösterdiği; CHOP ekspresyon seviyesinin de 14 kat artış gösterdiği saptandı. Son olarak R1881, M7 ve Tapsigargin maddeleri uygulanan LNCaP hücrelerinde BiP ekspresyonununun 91,7 kat arttığı, CHOP ekspresyonununun da 30,1 kat arttığı belirlendi.

Şekil 4.17'deki western görüntüleri ile Şekil 4.19'daki kat değişiklikleri incelendiğinde, starve edilen LNCaP hücrelerinde hem tek olarak hem de birlikte yapılan tüm uygulamalarda toplam EIF2 $\alpha$  protein seviyesinde anlamlı kat değişiklikleri gözlenmedi. Bununla birlikte pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$  fosforilasyon seviyeleri incelendiğinde yapılan tüm uygulamalarda belirli seviyelerde azalışlar olduğu saptandı. M7 uygulaması yapıldığında pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$ 'nin ekspresyonu 2,1 kat azalırken; Tunukamisin ve Tapsigargin uygulaması yapıldığında sırasıyla 1,8 ve 2,9 kat azaldığı belirlendi. M7 varlığında Tunukamisin ve Tapsigargin uygulandığında pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$ 'nin ekspresyon seviyesinde sırasıyla 2 ve 3,2 kat düşüş gözlemlendi. Tek başına R1881 uygulaması yapıldığında pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$ 'nin ekspresyonu 1,8 kat azalırken; R1881 ile birlikte Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 uygulaması yapıldığında sırasıyla 1,4, 2,7 ve 1,9 kat azalış olduğu belirlendi. pEIF2 $\alpha^{(Ser51)}$ 'nin ekspresyon seviyesinin R1881, M7 ve Tunukamisin maddeleri birlikte uygulandığında 1,7 kat, R1881, M7 ve Tapsigargin maddeleri birlikte uygulandığında 3,9 kat azaldığı gözlemlendi.

Son olarak Şekil 4.19'daki kat değişikliklerine bakıldığında, hormon deprivasyonlu LNCaP hücrelerinde Tunukamisin ve Tapsigargin uygulamalarıyla 1,2 kat artan PERK protein seviyesinin, M7 ile birlikte 1,6 kat azaldığı gözlemlendi. Tunukamisin ve Tapsigargin ile artan PERK protein seviyelerinde M7 varlığında düşüş göstererek sırasıyla 1,5 ve 1,2 kat azaldığı belirlendi. R1881 uygulaması yapıldığında PERK ekspresyonu 2,5 kat artarken; R1881 ile birlikte Tunukamisin ve Tapsigargin uygulandığında sırasıyla 2,4 ve 2,2 kat artış olduğu belirlendi. Tunukamisin ve Tapsigargin benzer şekilde R1881 uygulaması ile artan PERK protein seviyesinin M7 varlığında azaldığı gözlemlendi. M7 varlığının R1881, R1881 + Tunukamisin ve R1881 + Tapsigargin uygulamalarında artan PERK seviyesini sırasıyla 4,1, 3,8 ve 1,2 kat azalttığı belirlendi.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hatalı katlanan ya da agrege olan proteinler potansiyel olarak hücreler için sitotoksiktir. Hücreler bu anormal proteinlerin kontrol edilmesi ve uzaklaştırılması için güçlü bir kontrol sistemi geliştirmiştir. Bu kalite kontrol sistemiyle hücresel süreçler sıkı şekilde denetlenir; protein yapılarının ayırımı yapılarak yalnızca nihai formlarına ulaşmış ve fonksiyonel olarak aktif proteinlerin ER'den çıkışına izin verilir (Nishikawa ve ark. 2005). Agrege olmaya eğilimli hatalı katlanan ya da katlanamamış proteinler, ER'deki protein kalite kontrol sisteminde yer alan moleküler şaperonlar tarafından tanınır ve onlara bağlanıp etkisiz hale gelmeleri sağlanır. Hatalı formdaki proteinlerin ER lümeninde birikmesi sonucu serbest şaperon seviyeleri azalır ve ER stresi adı verilen sürecin başlaması tetiklenir (Lin ve ark. 2007). Hücreler bu stres ile ER'nin protein katlama kapasitesini arttırarak ve hatalı katlanan proteinleri protein yıkım sürecine yönlendirip etkisiz hale getirerek başa çıkar. Bu amaçla hücrede UPR adı ile bilinen bir yolak devreye girer. Böylelikle katlanma süreci ve proteozoma hedeflemede görev alan proteinlerin ifadelerini arttıran özelleşmiş transkripsiyon süreci başlar (Nishikawa ve ark. 2005). Bunlara ek olarak, ER'de yanlış katlanmış proteinler, yanlış katlanmış protein tanıma ile başlayan, ardından ubikitinasyon, sitozole retrotranslokasyon, deglikozilasyon ve bozunma için proteazomu hedefleyen ERAD olarak bilinen bir işlemle elimine edilir (Ballar ve ark. 2007).

Bu çalışmada birinci amacımız bor ve türevlerinin ER stresine etkisinin ve mekanizmasının araştırılması olduğundan çalışmalarımıza ilk olarak bor türevlerinin anti-proliferatif etkileri olup olmadığını sorgulamak amacıyla sitotoksite analizleri ile başlandı ve MTT analizleri ile M7'nin etkin bir anti-proliferatif ajan olabileceğine ilişkin sonuçlar elde edildi. Bu çalışmalar ile bor bileşiğinin IC<sub>50</sub> değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 145,7, 90,99 ve 25,50 µM olarak belirlendi ve etki mekanizmalarını araştırmak için yapılan diğer fonksiyonel çalışmalar IC<sub>50</sub> değerlerine yakın konsantrasyon aralıkları kullanılarak gerçekleştirildi.

Biz bu tez çalışması kapsamında prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP hücrelerine ER stresi ajanları ve bor bileşeni M7 uygulamaları yaparak ER stresi ve ERAD ile ilişkili

genlerdeki değişimleri ve altında yatan mekanizmayı gözlemlemeyi amaçladık. Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bor bileşiği M7'nin ER stresi ve prostat kanseriyle ilişkisinin araştırılmasına odaklı çalışmalar gerçekleştirildi.

*AR* geni androjen reseptörü olarak adlandırılan bir proteini kodlar. Androjenler doğumdan önce ve ergenlik döneminde normal erkek cinsel gelişimi için önemli olan hormonlardır. Androjen reseptörleri vücudun bu hormonlara uygun şekilde tepki vermesini sağlar. Androjen ile düzenlenen genler, erkek cinsel fenotipinin geliştirilmesi ve sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir (Abate-Shen ve ark. 2008). Çalışmada normal koşullar altında LNCaP hücrelerine Tunukamisin, Tapsigargin gibi ER stresi yaratan ajanlar ve M7 gibi yeni sentez bor bileşiği uygulandı. Bu uygulamalar sonucunda *AR* ve *PSA* geninin ekspresyonunda anlamlı düşüşler elde edildi. *AR* geninin transkripsiyonel regülasyonu incelendiğinde (Şekil 4.3.), M7 ile birlikte 6,6 kat olacak şekilde yüksek oranda bir aşağı regülasyon olduğu ve ayrıca Tunukamisin ve Tapsigargin ile sinerjik etki göstererek *AR* mRNA seviyesinin daha da fazla azalmasına yol açtığı sonucuna varıldı. *AR*'nin hedef genlerinden biri olan *PSA* mRNA seviyeleri incelendiğinde ise (Şekil 4.3.) *AR* gen ekspresyonundaki azalışa bağlı olarak M7 ile birlikte *PSA* ekspresyon seviyesinin de düştüğü ve *AR*'ye göre kat azalışlarının çok daha yüksek oranlarda gerçekleştiği belirlendi.

LNCaP hücrelerinde *AR* ve *PSA* genlerinin transkripsiyonel regülasyonlarının incelenmesinin ardından normal ve hormon deprivasyon koşullarında bor bileşiği M7'nin ve ER stresinin *AR* ve *PSA* protein seviyelerine olan etkisi araştırıldı. Normal koşullarda ER stresi ajanları varlığında özellikle Tapsigargin ile birlikte *AR* ve *PSA* protein seviyelerinin etkili bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 4.14.). M7 uygulaması ile *AR* protein seviyesinde belirgin bir değişiklik gözlenmezken, *PSA* protein seviyesinin 1,7 kat azaldığı bununla birlikte M7'nin hem Tunukamisin hem de Tapsigargin ile sinerjik bir etki göstererek protein seviyelerinin daha da fazla azalmasına yol açtığı saptandı (Şekil4.14.). Hormon deprivasyonlu örnek setindeki R1881 olmayan ilk 6 grup örneğinde, normal koşullarda elde edilen sonuçlarla uyumlu bir şekilde *AR* ve *PSA* seviyelerinde Tunukamisin uygulamasıyla anlamlı bir değişim elde edilememişken; Tapsigargin ve M7 ile birlikte azalışlar gözlemlendi (Şekil 4.16.). Benzer şekilde M7,

Tunukamisin ve Tapsigargin ile sinerjik etki göstererek ekspresyon seviyelerindeki azalma miktarını daha da fazla artırdı (Şekil 4.16.). Dolayısıyla sonuçların birbiriyle uyumlu ve birbirini destekliyor olduğu düşünüldü. Androjen uygulamasıyla da beklendiği gibi AR'de 2 kat, PSA'da ise 4 katlık artış olduğu belirlendi. R1881 ile olan bu artışın, Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 maddelerinin tek başlarına uygulanması sonucu azaldığı gözlenirken; kombinasyon uygulamalarının daha da fazla bir azalmaya yol açtığı gözlemlendi (Şekil 4.16.).

PSA, sağlıklı prostatlara sahip erkeklerin serumunda küçük miktarlarda bulunur, ancak genellikle prostat kanseri veya diğer prostat rahatsızlıklarının varlığında yükselir. PSA indüksiyonundan sorumlu olan en önemli transkripsiyon faktörü ise AR'dir (Tyloch ve Wieczorek 2017). AR prostat bezinin normal büyümesi ve gelişiminde, prostat kanserinde ve androjen-bağımsız hastalığa geçişte oldukça önemli rol oynamakta ve AR ile düzenlenen genlerin ürünleri (PSA, NKX3.1, TMPRSS2, KLK2, TSC22 ve B2M gibi) hücrede androjenlerin etkisine aracılık etmektedir (Bennett ve ark. 2010). Bu çalışmada bor bileşiği ve ER stresi varlığında, prostat kanseri gelişiminde önemli olan AR ve PSA genlerinin hem transkripsiyonel hem de translasyonel regülasyonları incelendi. Özellikle Tapsigargin ile yaratılan ER stresi koşullarında AR ve PSA mRNA ve protein seviyelerinde daha yüksek oranlarda azalışlar elde edildi. Tapsigargin ATP'ye bağlı ER  $Ca^{+2}$  pompasını (SERCA) inhibe ederek endoplazmik retikulumdaki  $[Ca^{+2}]$  miktarını düşürmektedir (Henderson ve ark. 2014). Hücre içi kalsiyum seviyelerinin ise LNCaP hücrelerinde AR gen ekspresyonunun potansiyel bir regülatörü olduğu rapor edilmiştir (Gong ve ark. 1995). Bu bağlamda Tapsigargin uygulaması ile AR seviyesinin ve buna bağlı olarak da PSA seviyesinin daha yüksek oranda azaldığı düşünülmektedir.

Bor ve bor bileşikleri; peptidaz, proteaz, proteazom, arginaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidaz gibi enzimlerin etkili bir inhibitörü olarak fonksiyon göstermekte ve bu nedenle kemo-koruyucu olarak önem taşımaktadır (Mcauley ve ark. 2011, Bradke ve ark. 2008, Gallardo-Williams ve ark. 2003). Prostata özgü antijen (PSA), prostat kanserinin klinik yönetiminde bir biyobelirteç olarak yaygın kullanılan normal ve habis prostat epitel hücreleri tarafından yüksek seviyelerde üretilen bir serin proteazdır (Kostova ve ark. 2013). Bir serin proteaz inhibitörü olarak borun prostat kanseri ile arasındaki biyolojik

olarak ters olan ilişkinin ise, cis-diol bağlantıları aracılığıyla testesteronu ve PSA fonksiyonunu etkilemesi nedeniyle steroid hormonlara, metabolik regülasyona, anti-tümör metabolitlere ve hücre proliferasyonunun regülasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (Nielsen ve Meacham 2011). Gallardo-Williams ve arkadaşları borik asit ve 3-nitrofenil boronik asitin PSA'nın proteolitik aktivitesini inhibe ettiğini bulgulamışlardır ve bu durumun prostat adenokarsinomu gelişimini ve hücre proliferasyonunu azaltabileceğini düşünmektedirler (Gallardo-Williams ve ark. 2003). 2003 yılında yapılan bir çalışmada 26S proteazom inhibitörü ve bir boronik asit dipeptid olan bortezomibin, LNCaP hücrelerinde p21 ve p53 seviyelerini artırırken, PSA seviyesini azalttığı ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Bortezomib aynı zamanda nukleustaki bazal AR seviyelerini azaltırken, DHT indüklü AR nükleer translokasyonunu etkilememiştir (Ikezoe ve ark. 2004). Ek olarak kandaki yüksek BA miktarının intrasellüler  $Ca^{+2}$  sinyalini ve depolanmasını azaltarak prostat kanseri riskini düşürdüğü düşünülmektedir (Henderson ve ark. 2009). Bu tez çalışması kapsamında yapılan denemeler sonucunda hem normal hem de hormon deprivasyonlu koşullarda ve ayrıca sentetik androjen ile protein seviyesi artırıldığında M7 bor bileşiğinin, AR ve PSA seviyelerinin azalmasına; Tunukamisin ve Tapsigargin ile sinerjik bir etki göstererek bu azalışın daha da fazla olmasına yol açtığına dair veriler elde edildi. M7'nin BA'e benzer şekilde  $Ca^{+2}$  sinyalini ve depolanmasını etkileyebilme olasılığından dolayı M7 ve Tapsigargin kombinasyonlarında gözlenen etkilerin daha yüksek olabileceği düşünüldü. Sonuç olarak M7 bor bileşiğinin prostat kanseri tedavisinde umut verici bir kemoterapötik ajan olabileceği ve özellikle Tapsigargin ile kombine edilerek uygulanabilir olduğu kanısına varıldı.

Bu tez çalışmasında M7 ve ER stresi varlığında ERAD sinyal yolağında rol oynayan hedef genlerin transkripsiyonel regülasyonları QRT-PCR metodolojisi ile araştırıldı. Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13' deki sonuçlar göz önüne alındığında, LNCaP hücrelerine yapılan madde uygulamalarıyla ERAD ile ilişkili *SVIP*, *VCP*, *SYVN*, *UFD1* ve *AMFR* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı kat değişiklikleri elde edilemedi. *SVIP* literatürde ilk tanımlanan endojen ERAD inhibitörü proteindir ve ERAD aktivitesini negatif yönde regüle eden önemli bir eleman olarak çalışmaktadır (Ballar ve ark. 2007). Bu gen tarafından kodlanan protein ERAD'ın inhibitörüdür. Yani hücrenin aşırı aktif

degradasyonundan korunması için gereklidir. Yapılan uygulamalarla ER stresi dolayısıyla ERAD indüklendiği için artan degradasyonun önüne geçmek amacıyla *SVIP* geninin ekspresyonunda da anlamlı bir artış gözlemeyi hedeflemekteydik. *VCP* geninin kodladığı protein ER stresine yanıtta rol oynadığı için gen ekspresyonunda artış gözlenmesi beklenmekteydi. *SYVN* tarafından kodlanan protein, ER stresi sırasında biriken katlanmamış proteinleri ER'den sitozole uzaklaştırır. Bu protein aynı zamanda katlanmamış proteinlerin ilave bozunması için ubiquitin-proteazom sistemini kullanır (GeneCards 2021). Yapılan madde uygulamalarıyla ER stresinin uyarılmasında rol oynadığı için *SYVN* gen ekspresyonunun da artmasını beklemekteydik. ERAD ile ilişkili genlerden sadece *DNAJC10* (Şekil 4.8.) ve *XBPI*'de (Şekil 4.7) anlamlı artışlar olduğu gözlemlendi, diğer genlerde ise anlamlı değişimler gözlenemedi. *DNAJC10* geni, Heat Shock proteinlerinin ATPase aktivitesini kontrol ederek birçok hücresel süreçte rol oynar. Bu gen, yanlış katlanmış proteinlerin tanınmasında ve parçalanmasında rol oynayan ERAD kompleksinin bir parçası olan bir endoplazmik retikulum yardımcı şaperonunu kodlar. Kodlanmış protein, yanlış katlanmış glikoproteinlerdeki yanlış disülfid bağlarını azaltır ve strese giren hücreleri apoptozdan korumaktadır (GeneCards 2021). ER stresi tarafından indüklenen bir proteini kodlayan ve stresli hücrelerin apoptozdan korunmasında rol alan bir diğer gen *DNAJB9*'dir (GeneCards 2021). Normal koşullarda LNCaP hücrelerine ER stres ajanları ve M7 uygulamasıyla genel olarak *DNAJB9* mRNA'sında artış gözlemlendi. M7 tek başına gen ekspresyonunu artırırken özellikle Tunukamisın ile sinerjik etki göstererek daha fazla bir artışa yol açtı (Şekil 4.7). Bu sonuçlar doğrultusunda M7'nin ERAD için şaperon proteinler ve ATPase aktivitesi üzerinden etki gösteriyor olabileceği kanısına varıldı. Sonuç olarak M7'nin hem tek başına hem de diğer ajanlar ile birlikte sinerjik olarak ER stresinin artmasına yol açtığına dair kanıtlar elde edildi. Bununla birlikte M7 bor bileşiğinin tek bir süre (48 saat) ve tek bir dozda (200 µM) uygulanmasının ERAD sinyal yolağında gözlenebilecek değişikliklerin belirlenmesinde bir kısıtlama olduğu, doz ve süreler genişletildiğinde bor bileşiği ile ERAD regülasyonuna dair daha açıklayıcı bilgiler elde edilebileceği düşünülmektedir. Ek olarak kaspaz 3-9 ve PARP gibi apoptoz ilişkili proteinlerin seviyesinin de incelenmesi ve M7 bor bileşiğinin apoptoz regülasyonundaki rolünün de sorgulanması gerektiği düşünülmektedir.

*XBP-1* yalnız başına ya da diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte transkripsiyonel programı aktive ederek ERAD, ER stresi, ER genişlemesi ve protein sekresyonu için gerekli olan şaperonlar ile fosfolipitlerin ve ER biyogenezi için gerekli olan bileşenlerin sentez programını başlatır. Ire1 $\alpha$  - XBP-1 yolağı ER stresi ile baş edilebilmesi ve ER'nin protein katlama kapasitesinin arttırılabilmesi için hücrelerde majör araç olarak görev alır (Lee 2005). *ERN1* geni IRE1'i kodlamaktadır. Bu protein, endoplazmik retikulumda katlanmamış proteinlerin bir sensörü olarak işlev görür, UPR olarak adlandırılan hücre içi sinyal yolunu tetikler ve özellikle *XBP-1* eklenmesine ve aktivasyonuna aracılık eder (GeneCards 2021). Bu tez çalışmasında sadece Tapsigarginle yapılan uygulamalarla *ERN1* gen ekspresyonunda anlamlı artışlar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5.). M7 varlığında Tapsigargin uygulandığında ise, M7'nin Tapsigargin ile sinerjik etki göstererek artış kat sayısını yükselttiği belirlendi (Şekil 4.5.). IRE1'de gözlenen artışa bağlı olarak Tapsigargin uygulamasında *XBPI* geni ekspresyon seviyesinde Annemarie van Schadewijk ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmalarla uyumlu bir şekilde artış gözlemlendi (Şekil 4.7.) (Schadewijk ve ark. 2011). Bununla birlikte M7 varlığında ER stres ajanları uygulandığında *XBPI* geni için M7'nin sadece Tunukamisinin etkisini arttırdığı; Thapsigargin'i ise etkilemediği saptandı.

*EIF2AK3* geni PERK proteinini kodlar. Aktive edilmiş PERK, protein sentezini azaltan eIF2 $\alpha$  alt birimini fosforile eder. Ancak eIF2 $\alpha$ , paradoksal olarak ATF4'ünki gibi mRNA'ların translasyonunu artırır. ATF4, sırayla, transkripsiyon faktörü CHOP proteininin up regülasyonunu içeren bir transkripsiyonel programı başlatır. ATF4 ve CHOP, protein sentezindeki fonksiyonları kodlayan genlerin ekspresyonunu iş birliği içinde uyarır ve yeniden aktive edilmiş çeviri oranı, apoptozu indükleyen önemli miktarlarda ROS üretir (Sarcinelli ve ark. 2020). CHOP proteinini kodlayan gen *DDIT3* genidir. CHOP, ölümü hızlandıran mitokondrilerin sitokrom c sızıntısını ve ölümü başlatan kaspaz 3 adlı enzimin etkinleşmesine sebep olur (Yoshida 2007). ATF4, *DDIT3*/CHOP ile birlikte, hücrel amino asit metabolik süreçlerinde yer alan genlerin ekspresyonunu, mRNA translasyonunu ve ER stresine yanıt olarak katlanmamış protein yanıtını teşvik ederek ER aracılı hücre ölümüne aracılık eder. Bu çalışmada elde edilen bulgular incelendiğinde normal koşullarda M7 ile birlikte LNCaP hücrelerinde *EIF2AK3* gen ekspresyonunda anlamlı değişimler gözlenmedi (Şekil 4.5.). Bu sonuçla uyumlu



olacak şekilde M7 uygulandığında PERK'in protein seviyesinde de anlamlı artışlar gözlenmedi (Şekil 4.15.). Ters olarak, M7 varlığının p $eIF2\alpha^{(Ser51)}$  ve  $eIF2\alpha$ 'da artışa sebep olduğu gözlemlendi. Tunukamisın ve Tapsigargin ile birlikte uygulandığında da sinerjik etki göstererek artış miktarını yükselttiği belirlendi (Şekil 4.15.). Literatür bilgilerine göre  $eIF2\alpha$ 'yı fosforilleyen PERK olmasına karşın bu çalışmada PERK'in mRNA ve protein seviyesinde bir değişiklik gözlenmemesine rağmen M7 ile birlikte p $eIF2\alpha^{(Ser51)}$  artmasının sebebinin başka bir kinaz tarafından fosforilasyonun gerçekleşebileceği olasılığını ortaya çıkarmıştır. *ATF4*'ün mRNA seviyelerindeki artışlar da M7 ile beraber Tunukamisın ve Tapsigargin uygulaması yapıldığında,  $eIF2\alpha$ 'nın artışıyla uyumlu seyretmiştir (Şekil 4.4.). *DDIT3* gen ekspresyonu (Şekil 4.6) ve CHOP'un protein seviyelerine (Şekil 4.15.) bakıldığında da tüm bu elde edilen verileri destekleyen uyumlu artışlar elde edilmiştir. Hem mRNA hem de protein seviyelerinde elde edilen bulgular genel itibarıyla birbirleriyle uyumlu bir şekilde anlamlı artışlar göstermiştir. Sonuç olarak yeni sentez bor bileşiği M7'nin, Tunukamisın ve Tapsigargin ile birlikte sinerjik etki gösterdiği ve bunların ER stresine olan etkisini arttırdığı kanısına varılmıştır.

*HSPA5* geni BiP proteinini kodlamaktadır. BiP, UPR'de ana regülatör olarak görev almaktadır. UPR yolağı, ER membranında BiP proteinine bağlı inaktif formda tutulan ve IRE1, ATF6 ve PERK olarak adlandırılan lokalize 3 adet transmembran özellikteki ER sensör proteini aracılığıyla kontrol edilmektedir. ER stresinin indüksiyonu sonrası represör olarak görev yapan BiP'in sensörlerden uzaklaşması, ER sensör proteinlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Nishikawa ve ark. 2005). Bu çalışmada elde edilen sonuçlara bakıldığında normal koşullarda M7'nin tek başına mRNA (Şekil 4.6.) ve protein (Şekil 4.15.) seviyesinde anlamlı bir artışa yol açmadığı ancak özellikle Tapsigargin ile uygulandığında sinerjik etki gösterdiği ve hem mRNA seviyesinde hem de protein seviyesinde anlamlı artışlara sebep olduğu belirlendi. Bununla birlikte ATF6'nın BiP tarafından kontrol edildiği göz önüne alındığında sadece Tapsigargin uygulanmasında ATF6 mRNA seviyelerinin de uyumlu olarak arttığı belirlendi.

Hormon deprivasyon koşullarında hücreler aç bırakıldığından, bu süreç hücrelerde ayrıca stres yaratan bir durumdur (Donnelly ve ark. 2013). Buna bağlı olarak bu tez

çalışmasında, hormon deprivasyon koşullarındaki LNCaP hücrelerinde BiP ve CHOP seviyesindeki artışların hormon deprivasyonsuz hücelere oranla çok daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.18). R1881 sentetik bir androjen olduğundan AR ve PSA gibi hormonal olarak regüle edilen birçok proteinin sentezinin artmasına yol açmasını beklemekteydik. Protein sentezinin artması da ER'nin daha fazla çalışmasına yol açarak stresin artışı tetikleyeceğinden dolayı, denemeler sonucunda uyumlu bir şekilde R1881 ile birlikte hem Tunukamisin ve Tapsigargin hem de M7'nin ER stresini daha yüksek oranda tetiklediği belirlendi. Bunun dışında M7'nin de hem tek başına hem de Tunukamisin ve Tapsigargin ile birlikte ER stresinin artmasına yol açtığı sonucuna varıldı (Şekil 4.17).

Hormon deprivasyonlu hücrelerde Tunukamisin ve Tapsigargin uygulamasıyla PERK protein seviyesinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.17.). Ancak R1881 ile birlikte PERK protein seviyesinin bir miktar artışının hem BiP ve CHOP artışıyla hem de protein sentezinin artışıyla uyumlu olduğu düşünülmektedir. Ancak bu az miktardaki artış eIF2 $\alpha$ <sup>(Ser51)</sup> fosforilasyon seviyesinin artmasına yol açmamıştır. Bununla birlikte ilginç olarak M7 varlığında ise PERK seviyesinin azaldığı gözlemlendi. Benzer şekilde PERK'teki azalış ile birlikte eIF2 $\alpha$ <sup>(Ser51)</sup> fosforilasyonu seviyelerinde de azalmalar olduğu belirlendi (Şekil 4.19.). Hormon deprivasyon koşullarında Tunukamisin, Tapsigargin ve M7 ile birlikte ER stresi belirteçleri olan BiP ve CHOP'ta artışlar gözlenmesine rağmen, PERK ve eIF2 $\alpha$  fosforilasyon düzeylerinin azaldığı belirlendi. Bu bağlamda M7'nin ER stresini tetiklediği ancak BiP ve CHOP'taki artışları PERK yolağı üzerinden değil, IRE1 veya ATF6 üzerinden regüle edebileceği sonucuna varıldı. Ayrıca orta seviyelerdeki eIF2 $\alpha$ <sup>(Ser51)</sup> fosforilasyonunun translasyonu kısa bir süreliğine durdurarak hatalı proteinlerin yeniden düzenlenmesine yol açtığı, güçlü seviyedeki fosforilasyonun ise apoptozu tetiklediği rapor edilmiştir (Yamada ve Echert 2019). Dolayısıyla, eIF2 $\alpha$ <sup>(Ser51)</sup> fosforilasyonunun erken aşamalarda gerçekleşebileceği ve bu tez kapsamında bor bileşiği M7'nin uygulama süresi olarak sadece 48 saat kullanılması nedeniyle p-eIF2 $\alpha$ <sup>(Ser51)</sup> aktivasyonunun belirlenemediği, bu amaçla daha kısa süreli uygulamalar yapılması gerektiği ve bor bileşiği varlığında p-eIF2 $\alpha$ <sup>(Ser51)</sup> aktivasyonunun net olarak aydınlatılması gerektiği düşünüldü. Yine de BiP ve CHOP seviyelerinin yüksek olması nedeniyle M7'nin kalıcı ER stresine yol açtığı ve apoptotik hücre ölümünü destekleyebileceği

söylenbilir.

Bu tez kapsamında elde edilen tüm sonuçlar göz önüne alındığında, yeni sentez bor bileşiği M7'nin hem *AR* ve *PSA* seviyelerini düşürmesi hem de ER stresine yol açması nedeniyle prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı sonucuna varıldı. Fizyolojik BA konsantrasyonlarının eIF2 $\alpha$ , GRP78/BiP ve ATF4'ün hafif aktivasyonu ile ER stresine neden olduğunun rapor edildiği çalışma (Henderson ve ark. 2014) ile uyumlu olarak, bu çalışmada M7'nin de ER stresini tetiklediği ve ayrıca ER stresi ajanları Tunikamisin ve Tapsigargin ile birlikte sinerjik etki gösterdiği belirlendi. Ek olarak bu çalışma kapsamında M7 bor bileşiğinin gerek normal koşullarda gerekse hormon deprivasyon koşullarında BiP'e kıyasla daha yüksek oranda CHOP mRNA ve protein seviyesinin artmasına yol açtığı gözlemlendi. M7'nin tek başına ATF4 mRNA seviyesini artırdığı ve ayrıca ATF4 ile CHOP artışının apoptozu tetikleyen ROS üretimine yol açtığı (Sarcinelli ve ark. 2020) düşünüldüğünde, M7'nin apoptozu tetikleyerek hücre proliferasyonunun azalmasına neden olabileceği kanısına varıldı.

Sonuç olarak hem androjen bağımlı hem de androjen bağımsız prostat kanserinin gelişiminde kritik rol oynayan AR sinyalinin M7 bor bileşiği tarafından bloke edilmesi ve aynı zamanda ER stresinin tetiklenerek proliferasyonun inhibe edilmesinin önemli bir terapi seçeneği sunabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte doz ve süre uygulamaları genişletilerek daha farklı deney setlerinin kurulmasıyla ve aynı zamanda hormon deprivasyon koşullarında mRNA seviyelerinin, IRE1 ile ATF6 sinyal yollarının ve apoptoz regülasyonunun incelenmesi ile daha ayrıntılı sonuçlar elde edileceği ve literatüre faydalı bilgiler kazandıracağı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Abate-Shen, C., Banach-Petrosky, W.A., Sun, X., Economides, K.D., Desai, N., Gregg, J.P., Borowsky, A.D., Cardiff, R.D., Shen, M.M., (2003).** Nkx3.1; Pten mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Cancer Res.*, 63, 3886-3890.
- Abate-Shen, C., Shen, M.M. (2000).** Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & development*, 14, 2410-2434.
- Abate-Shen, C., Shen, M.M., Gelmann, E. (2008).** Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation*, 76, 717-727.
- Abdulkadir, S.A., Magee, J.A., Peters, T.J., Kaleem, Z., Naughton, C.K., Humphrey, P.A., Milbrandt, J. (2002).** Conditional loss of Nkx3.1 in adult mice induces prostatic intraepithelial neoplasia. *Mol. Cell Biol.*, 22, 1495- 1503.
- Alimirah, F., Chen, J., Basrawala, Z., Xin, H., Choubey, D. (2006).** DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett.*, 580, 2294-2300.
- Asatiani, E., Huang, W.X., Wang, A., Rodriguez Ortner, E., Cavalli, L.R., Haddad, B.R., Gelmann, E.P. (2005).** Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. *Cancer Res.*, 65, 1164-1173.
- ATCC: The Global Bioresource Center (2021).** <https://www.atcc.org/products/crl-1740> (Erişim tarihi: 04.04.2021)
- Bakirdere, S., Örenay, S., Korkmaz, M. (2010).** Effect of Boron on Human Health. *The Open Mineral Processing Journal*, 3, 54-59.
- Ballar, P., Zhong, Y., Nagahama, M., Tagaya, M., Shen, Y., Fang, S. (2007).** Identification of SVIP as an endogenous inhibitor of endoplasmic reticulum-associated degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 33908-33914.
- Barranco, W.T., Eckhert, C.D. (2004).** Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett.*, 216, 21–6.
- Bastiaansen, K.C., Otero-Asman, J.R., Luirink, J., Bitter, W., Llamas, M.A. (2015).** Processing of cell-surface signalling anti-sigma factors prior to signal recognition is a conserved autoproteolytic mechanism that produces two functional domains. *Environmental microbiology*, 17, 3263-3277.
- Basu, S., Tindall, D.J. (2010).** Androgen action in prostate cancer. *Hormones and Cancer*, 1(5), 223-8.

**Bennett, N.C., Gardiner, R.A., Hooper, J.D., Johnson, D.W., Gobe, G.C. (2010).** Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42, 813-827.

**Bethel, C.R., Faith, D., Li, X., Guan, B., Hicks, J.L., Lan, F., Jenkins, R.B., Bieberich, C.J., De Marzo, A.M. (2006).** Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res.*, 66, 10683-10690.

**Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A.A., Sciavolino, P.J., Kim, M., Desai, N., Young, P., Norton, C.R., Gridley, T., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., Abate-Shen, C., Shen, M.M. (1999).** Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev.*, 13, 966-977.

**Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H.J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, T.C., Koivisto, P., Lack, E.E., Kononen, J., Kallioniemi, O.P., Gelmann, E.P. (2000).** Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res.*, 60, 6111-6115.

**Bradke, T.M., Hall, C., Carper, S.W., Plopper, G.E. (2008).** Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adhesion & Migration*, 2(3), 153-160.

**Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., Quest, A.F.G., Lavandero, S. (2013).** Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 215-290.

**Chen, S., Chen, J., Hua, X., Sun, Y., Cui, R., Sha, J., Zhu, X. (2020).** The emerging role of XBP1 in cancer. *Biomed. Pharmacother.*, 127, 110069.

**Çelen, İ., Şenol, F., Müezzinoğlu, T. (2011).** Prostat kanserinde eser elementlerin rolü, *Üroonkoloji Bülteni*, 2, 27-32.

**Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S., Samali, A. (2013).** The eIF2 $\alpha$  kinases: their structures and functions. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 70(19), 3493–3511.

**Duydu, Y., Başaran, N., Üstündağ, A., Aydın, S., Ündeğer, Ü., Ataman, O.Y., Aydos, K., Düker, Y., Ickstadt, K., Waltrup, B.S., Golka, K., Bolt, H.M. (2011).** Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey. *Arch. Toxicol.*, 85, 589–600.

**Erbaykent Tepedelen, B., Korkmaz, M. (2020).** Effects of natural and synthetic boron compounds on cancer prevention and cancer treatment. M. Korkmaz (Ed.), *Boron and Human Health* (s. 129-147). Ankara: Nobel Yayın.

**Francis, J.C., Swain, A. (2018).** Prostate Organogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 8(7), a030353.

**Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., Sommer, T. (2000).** A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2, 379-384.

**Gallardo-Williams, M. T., Maronpot, R. R., Wine, R. N., Brunssen, S. H., Chapin, R. E. (2003).** Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *The Prostate*, 54(1), 44–49.

**GeneCards: The human gene database. (2021).** [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (Erişim tarihi: 9.06.2021)

**Gong, Y., Blok, L. J., Perry, J. E., Lindzey, J. K., Tindall, D. J. (1995).** Calcium regulation of androgen receptor expression in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Endocrinology*, 136(5), 2172–2178.

**Greenhill-Hooper, M.J. (2012).** Boron Science: New Technologies and Applications, ed: Hosmane, N.S., Vol:6, Pp:417, CRC Press-Taylor & Francis Group, New York.

**Guerriero, C.J., Brodsky, J.L. (2012).** The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiological reviews*, 92, 537-576.

**Hallstrom, T.A. (2007).** p53 and DNA damage checkpoint responses in the human prostate, Molecular and Cancer Biology Program, Biomedicum Helsinki, Department of Virology, Haartman Institute. University of Helsinki, Finland.

**Hazman, Ö., Bozkurt, M.F., Fidan, A.F., Uysal, F.E., Çelik, S. (2018).** Sisplatin toksikasyonunda ve toksikasyon sonucu gelişen nefrotoksisitede borik asit ve boraksın oksidatif stres, inflamasyon, ER stresi ve apoptoz üzerine etkisi. *Enflamasyon*, 41 (3), 1032-1048.

**Henderson, K.A., Kobylewski, S.E., Yamada, K.E., Eckhert, C.D. (2014).** Boric acid induces cytoplasmic stress granule formation, eIF2a phosphorylation, and ATF4 in prostate DU-145 cells. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 28(1), 133–141.

**Henderson, K., Stella, S. L., Kobylewski, S., Eckhert, C. D. (2009).** Receptor activated Ca(2+) release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells. *PloS one*, 4(6), e6009.

**Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., Murphy, G.P. (1983).** İnsan prostat kanserinin LNCaP modeli. *Kanser araştırması*, 43 (4), 1809-1818.

**Huggins, C. (1967).** Endocrine-induced regression of cancers. *Science*, 156, 1050- 1054.

**Ikezoe, T., Yang, Y., Saito, T., Koeffler, H. P., Taguchi, H. (2004).** Proteasome inhibitor PS-341 down-regulates prostate-specific antigen (PSA) and induces growth

arrest and apoptosis of androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells. *Cancer science*, 95(3), 271–275.

**Jiang, A., Yu, C., Zhang, P., Chen, W., Liu, W., Hu, X., Zhang, J. (2006).** p53 overexpression represses androgen-mediated induction of NKX3.1 in a prostate cancer cell line. *Exp. Mol. Med.*, 38, 625-633.

**Kim, M.J., Bhatia-Gaur, R., Banach-Petrosky, W.A., Desai, N., Wang, Y., Hayward, S.W., Cunha, G.R., Cardiff, R.D., Shen, M.M., Abate-Shen, C. (2002).** Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res.*, 62, 2999-3004.

**Kobylewski, S.E., Henderson, K.A., Yamada, K.E., Eckhert, C.D. (2016).** Activation of the EIF2 $\alpha$ /ATF4 and ATF6 Pathways in DU-145 Cells by Boric Acid at the Concentration Reported in Men at the US Mean Boron Intake. *Biological trace element research*, 176(2), 278-293.

**Kohaar, I., Petrovics, G., Srivastava, S. (2019).** A Rich Array of Prostate Cancer Molecular Biomarkers: Opportunities and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(8), 1813.

**Konaç, E., Sözen, S. (2014).** Prostat Kanserinin Tanı ve Tedavisinde Moleküler Biyolojinin Kullanım Alanları. *Üroonkoloji Bülteni*, 13, 228-235.

**Korkmaz, M. (2011).** Boron: Environmental Exposure and Human Health. Encyclopedia of Environmental Health. ed: Nriagu, JO. Burlington: Elsevier, 442–445.

**Korkmaz, M., Uzgoren, E., Bakirdere, S., Aydın, F., Ataman, O.Y. (2007).** Effects of Dietary Boron on Cervical Cytopathology and on Micronucleus Frequency in Exfoliated Buccal Cells. *Environ. Toxicol.*, 22, 17–25.

**Kostova, M. B., Rosen, D. M., Chen, Y., Mease, R. C., Denmeade, S. R. (2013).** Structural optimization, biological evaluation, and application of peptidomimetic prostate specific antigen inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 56(11), 4224–4235.

**Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei, E. (2003).** Cancer Medicine 6th edition: Genitourinary tract, Neoplasms of the prostate.

**Lee, A.S. (2005).** The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods (San Diego, Calif.)*, 35(4), 373-381.

**Lei, Q., Jiao, J., Xin, L., Chang, C.J., Wang, S., Gao, J., Gleave, M.E., Witte, O.N., Liu, X., Wu, H. (2006).** NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. *Cancer Cell*, 9, 367-378.

**Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., LaVail, M.M., Walter, P. (2007).** IRE1 Signaling Affects Cell Fate During the Unfolded Protein Response. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5852), 944-949.

**Liu, M., Chen, Z., Chen, L. (2016).** Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37, 425–443.

**McAuley, E. M., Bradke, T. A., Plopper, G. E. (2011).** Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration. *Cell adhesion & migration*, 5(5), 382–386.

**Moseman, R.F. (1994).** Chemical disposition of boron in animals and humans. *Environ. Health Perspect.*, 102, 113-117.

**Müezzinoğlu, T., Korkmaz, M., Neşe, N., Bakirdere, S., Arslan, Y., Ataman, O.Y., Lekili, M. (2011).** Prevalence of prostate cancer in High Boron-Exposed Population: A Community-Based Study. *Biological Trace Element Research*, 144, 49–57.

**Needham, P.G., Guerriero, C.J., Brodsky, J.L. (2019).** Chaperoning Endoplasmic Reticulum–Associated Degradation (ERAD) and Protein Conformational Diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(8), a033928.

**Nelson, W.G., DeMarzo, A.M., Isaacs, W.B. (2003).** Prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 349, 366-381.

**Nelson, W.G., DeWeese, T.L., DeMarzo, A.M. (2002).** The diet, prostate inflammation, and the development of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 21, 3-16.

**Nielsen, F.H., Hunt C.D., Mullen L.M., Hunt J.R. (1987).** Effect of dietary boron on mineral, estrogen and testosterone metabolism in postmenopausal women. *FASEB J.*, 1, 394- 397.

**Nielsen, F.H., Meacham, S.L. (2011).** Growing Evidence for Human Health Benefits of Boron. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16 (3), 169-180.

**Nielsen, F.H., Schuler T.R. (1992).** Studies of the interaction between boron and calcium, and its modification by magnesium and potassium in rats. Effects on growth, blood, variables and bone mineral composition. *Biol. Trace Elem. Res.*, 35, 225-237.

**Nishikawa, S-i., Brodsky, J.L., Nakatsukasa K. (2005).** Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *Journal of biochemistry*, 137, 551-555.

**Palmeri, M.L., Miller, Z.A., Glass, T.J., Garcia-Reyes, K., Gupta, R.T., Rosenzweig, S.J., Kauffman, C., Polascik, T.J., Buck, A., Kulbacki, E., Madden, J., Lipman, S.L., Rouze, N.C., Nightingale, N.R. (2016).** B-Mode and Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Imaging of Prostate Zonal Anatomy: Comparison with 3T T2-Weighted MR Imaging. *Ultrasonic imaging*, 37(1), 22-41.



**Reddy, G.P., Barrack, E.R., Dou, Q.P., Menon, M., Pelley, R., Sarkar, F.H., Sheng, S. (2006).** Regulatory processes affecting androgen receptor expression, stability, and function: potential targets to treat hormonerefractory prostate cancer. *J. Cell Biochem.*, 98, 1408-1423.

**Santamaría, P.G., Mazón, M.J., Eraso, P., Portillo, F. (2019).** UPR: An Upstream Signal to EMT Induction in Cancer. *Journal of clinical medicine*, 8(5), 624.

**Sarcinelli, C., Dragic, H., Piecyk, M., Barbet, V., Duret, C., Barthelaix, A., Ferraro-Peyret, C., Fauvre, J., Renno, T., Chaveroux, C., Manié, S.N. (2020).** ATF4-Dependent NRF2 Transcriptional Regulation Promotes Antioxidant Protection during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancers*, 12(3), 569.

**Schadewijk, A.V., Wout, E.F.A.V., Stolk, J., Hiemstra, P.S. (2011).** A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress. *Cell Stress and Chaperones*, 17(2), 275–279.

**Schroder, M., Kaufman, R.J. (2005).** ER stress and the unfolded protein response. *February Mutat. Res.*, 569, 29-63.

**Schulz, W.A., Burchardt, M., Cronauer, M.V. (2003).** Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod.*, 9, 437-448.

**Schwarz, D.S., Blower M.D. (2016).** The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences*, 73, 79-94.

**Seifert, M., Peitzsch, C., Gorodetska, I., Börner, C., Klink, B., Dubrovskaya, A. (2019).** Network-based analysis of prostate cancer cell lines reveals novel marker gene candidates associated with radioresistance and patient relapse. *PLoS Comput. Biol.*, 15(11), e1007460.

**Shand, R.L., Gelmann, E.P. (2006).** Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr. Opin. Urol.*, 16, 123-131.

**Simmons, S.O.N. (2006).** Biochemical and functional analysis of Homeoprotein Nkx3.1. *Toxicology*. North Carolina State University.

**Siwecka, N., Rozpędek-Kamińska, W., Pytel, D., Wawrzynkiewicz, A., Dziki, A., Dziki, Ł., Diehl, J.A., Majsterek, I. (2019).** Dual role of Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Unfolded Protein Response Signaling Pathway in Carcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4354.

**Siwecka, N., Rozpędek-Kamińska, W., Wawrzynkiewicz, A., Pytel, D., Diehl, J.A., Majsterek, I. (2021).** The Structure, Activation and Signaling of IRE1 and Its Role in Determining Cell Fate. *Biomedicines*, 9(2), 156.

**Smith, J.A. (2018).** Regulation of Cytokine Production by the Unfolded Protein Response; Implications for Infection and Autoimmunity. *Front. Immunol.*, 9, 422.

**Song, H., Zhang, B., Watson, M.A., Humphrey, P.A., Lim, H., Milbrandt, J. (2009).** Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. *Oncogene*, 28, 3307-3319.

**Storm, M., Sheng, X., Arnoldussen, Y.J., Saatcioglu, F. (2016).** Prostate cancer and the unfolded protein response. *Oncotarget*, 7(33), 54051–54066.

**Şaylı, B. S. (2000).** İnsan Sağlığı ve Bor Mineralleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi ve A.Ü.Tıp Fakültesi - Eti Holding Projeleri Yürütücüsü, Ankara, [www.bigadic.gov.tr](http://www.bigadic.gov.tr) (Erişim tarihi: 18.05.2021).

**White, C.W., Xie, J.H., Ventura, S. (2013).** Age-related changes in the innervation of the prostate gland: implications for prostate cancer initiation and progression. *Organogenesis*, 9(3): 206–215.

**Toivanen, R., Shen, M. M. (2017).** Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*, 144(8), 1382-1398.

**Tyloch, J.F., Wiczorek, A.P. (2017).** The standards of an ultrasound examination of the prostate gland. Part 2. *J. Ultrason.*, 17(68), 43-58.

**Üroonkoloji Derneği. (2016).** *Prostat kanseri.* <http://uroonkoloji.org/wp-content/uploads/2016/02/prostat-kanseri.pdf> – (Erişim tarihi: 14.05.2021)

**Voeller, H.J., Augustus, M., Madike, V., Bova, G.S., Carter, K.C., Gelmann, E.P. (1997).** Coding region of NKX3.1, a prostate-specific homeobox gene on 8p21, is not mutated in human prostate cancers. *Cancer Res.*, 57, 4455- 4459.

**Yamada K.E., Echert C.D. (2019).** Boric Acid Activation of eIF2 $\alpha$  and Nrf2 Is PERK Dependent: a Mechanism that Explains How Boron Prevents DNA Damage and Enhances Antioxidant Status. *Biol. Trace Ele. Res.*, 188(1), 2-10.

**Yoshida, H. (2007).** ER stress and diseases. Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University.

**Zheng, S.L., Ju, J.H., Chang, B.L., Ortner, E., Sun, J., Isaacs, S.D., Sun, J., Wiley, K.E., Liu, W., Zemedkun, M., Walsh, P.C., Ferretti, J., Gruschus, J., Isaacs, W.B., Gelmann, E.P., Xu, J. (2006).** Germ-line mutation of NKX3.1 cosegregates with hereditary prostate cancer and alters the homeodomain structure and function. *Cancer Res.*, 66, 69-77.

**WHO. (1998).** Boron, World Health Organization, IPCS (Environmental Health Monograph) 204. Geneva: (1998).

**Xu, L.L., Srikantan, V., Sesterhenn, I.A., Augustus, M., Dean, R., Moul, J.W., Carter, K.C., Srivastava, S. (2000).** Expression profile of an androgen regulated prostate specific homeobox gene NKX3.1 in primary prostate cancer. *J. Urol.*, 163, 972-979.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İrem ÇOKSEVER  
Doğum Yeri ve Tarihi : Fatih/ İSTANBUL 13.12.1996  
Yabancı Dil : İngilizce (Orta)  
Almanca (Başlangıç)

Eğitim Durumu  
Lise : Mustafa Kemal Anadolu Lisesi (2010-2014)  
Lisans : Uludağ Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Bölümü (2014-2018)  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Bölümü (2018-2021)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Gen-Era Diagnostik A.Ş. (2019-Devam ediyor)

İletişim (e-posta) : cokseverirem@gmail.com

Yayımları : -