

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**IRF5 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ VE OCT4 KÖK HÜCRE**  
**FAKTÖRÜ İLİŞKİSİNİN PROSTAT KANSER**  
**HÜCRELERİNDE BELİRLENMESİ**

**MUSTAFA YILMAZ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç.Dr. Özge ÇEVİK**

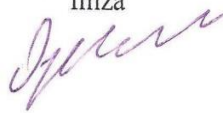


Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ADÜ-TPF-18002 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2019**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Mustafa YILMAZ tarafından hazırlanan “IRF5 Transkripsiyon Faktörü ve OCT4 Kök Hücre Faktörü İlişkisinin Prostat Kanseri Hücrelerinde Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/12/2018

Unvan	Adı Soyadı	Üniversite	İmza
(T.D.) Doç. Dr.	Özge ÇEVİK	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Prof. Dr.	Aslıhan KARUL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Dr. Öğr. Üyesi	İsmail SARI	Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün .....tarih ve .....sayılı oturumunda alınan .....nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda; öncelikle danışman hocam Doç.Dr. Özge ÇEVİK'e, Eğitimim süresince katkısı bulunan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen baőta Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Baőkanı Aslıhan KARUL ve bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca deneylerimde uzun uğraőlarda destek olan ve tecrübelerini çekinmeden benimle paylaőan öğretim görevlisi Mehran AKSEL ve Mürüvet ABBAK'a teşekkür ederim.

Tez çalıőmamın deney aőamalarının kurulumu ve uygulanmasında her zaman destek olan Adnan Menderes Üniversitesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi alıőanları ve araőtırıcı arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Araőtırmalarımda kullanılan malzemeler TÜBİTAK-214Z057 nolu proje ile temin edilmiş olup, bu tez çalışmasının desteklenmesinde TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iii
RESİMLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. Prostat Kanseri.....	3
2.1.1. Prostat Dokusu.....	4
2.1.1.1. Prostat Dokusu Anatomisi ve histolojisi .....	4
2.1.2. Prostat Kanserinde Teşhis .....	6
2.1.3. Prostat Kanserinin Gelişimi.....	6
2.1.3.1. Prostat Kanseri.....	6
2.1.3.2. Prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) ve prostat kanseri .....	8
2.1.3.3. Prostat kanserinin alt tipleri .....	9
2.1.3.4. Metastaz.....	9
2.1.5. Prostat Karsinogenezini Destekleyen Süreçler.....	10
2.1.5.1. İnflamasyon .....	10
2.1.5.2. Oksidatif stres ve DNA hasarı .....	11
2.1.5.3. Telomer kısalması .....	11
2.1.5.4. Yaşlılık .....	11
2.1.5.5. Genomik değişiklikler .....	12
2.1.5.6. Genetik etmenler.....	12
2.1.5.7. Epigenetik değişiklikler.....	12
2.1.6. Prostat Kanseri Başlangıcı ve İlerlemesinin Moleküler Mekanizmaları .....	13
2.1.6.1. NKX3.1 down regülasyonu .....	13
2.1.6.2. Myc up regülasyonu .....	13
2.1.6.3. TMPRSS2-ERG translokasyonları .....	14

2.1.6.4. PTEN .....	14
2.1.6.5. Sinyal yolları Akt/mTOR ve MAPK sinyali .....	14
2.1.6.6. Onkojenik tirozin kinazlar .....	15
2.1.6.7. Gelişimsel sinyal yolları .....	15
2.1.6.8. Ezh2 .....	16
2.1.6.9. miRNA' lar.....	16
2.1.7. Translasyonel Uygulamaları.....	16
2.1.7.1. Kanser önlenmesinde diyet ve yaşam tarzı faktörleri.....	17
2.1.7.3. Önleme ve tedavi için AR sinyalini manipülasyonu .....	18
2.1.7.4. İleri hastalıkların tedavisinde sinyal yollarının hedeflenmesi .....	18
2.1.8. Perspektifler ve Sonuçlar.....	19
2.2. İnterferonlar .....	19
2.2.1. Tip I İnterferonlar: İnterferon Alfa/Beta (IFN- $\alpha/\beta$ ).....	20
2.2.1.1. TİP I interferonlar ve dahil oldukları sinyal ileti yolları.....	20
2.2.1.2. Tip I interferonların antiviral işlevleri .....	22
2.2.2. Tip II İnterferon: İnterferon Gama (IFN- $\gamma$ ) .....	24
2.2.2.1. IFN- $\gamma$ ve dahil olduğu sinyal ileti yolları.....	24
2.2.2.2. IFN- $\gamma$ antiviral etkileri .....	24
2.2.3. Tip III İnterferon: İnterferon Lambda (IFN- $\lambda$ ) .....	25
2.2.3.1. IFN- $\lambda$ ve dahil olduğu sinyal ileti yolları.....	25
2.2.3.2. IFN- $\lambda$ antiviral etkileri.....	26
2.2.4. Diğer Hastalıklarda Terapötik Ajanlar Olarak IFN'ler .....	26
2.3. İnterferon Düzenleyici Faktörler .....	27
2.4.1. İnterferon Regülatör Faktör 5 (IRF5) .....	29
2.4. Kök Hücre .....	32
2.4.1. Kök Hücre Tanımı .....	32
2.4.2. Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri .....	33
2.4.3. Hücre Yüzey Belirteçleri .....	34
2.4.3.1. Seviye spesifik embriyonik antijenler (SSEA).....	34
2.4.3.2. TRA-1-60 ve TRA-1-81 .....	35
2.4.4. Transkripsiyon Faktörleri .....	35
2.4.4.1. Nanog .....	36
2.4.4.2. SOX2 .....	36
2.4.4.3. OCT4 .....	36
2.4.4.4. Klf:.....	37
2.4.4.5. Myc Ailesi: .....	38
2.4.4.6. Lin28: .....	38
2.4.5. Transkripsiyon Faktörlerinin Birbirleriyle İlişkisi: .....	38
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>41</b>
3.1. Kullanılan Maddeler .....	41
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	41

3.3. Hücre Kültürü .....	41
3.3.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması .....	41
3.3.2. Hücre Sayımı .....	42
3.4. pIRF5 ve pOCT4 Çoğaltılması ve İzolasyonu .....	43
3.4.1. Elektroporasyon .....	44
3.4.2. Plazmid İzolasyonu .....	46
3.4.3. Plazmidlerin Saflık ve Miktar Tayini .....	48
3.5. IRF5 ve OCT4 için Transfeksiyonu .....	48
3.6. IRF5 ve OCT4 Overekspresyonunun Migrasyon Üzerine Etkisi .....	48
3.7. BCA Protein Tayini .....	49
3.8. Hücrelerde Yapılan Western Blot Çalışmaları .....	50
3.9. İmmünopresipitasyon (IP) Deneyleri .....	52
3.10. İstatistiksel Analiz .....	54
<b>4.BULGULAR .....</b>	<b>55</b>
4.1. Plazmidlerin Çoğaltılması ve Klonların Seçimi .....	55
4.2. Plazmid İzolasyonu Sonrasında Agaroz Jel Elektroforezi .....	55
4.3. Plazmidlerin Ekspresyonlarının Kontrolü .....	56
4.4. Overekspresyon Yapılan Proteinlerin Western Blot Analizleri .....	56
4.5. Transfeksiyon Sonucu Hücrelerdeki Değişiklikler .....	58
4.6. OCT4'ün Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi .....	58
4.7. IRF5 ile OCT4 Protein Etkileşimleri Sonuçları .....	59
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>61</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>65</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>66</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>82</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>83</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AR</b>	: Androjen Reseptörü
<b>BCA</b>	: Bisinkanonik asit
<b>BPH</b>	: Bening Prostat Hiperplazi
<b>CBP</b>	: CREB Bağlayıcı Protein
<b>CINF</b>	: Korunmuş İnterferon
<b>DAA</b>	: Doğrudan Antiviral Ajan
<b>DBD</b>	: DNA Bağlanma Bölgesi
<b>DC</b>	: Dendritik Hücreler
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik asit
<b>EKH</b>	: Embriyonik Kök Hücre
<b>ETS</b>	: Elektron Taşıma sistemi
<b>FasL</b>	: Fas Ligandı
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>FGF</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>FGFR</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>HBV</b>	: Hepatit B
<b>HCC</b>	: Hepatosellular Karsinom
<b>HCV</b>	: Hepatit C
<b>HIV</b>	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
<b>HPC</b>	: Nadir Prostat Kanseri
<b>IL15</b>	: İnterlökin 15
<b>INF</b>	: İnterferon
<b>IRF5</b>	: İnterferon Regülatör Faktör 5
<b>ISG15</b>	: İnterferon İle Uyarılmış Gen 15
<b>İKH</b>	: İç Hücre Kitlesi
<b>KLF</b>	: Kruppel-like Faktör
<b>MiRNA</b>	: MikroRNA
<b>Mx</b>	: Miksovirus Direnci
<b>NKT</b>	: Doğal Katil T Hücresi
<b>NNPI</b>	: Nükleozit Olmayan Polimeraz İnhibitörleri
<b>OAS</b>	: Oligoadenilat Sentetaz

<b>OCT4</b>	: Oktomer-Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4
<b>PEG</b>	: Polietilen Glikol
<b>PI</b>	: Proteaz İnhibitörü
<b>PIN</b>	: Prostatik İntraepitelyal Neoplazi
<b>PSA</b>	: Prostat Spesifik Antijen
<b>RNA</b>	: Ribo Nükleik asit
<b>ROS</b>	: Reaktiv Oksijen Türleri
<b>SNP</b>	: Tek Nükleotit Polimorfizmi
<b>SOX2</b>	: SRY (sex determining region Y)-box 2
<b>SRV</b>	: Kalıcı Virolojik Yanıt
<b>SSA</b>	: Seviye Spesifik Antijen
<b>SSEA</b>	: Seviye Spesifik Embriyonik Antijen
<b>TIC</b>	: Tümör Başlatıcı Hücreler
<b>TRIM</b>	: Tripartit Motifi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Erkeklerde en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımları (TÜİK 2011-2015). .....	3
Şekil 2. Ölüm nedeni istatistikleri (TÜİK 2011-2015).....	4
Şekil 3. Normal prostat dokusu ve Büyümüş prostat dokusu .....	4
Şekil 4. Prostat bezinin zonal anatomisi.....	5
Şekil 5. İnsan prostat kanserinin gelişim evreleri.....	7
Şekil 6. Prostat dokusunun histolojisi. ....	8
Şekil 7. İnterferon kanonik sinyal yolları. ....	21
Şekil 8. İnterferon Düzenleyici Faktör (IRF) Transkripsiyon Faktörleri Ailesi.....	28
Şekil 9. İnterferon Regülatör Faktör 5 (IRF5) Transaktivasyon Bölgesinin Kristal Yapısı. ...	30
Şekil 10. IRF5 homo veya heterodimer yapısı ve CBP proteini ile etkileşimi. ....	31
Şekil 11. Transkripsiyon faktörleri. ....	39
Şekil 12. Hücre sayımı yapılan Thoma Lamı.....	42
Şekil 13. Thoma lamında sayım yapılan karelerin toplam görüş alanı. ....	43
Şekil 14. Plazmid izolasyon basamakları. ....	47
Şekil 15. Scratch tayini.....	48
Şekil 16. İmmünopresipitasyon deneyinin basamakları.....	53
Şekil 17. İmmünopresipitasyon ile protein saflaştırma basamakları.....	53
Şekil 18. Agaroz jel elektroforezinde plazmidlerin ayrıştırılması. ....	55
Şekil 19. pIRF5 ekspresyon vektöründe IRF5 protein ekspresyon western blot ile kontrolü..	56
Şekil 20. pIRF5 ekspresyon vektöründe IRF5 protein ekspresyon düzeyleri. ....	57
Şekil 21. pOCT4 ekspresyon vektöründe OCT4 protein ekspresyon western blot ile kontrolü. .....	57
Şekil 22. pOCT4 ekspresyon vektöründe OCT4 protein ekspresyon düzeyleri.....	57
Şekil 23. pIRF5 ve pOCT4 vektörlerinin hücre proliferasyonu üzerine etkisi. ....	58
Şekil 24. pOCT4 ekspresyon vektörünün PC3 hücrelerinde migrasyon değişiklikleri.....	59
Şekil 25. OCT4 ile IP yapılan örneklerde OCT4 ve IRF5 protein ilişkisi. ....	59
Şekil 26. IRF5 ile IP yapılan örneklerde OCT4 ve IRF5 protein ilişkisi. ....	60
Şekil 27. OCT4 ile IP yapılan örneklerde SOX2 ve Nanog protein ilişkisi.....	60

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Tezde kullanılan hücre kültürü kabini ve malzemeleri.....	42
<b>Resim 2.</b> Elektroporasyonda kullanılan elektroporator.....	46
<b>Resim 3.</b> Elektroporasyonu yapılan E.coli bakterilerinin LB Agar'da seçimi.....	46
<b>Resim 4.</b> BCA Protein tayini. Multiskan Spectrum ve eliza plate yüklemesi.....	50
<b>Resim 5.</b> SDS-PAGE jel döküm ekipmanı, solüsyonlar ve elektroforez.....	51
<b>Resim 6.</b> Jeldeki proteinlerin PVDF membrane transferi. ....	52
<b>Resim 7.</b> IP deneyinde Rotator üzerindeki hücre lizatı ve primer antikor. ....	54
<b>Resim 8.</b> DH5 $\alpha$ Bakterileri Kompetent hücre kolonileri. ....	55
<b>Resim 9.</b> Plazmid transfeksiyonunun PC3 hücrelerinde ekspresyonu.....	56
<b>Resim 10.</b> pIRF5 ve pOCT4 ekspresyon vektörlerinin transfeksiyon sonrası hücre morfolojileri.....	58
<b>Resim 11.</b> pOCT4 ekspresyon vektörünün PC3 hücrelerinde migrasyon plate görüntüsü.....	58

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Kök hücre tipleri, farklılaşma etkinlikleri ve farklılaşma yönleri .....	33
<b>Tablo 2.</b> İnsan embriyolarında preimplantasyon safhalarındaki hücre yüzey antijen ekspresyonları .....	40
<b>Tablo 3.</b> SDS-poliakrilamid jelin yoğunluğuna göre hazırlanışı. ....	51

## ÖZET

# IRF5 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ VE OCT4 KÖK HÜCRE FAKTÖRÜ İLİŞKİSİNİN PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDE BELİRLENMESİ

**Yılmaz M. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya(Tıp) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018.**

İnterferon Düzenleyici Faktör (IRF) ailesi interferonların savunma sisteminde düzenlenmesini sağlayan transkripsiyon faktörleridir. İnterferon Düzenleyici Faktör 5 (IRF5 bu ailenin bir üyesi olup çeşitli hastalıklarda rolleri ile ilgili çalışmalar son yıllarda artmaktadır. Oktomer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4 (OCT4), embriyonik kök hücre faktörü olarak bilinir. Bu kök hücre faktörü, normal hücrelerin farklılaşmasının yanı sıra kanserin oluşum ve gelişiminde de oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasında bir transkripsiyon faktörü olan IRF5 ve bir kök hücre faktörü olan OCT4'nun prostat kanserindeki rolleri ve protein-protein ilişkisi araştırılmıştır. PC3 insan prostat kanseri hücre kültürü yapılarak, pIRF5 ve pOCT4 plazmidleri kullanılarak IRF5 ve OCT4 proteinleri overekspresyon yapılmıştır. Overekspresyon yapılan örneklerde immunopresipitasyon (IP) yapılarak proteinler western blot ile değerlendirilmiştir. IRF5 ve OCT4 overekspresyon yapılan PC3 prostat kanseri hücrelerinde migrasyon düzeyleri scratch yöntemi ile incelenmiştir.

Prostat kanser hücrelerinde IRF5 ve OCT4 proteinlerinin birbirleri ile ilişkisi IP deneylerinde protein bantları ile gösterilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde IRF5'in hücre migrasyonunu anlamlı derecede azalttığı, OCT4'ün hücre migrasyonunu anlamlı derecede arttırdığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, IRF5 ve OCT4 proteinleri birbirleri ile etkileşimde bulunan iki transkripsiyon faktörü olup prostat kanser tedavisi için bu ilişki yeni sinyal yollarının ve çeşitli ilaç moleküllerinin gelişiminde önemli katkılar sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** IRF5, OCT4, Kök Hücre Faktörleri, Prostat kanseri, Kanser immünolojisi.

## **ABSTRACT**

### **DETERMINATION OF IRF5 TRANSCRIPTION FACTOR AND OCT4 STEM CELL FACTOR ASSOCIATIONS IN PROSTATE CANCER CELLS**

**Yilmaz M. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences,  
Programme of Medicinal Biochemistry, Master Thesis, Aydın, 2018.**

The Interferon Regulatory Factors (IRF) family are the transcription factor that enables the regulation of interferons in the defense system. IRF5 is a member of this family which have been increasing studies on their role in various diseases in recently. OCT4 is known as embryonic stem cell factor. This stem cell factor is important in the formation and development of cancer as well as the differentiation of normal cells.

In this thesis, the role of IRF5, a transcription factor and OCT4, a stem cell factor, in prostate cancer, and protein-protein interaction were investigated. PC3 human prostate cancer cell culture was performed, using the pIRF5 and pOCT4 plasmids to overexpress the IRF5 and OCT4 proteins. Immunoprecipitation (IP) was performed in overexpressed samples and proteins were evaluated by western blot. Migration levels were examined with overexpression of IRF5 and OCT4 protein in PC3 prostate cancer cells using scratch assay.

The relationship of IRF5 and OCT4 proteins in prostate cancer cells is shown by bands in IP experiments. It has been showed that, OCT4 significantly increased and IRF5 significantly decreased cell migration in PC3 prostate cancer cells.

As a result, IRF5 and OCT4 proteins are two transcription factors that interact with eachother and this relationship will contribute to the development of new signaling pathways and various drug molecules for prostate cancer treatment.

**Keywords:** IRF5, OCT4, Stem cell factors, Prostate cancer, Cancer immunology

# 1. GİRİŞ

Prostat kanseri erkeklerde kansere bağlı ölüm oranlarında ikinci sırada yer almaktadır. Son yıllardaki ilerlemelere rağmen prostat kanseri kanser ölümlerinin ana nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Yapılan insidans çalışmalarında gösterildiği gibi prostat kanseri 40 yaş üzeri erkeklerin hastalığı olmakla beraber 20'li yaşlardaki hastalardan alınan dokularda da prostat kanseri öncü hücreleri gözlenmektedir ve bu durum prostat kanserinin erken yaşlarda başladığını düşündürmektedir.

İnterferonlar (IFN'ler), işgalci patojenlere karşı konak savunmasının ilk aşamalarında güçlü antiviral aktiviteleri olan glikoproteinlerdir. Bu proteinler, hücre yüzeyindeki reseptörlerinin yapısına bağlı olarak Tip I, II ve III IFN'ler olmak üzere üç gruba ayrılır. Bağışıklık yanıtlarını modüle etme yetenekleri nedeniyle, kronik virüs enfeksiyonlarını kontrol etmek için tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Diğer ilaçlarla kombinasyon halinde, Tip I IFN'ler, Hepatit C (HCV) ve Hepatit B (HBV) enfeksiyonlarını baskılayan bir 'bakım standardı' olarak kabul edilirken, Tip III IFN, faz III klinik çalışmalarda HCV enfeksiyonu için tedavi edici olduğu ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, etkili olsa da, IFN'leri bir tedavi olarak kullanmak dikkat gerektirir. IFN'ler, çok çeşitli hücre tiplerini etkileyen güçlü sitokinlerdir. Bu nedenle; virüs enfeksiyonunu baskılamak, yaşam kalitesini korumak ve tedavi hedeflerine ulaşmak için IFN ile tedavi edilen hastaların sürekli izlenmesi gereklidir. Son yıllarda kanser immünoloji alanında INF'ler ile ilgili araştırmaların sayısı hızla artmaktadır. INF'ler ve onları etkileyen çeşitli faktörler kanser tedavisi için yeni hedef moleküller olarak tanımlanmaktadır.

İnterferon Düzenleyici Faktör (IRF) transkripsiyon faktörleri, memelilerde dokuz üyeli aileden oluşur. IRF1, IRF2, IRF3, IRF4 (PIP, LSIRF veya ICSAT olarak da bilinir), IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (ayrıca ICSBP olarak da bilinir) ve IRF9 (ISGF3γ olarak da bilinir). IRF'ler ilk olarak Tip I IFN ve interferonların neden olduğu genlerin transkripsiyon düzenleyicileri olarak karakterize edildirmiştir. Ancak daha sonra IFN sisteminin konak savunmasının düzenlenmesi ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynadıkları açıkça ortaya konulmuştur. IRF5, proinflamatuvar genlerin ve M1 makrofaj fenotipinin ekspresyonunu harekete geçiren TLR sinyal yolağında makrofaj inflamatuvar yanıtlarını modüle eden bir transkripsiyon faktörüdür. IRF5'in transkripsiyonel olarak ve protein seviyesinde nasıl düzenlendiği netlik kazanmamıştır. Bununla birlikte, IRF5 ekspresyonunun düzensizliğinin, Romatoid Artrit

(RA) ve Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) gibi otoimmün bozukluklarla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle IRF5 ekspresyonunun veya aktivitesinin modülasyonu, mevcut otoimmün terapilere etkisi ve alternatif etkileşimleri son yıllarda önem kazanmıştır.

Oktomer-Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4 (OCT4), embriyonik kök hücrelerin (EKH) pluripotens özelliğinin korunmasında ana rol oynayan bir proteindir. OCT4 transkripsiyon faktörü, insanda *POU5f1* geni tarafından kodlanır. Blastokist evresindeki embriyonun iç hücre yüzeyinde eksprese olur ve farklılaşma süresi boyunca değişiklikler gösterir. Embriyolarda kök hücre potansiyelindeki değişiklikler ve farklı kök hücre belirteçlerinin ifade düzeylerinin değişmesi sonucu tümör oluşumu gerçekleşmektedir. Kanserin oluşumunda kök hücre faktörlerinin rolleri ile ilgili olarak son yıllarda yapılan araştırmaların önemi hızla artmaktadır. Embriyonik kök hücre faktörleri ve prostat kanseri konusunda yapılan araştırmalar ile henüz prostat kanser patagenezindeki roller belirlenememiştir.

Bu araştırmada bir transkripsiyon faktörü olan IRF5 proteininin bir kök hücre faktörü olan OCT4 proteini ile ilişkisini araştırılması planlanmış ve prostat kanseri tedavisinde yeni yaklaşımların oluşturulmasına katkı sağlaması amaçlanmıştır.

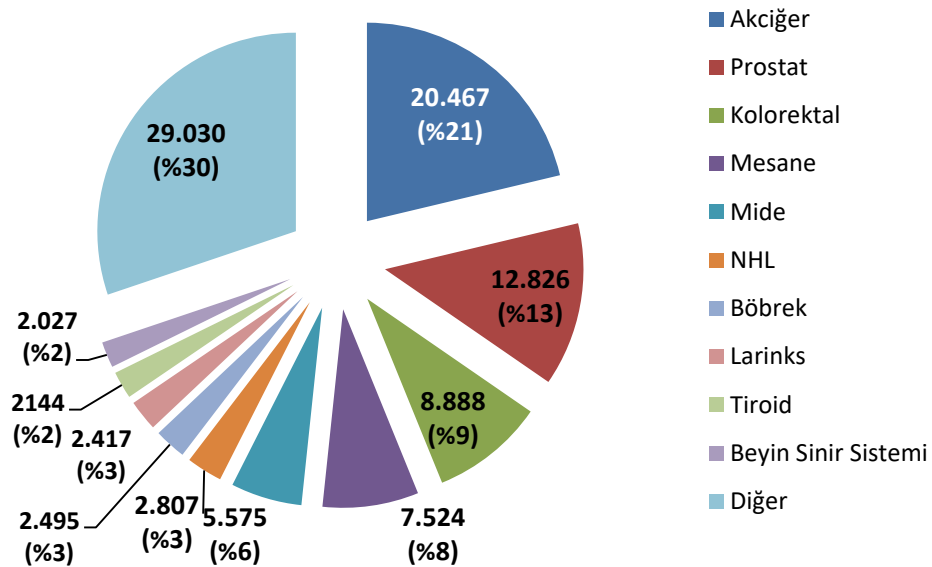
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Prostat Kanseri

Son zamanlardaki ilerlemelere rağmen, prostat kanseri erkeklerde kansere bağlı mortalite ve morbiditenin ana nedenini oluşturmaya devam etmektedir. 1940'larda androjen yoksunluğu tedavisinin ortaya çıkmasına neden olan androjen reseptörünün (AR) rolü üzerine birçok çalışma yapılmıştır. AR'nin prostat kanseri başlaması ve ilerlemesinin altında yatan temel mekanizmaların yanı sıra terapötik müdahale için bu süreçleri hedefleme potansiyeline uzun zamandır yoğun ilgi vardır.

Kanser beraberinde getirdiği sağlık sorunlarının yanı sıra, maddi ve manevi yönden uzun süreli mücadele gerektiren bir hastalıktır. Dünyada her yıl 14 milyon kişinin yakalandığı ve 8,2 milyon kişinin ölümüne sebep olan kanser; yaş, cinsiyet, dil, din, ırk ayrımı yapmaksızın tüm insanları etkilemektedir.

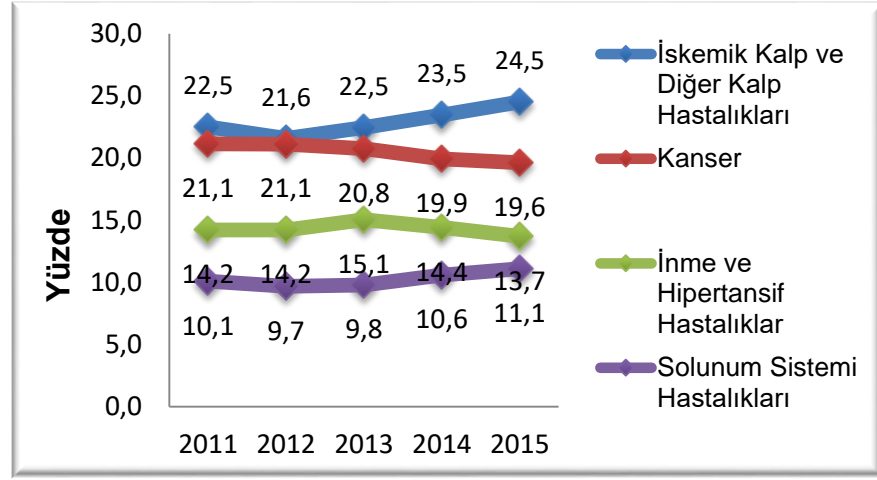
Ülkemizde ki en son resmi rakamlar değerlendirildiğinde bir yıl içerisinde yaklaşık 96.200 erkek hastaya kanser teşhisi konmaktadır. Erkeklerde en sık görülen kanserler akciğer ve prostat kanseridir (Şekil 1). Yine Türkiyede yaşa bağlı kanser istatistik verileri incelendiği zaman 2015 yılında 50-69 yaş arasında erkeklerde prostat kanseri görülme sıklığı %13.2 olarak bildirilmiştir. 70 yaş ve üzeri gruplarda ise bu oran %18.3 olarak bildirilmiştir. (Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2015 verileri).



Şekil 1. Erkeklerde en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımları (TÜİK 2011-2015).



Ölüm nedeni istatistikleri incelendiğinde; kanser tüm ölümlerin yaklaşık %20 civarını oluşturmaktadır (Şekil 2). Kanser, 2015 yılı içerisinde 49.946 erkek, 27.022 kadının ölümüne neden olmuştur. Gırtlak, soluk borusu, bronş ve akciğerin kötü huylu tümörü erkeklerde 20.388 kişi ile en fazla ölüme neden olurken, kadınlarda ise meme kanseri 3.853 kişi ile en yüksek sayıda ölüme neden olmuştur.

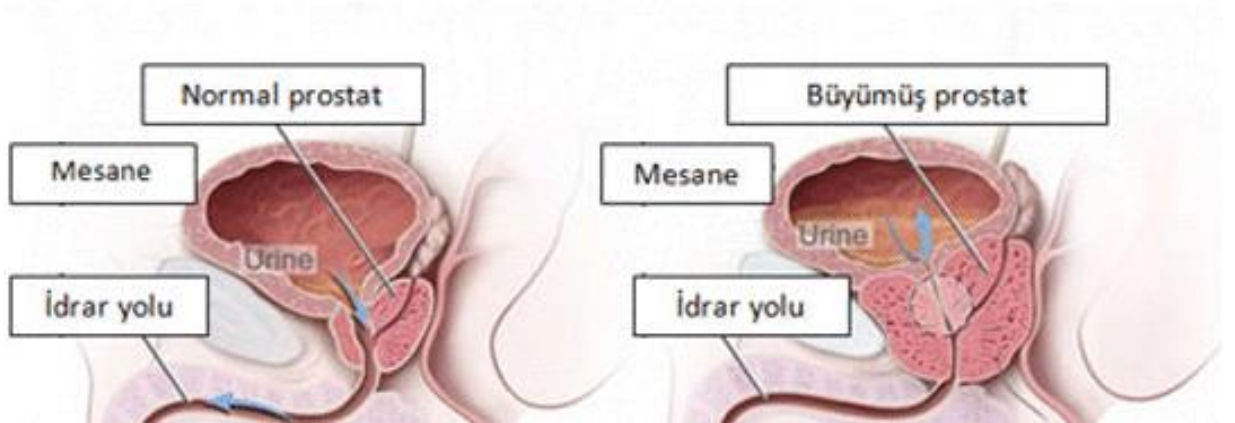


Şekil 2. Ölüm nedeni istatistikleri (TÜİK 2011-2015).

## 2.1.1. Prostat Dokusu

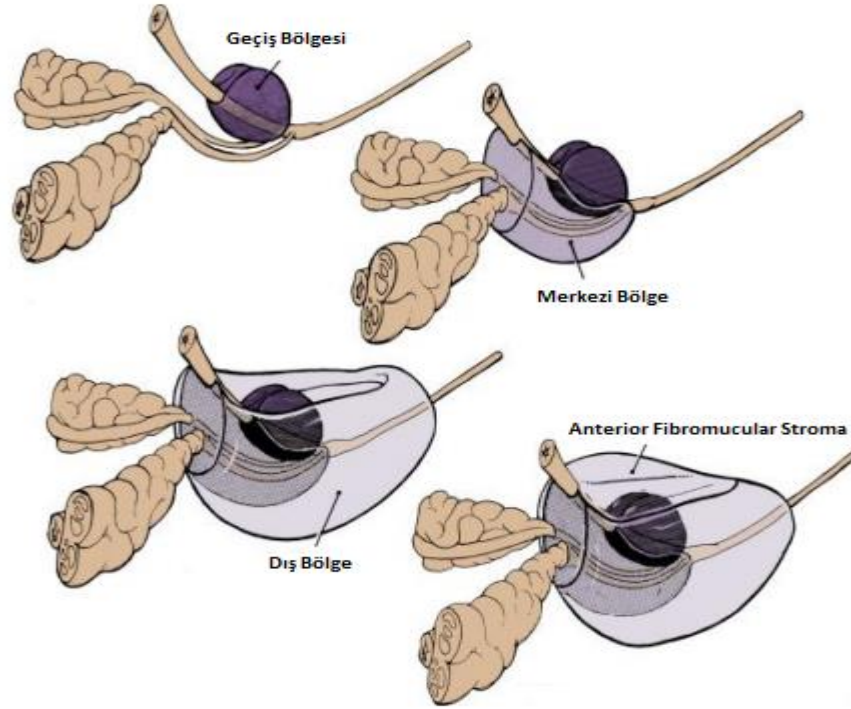
### 2.1.1.1. Prostat Dokusu Anatomisi ve histolojisi

Erkeklerde prostat bezi mesanenin tabanında idrar yolunu çevreleyen ceviz boyutlu bir doku olup, seminal sıvının önemli bileşenlerini üretir. Kanser durumunda bu doku hacimsel olarak artmaktadır. Büyüyen prostat dokusu mesaneye baskı yapmakta ve hastalarda idrar kaçırma, idrarda yanma ve zorlanma şikayetleri ortaya çıkmaktadır. Erkeklerde prostat dokusunun anatomik yeri şekil 3 de gösterilmiştir.



Şekil 3. Normal prostat dokusu ve Büyümüş prostat dokusu

Erişkin prostatın ayırt edilebilir lobüler yapısından yoksun olmasına rağmen, insan prostatı, anterior fibromusküler stroma ile birlikte merkezi, periüretral geçiş ve periferik bölgelere karşılık gelen bir bölgesel mimariye sahip olduğu bildirilmiştir (Timms BG, 2008). En dış periferal bölge en fazla hacmi kaplar ve prostat karsinomlarının çoğunu barındırır. Buna karşılık, yaşlı erkeklerde görülen yaygın malign olmayan bir durum olan benign prostat hiperplazisi (BPH), geçiş bölgesinden kaynaklanmaktadır. Prostat bezinin zonal anatomisi ve yüzdesel olarak hacimleri Şekil 4 de gösterilmiştir.



**Şekil 4. Prostat bezinin zonal anatomisi.**

Geçiş bölgesi (%3,5), Merkezi Bölge (%17,5), Dış Bölge (%49), Anterior fibromusküler stroma (Düz kas ağırlıklı, %30). Baylor College of Medicine 1990

İnsan prostat dokusu histolojik düzeyde üç farklı epitelyal hücre türü olan luminal, bazal ve nöroendokrin ile psödostratlaşırılmış bir epitelyum içerir (Peehl DM, 2005). Luminal epitelyal hücreler, protein sekresyonları üreten ve sitokeratin 8 ve 18 gibi karakteristik belirteçler ve yüksek AR seviyeleri içeren sürekli polarize kolumnar hücreleri tabakasını oluştururlar. Bazal hücreler, lümen epitelinin altında yer alır ve p63 ve yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratinler 5 ve 14' ü eksprese eder, fakat düşük veya saptanamayan seviyelerde eksprese ederler. Son olarak, nöroendokrin hücreler, kromogranin A ve sinaptofizin gibi endokrin markörlerini eksprese eden, fonksiyonu bilinmeyen nadir hücreleridir, fakat bu hücreler AR-negatiftir.

## **2.1.2. Prostat Kanserinde Teşhis**

Prostat kanseri, ilk kez antik Mısırlılar tarafından tanımlanmıştır. Antik çağlardan beri prostat kanserinin klinik bir varlık olarak tanınmasına karşın, prostatın çıkarılması için cerrahi prosedürler yaklaşık 100 yıl önce geliştirilmiştir (Capasso LL, 2005). Bununla birlikte, prostat spesifik antijen (PSA) için erişilebilir bir kan testinin geliştirilmesi, son otuz yılda prostat kanseri teşhisinde devrim yaratmıştır. PSA, normal prostat sekresyonlarında üretilen kallikrein ilişkili bir serin proteazdır, fakat normal prostat yapısının bozulması sonucu kanın içine salınır (Lilja H ve ark., 2008).

Yüksek PSA seviyelerine sahip olan erkekler, tipik olarak prostat kanserinin varlığını değerlendirmek için biyopsi geçirirler. Biyopsiden sonra prostat dokusunun histopatolojik derecelendirilmesi Gleason skorlaması ile gerçekleştirilir. Hücrelerin yayılımına dayanarak 1 ila 5 (farklılaşmış) arasında bir değer verilir. En yaygın görülen 2 tipin toplamı olan kombine bir skor ile belirlenir (Epstein JI, 2010). Hastaların primer tümörlerinin durumunu ayrıca TNM skorlaması ile de desteklenir. TNM skorlaması Organa sınırlı tam teneffüs (T1–4), lenf nodu tutulumu olan veya olmayan (N0 veya 1) ve uzak metastazların varlığı ve derecesine (M0 ve 1a–c) göre değerlendirilir (Ohori M ve ark., 1994). Prostat kanserinin geleneksel tedavi uygulamaları prostatın cerrahi eksizyonu (radikal prostatektomi) veya eksternal ışın tedavisi veya radyoaktif ‘tohumlar’ (brakiterapi) implantasyonu ile irradasyonu yoluyla yapılmaktadır. İleri kanser durumunda, bu uygulamalar genellikle başlangıçta tümör yükünü ve PSA'yı dolaşımdaki seviyelerini azaltır. Fakat sonuçta hastalık çoğu durumda tekrarlamaktadır.

Prostat kanserinde gen ekspresyon profili, miRNA ekspresyon profili, serum proteomik ve metabolomikleri ile ilgili araştırmalar yaygınlaşmaktadır. Ayrıca prostat ve diğer kanserleri saptamak amacıyla invazif olmayan idrar testlerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilecek ümit vaat eden yeni yaklaşımlar da son yıllarda önem kazanmıştır (Sreekumar A ve ark., 2009). İdrarda PCA3' ün (prostat kanseri antijeni 3) tespiti de artık hastalığın tanısı ve prognozunda belirteç olarak kullanılmaktadır (Ploussard G ve de la Taille A, 2010).

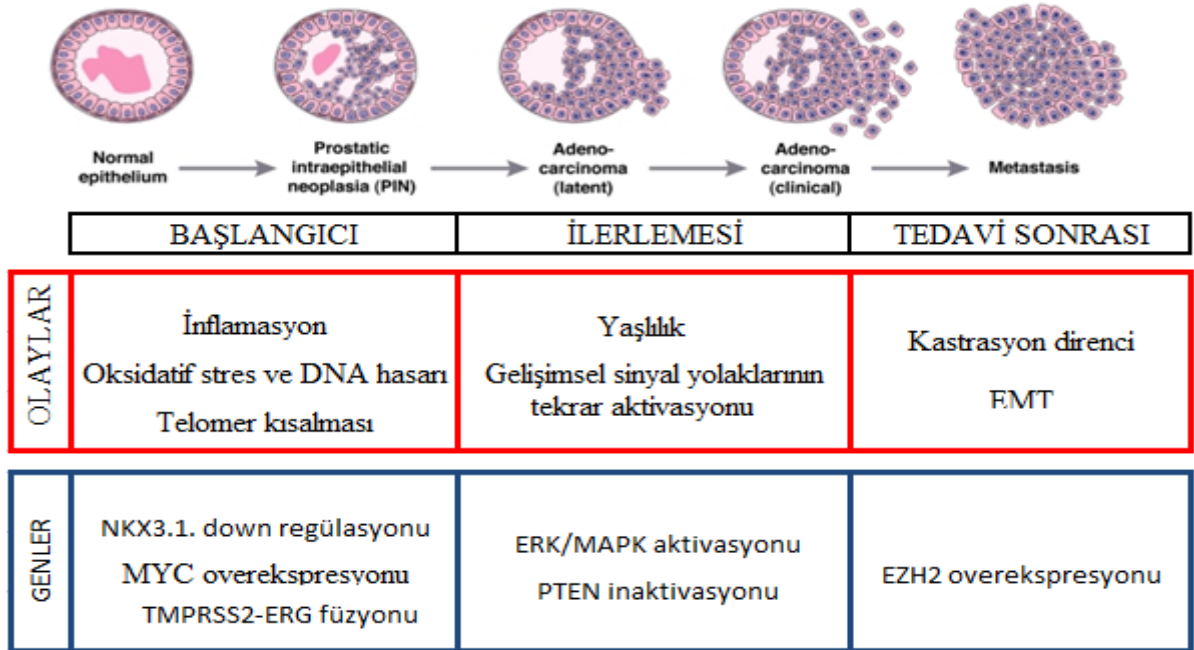
## **2.1.3. Prostat Kanserinin Gelişimi**

### **2.1.3.1. Prostat Kanseri**

Prostat kanseri genellikle multifokal olarak kabul edilir, çünkü primer tümörler sıklıkla genetik olarak farklı olan çoklu bağımsız histolojik kanser odaklarını içerirler (Clark J ve ark., 2008). Tersine, metastatik prostat kanserinin fenotipik heterojenliğine rağmen (Shah

RB ve ark. 2004), moleküler ve sitogenetik analizler aynı hastada çoklu metastazların klonal olarak ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu durum ilerlemiş prostat kanserinin monoklonal olduğunu göstermektedir (Liu W ve ark., 2009). Bulgular metastatik prostat kanserinin kanser ilerlemesi sırasında bireysel klonların seçiliminden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bu klonal evrim süreci, androjen yoksunluğu gibi terapötik müdahalelerin sonucunda da gözlemlenir.

Prostat kanserinin heterojenitesi, latent ve klinik hastalık arasındaki ayrımı ve prostat kanseri ilerlemesi ile yaşlanma arasındaki güçlü ilişkiyi anlamak için potansiyel olarak önemlidir (Şekil 5). Prostat kanseri yaşlı erkeklerin bir hastalığı olmasına rağmen, 20' li ve 40' lı yaşlardaki sağlıklı erkeklerden alınan prostat örnekleri, prostat kanseri histolojik odakları sık görülmektedir (Shiraishi T ve ark., 1994). Bunun sonucunda kanser başlangıcının nispeten erken bir yaşta gerçekleştiğini ileri sürülmektedir. Prostat kanserinin multifokal olduğunu gösteren kanıtlarla birlikte, prostat bezinin, çoğu klinik olarak saptanabilen hastalığa ilerlemeyen latent prostat kanserine neden olan çoklu neoplastik transformasyon olaylarının yeri olabileceği düşünülmektedir. Klinik prostat kanserinin, latent prostat kanserinden farklı bir patojenik programdan başladığını düşünmek mümkündür. Alternatif olarak, çoğu latent prostat kanseri odakları, klinik hastalığa yol açan kritik aktivasyon olaylarına maruz kalmayabilir veya bu odakları subklinik bir durumda tutmak için yeterli aktif baskı altında kalabilir.

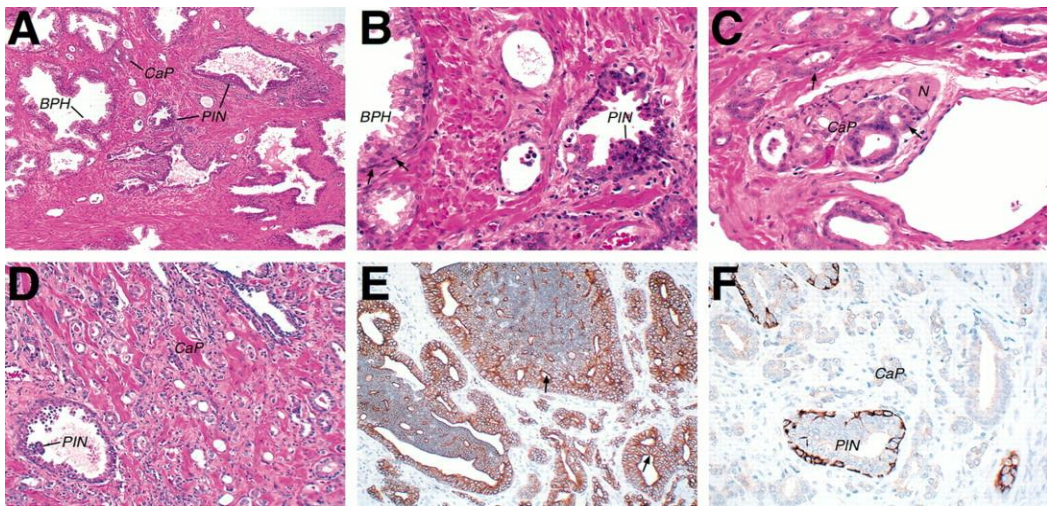


Şekil 5. İnsan prostat kanserinin gelişim evreleri.

Her aşamada anlamlı olması muhtemel olan moleküler süreçler ve genler/yollar ile birlikte progresyon aşamaları gösterilmiştir. Abate-Shen C ve Shen MM'den (2000) düzenlenmiştir.

### 2.1.3.2. Prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) ve prostat kanseri

Bu ilişkinin kesin olarak kanıtlanmamış olmasına rağmen PIN' in prostat kanseri için bir prekürsörü temsil ettiği yaygın bir şekilde kabul edilmektedir (DeMarzo AM ve ark., 2003). PIN genellikle histolojik düzeyde luminal epitelyal hiperplazinin ortaya çıkması, bazal hücrelerde azalma, çekirdek ve nükleollerin genişlemesi, sitoplazmik hiperkromaz ve nükleer atipi ile karakterizedir. Ek olarak, yüksek dereceli PIN lezyonları genellikle belirgin bir şekilde hücrel proliferasyon belirteçleri göstermektedir (Shappell SB ve ark., 2004). Bununla birlikte, prostat kanserinin aksine, bazal hücreler PIN' de sayıca azalır, ancak yok değildir.



Şekil 6. Prostat dokusunun histolojisi.

(A-D) Hematoksilen–Eozin boyamalarını gösterir. (E-F) immünohistokimyasal analizleri gösterir. (A) Prostat dokusunun karakteristik heterojenliğinin görünümü. BPH, PIN ve iyi farklılaşmış adenokarsinom (CaP) içeren bölgeler ok ile gösterilmiştir. (B) BPH ve PIN ayrıntılarını gösteren, A' daki bir bölgenin yakın görünümü. BPH bölgesinde, PIN bölgesinde bulunmayan bazal hücreler (oklar) ile çevrili kanallar vardır. PIN alanı, belirgin nükleoller olan daha büyük çekirdekler içeren normal ve atipik hiperkromatik hücreler arasındaki aynı kanal içinde bir geçiş gösterir. (C) Peri-sinir boşluğunu göç eden iyi farklılaştırılmış bir adenokarsinom ile yakınlardaki bir insan prostat alanınının yakın görünümü (N, sinir lifi konumunu işaretler). Karsinoma hücrelerinin çok belirgin nükleollere (oklar) ve büyük çekirdeklere sahip olduğu görülür. (D) Alanın geri kalanında yüksek dereceli PIN ve Gleason 4 ve 5 karsinom karışımından oluşan farklı bir prostat numunesinin görünümü. (E) Tüm epitel hücrelerini işaretleyen anti-sitokeratin 8 kullanılarak PIN ve karsinomun immünohistokimyasal boyaması. Bu PIN lezyonları kribiform bir forma (oklar) sahiptir, ancak yine de prostatik kanalın sınırları içindedirler. (F) Bazal hücreleri işaretleyen anti-sitokeratin 14 kullanılarak hem PIN hem de karsinom içeren bir doku bölümünün immünohistokimyasal boyaması. Özellikle, PIN, tutarsız boyama gösterir, oysa karsinomda boyama olmaz.

Prostat kanseri önemli fenotipik heterojenite göstermesine rağmen, prostat kanserlerinin yaklaşık %95'i patolojik olarak çarpıcı bir lümen fenotipine sahip adenokarsinom olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 6). Biyopsi örneklerinde prostat adenokarsinom tanısı, her ikisi de bazal hücreleri saptayan p63 ve sitokeratin 5/14 antikoları kullanılarak immün boyama yapılması ile doğrulanabilir (Grisanzio C ve Signoretti S, 2008).

Ek olarak, prostat kanseri teşhisi, karsinomda aşırı eksprese edilen luminal bir belirteç olan a-metilsil-CoA rasemaz (AMACR) için yükseltilmiş immün boyama ile desteklenir (Humphrey PA, 2007).

### **2.1.3.3. Prostat kanserinin alt tipleri**

Prostat kanserlerinin büyük çoğunluğu, AR eksprese eden asinar adenokarsinomlara karşılık gelirken, diğer prostat kanseri kategorileri (örneğin duktal adenokarsinom, müsinöz karsinom ve işaret halkası karsinomu) son derece nadir görülmektedir. Belki de en önemli histolojik varyant, genellikle küçük hücreli karsinom veya karsinoid tümör olarak sınıflandırılan ve prostat kanseri vakalarının %2' sini temsil eden nöroendokrin prostat kanseridir (Grignon DJ, 2004). Ancak, prostat adenokarsinomunda, özellikle prostatektomi ve androjen yoksunluğu tedavisinden sonra nüksetmeyi takiben nöroendokrin diferansiyasyonun odak bölgeleri daha sık görülür (Komiya A ve ark., 2009). Ek olarak nöroendokrin belirteç kromogranin A' nın ekspresyonu, kastrasyona dirençli tümörlerin gelişimi ile ilişkilidir ve kısa bir süre içerisinde hastalık nüks eder (Berruti A ve ark., 2007).

Prostat kanserinin başlıca alt tiplerinin histopatolojik düzeylerine dair kanıtları kısıtlı olmakla birlikte, son zamanlarda yapılan genomik analizler moleküler olarak tanımlanan alt tipler için önemlidir (Taylor BS ve ark., 2010). Özellikle, prostat kanseri örneklerinin ekspresyon profil analizleri, spesifik olarak hastalık sonucu ile ilişkili olan moleküler farklılıkları belirleyebilir (Tomlins SA ve ark., 2007). Bununla birlikte, gen ekspresyonu, kopya sayısı değişiklikleri ve ekson yeniden düzenleme analizlerini entegre eden onkojenomik yolak analizleri, prostat kanseri alt tiplerini ayırt etmek ve hasta sonucunu belirlemek için yeni yaklaşımlar sağlayabilir (Taylor BS ve ark., 2010). Ayrıca, moleküler alt tiplerin varlığı, prostat kanseri ile ilişkili kromozomal yeniden düzenlemelerin analizi ile desteklenmiştir.

### **2.1.3.4. Metastaz**

Prostat kanseri için sekonder metastaz bölgeleri akciğer, karaciğer ve plevra olsa da, prostat kanseri metastaz yaparsa, her zaman karakteristik osteoblastik lezyonlar oluşturduğu kemiğe gider (Logothetis CJ ve Lin SH, 2005). Metastazın hasta için klinik önemi göz önüne alındığında, prostat tümör hücrelerinin kemik iliği ve periferik kanın içine yayma yeteneği detaylı olarak araştırılmıştır. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, lokalize hastalığı olan hastaların önemli bir oranının kemik iliğindeki dolaşan tümör hücrelerini tespit edebildiğini

ve bunun da yaygın tümör hücrelerinin tam metastatik kabiliyete sahip olmadığını ortaya koymuştur (Holcomb IN ve ark., 2008). Bu yorumla uyumlu olarak, metastatik hastalığı olan hastalardan dolaşımdaki tümör hücreleri, kanser progresyonu sırasında elde edilen genomik instabilite ile tutarlı olarak, ilerlemiş prostat kanserine tipik olarak çok sayıda kromozomal yeniden düzenlemeyi göstermektedir (Leversha MA ve ark., 2009). Bununla birlikte, yayılmış tümör hücrelerinin metastaz oluşumu ile ilişkisi çözümlenmeden kalır ve prostat kanserinin metastazlarını kemiğe yayan moleküler faktörler zayıf bir şekilde tanımlanır.

İlerlemiş prostat kanseri için kemiğe metastaz yapma eğilimidir. Bu, esas olarak hasta morbiditesi ve mortalite üzerindeki etkisinden sorumludur. Bu nedenle, zaman zaman kemiğe metastaz yapan diğer epitelyal tümörlerden farklı olarak metastatik prostat kanseri hemen hemen değişmez bir şekilde kemiğe metastaz yapar ve ayrıca osteolitik lezyonlardan ziyade osteoplastik karakter gösterir (Logothetis CJ ve Lin SH, 2005). Kemik metastazının klinik açıdan anlamlı olmasına rağmen, prostat kanserinin kemik tropizminin altında yatan moleküler mekanizmalar iyi anlaşılmamıştır.

### **2.1.5. Prostat Karsinogenezini Destekleyen Süreçler**

Prostat kanseri oluşumu için en önemli risk faktörü ileri yaştır. 40 yaşın altındaki erkeklerde prostat kanseri geliştirme şansı 10,000' de bir iken, bu risk 60 yaşına kadar yedide bire yükselir. Bununla birlikte, prostat kanseri basit bir şekilde yaşlanmanın bir yan ürünü değildir. İnsidansı farklı popülasyonlar arasında önemli ölçüde değişmektedir. Daha büyük olasılıkla, prostat kanseri ile ileri yaş arasındaki ilişki, çevresel, fizyolojik ve moleküler faktörlerin ve bu faktörlerin etkilerini muhtemelen şiddetlendiren normal yaşlanma sonuçlarıyla etkileşimini yansıtır. Üstelik, yaşlanmanın prostat kanseri ile ilgili oldukları kesin moleküler sonuçları açıklığa kavuşturulmamışken, çeşitli çalışmalar, özellikle prostatik stromada, iltihap, oksidatif stres ve hücresel yaşlanmayla ilgili genler dahil olmak üzere yaşlanma ile ilişkili gen ekspresyon değişikliklerini tarif etmiştir (Bethel CR ve ark., 2009).

#### **2.1.5.1. İnflamasyon**

Epidemiyolojik, patolojik ve moleküler kanıtlar kronik inflamasyonun ile prostat kanseri arasında ilişki olduğunu bildirmektedir. (Bardia A ve ark., 2009). Örneğin, belirli kemokinlerin ekspresyonu, insan prostat kanseri için bir belirteçtir. (Blum DL ve ark., 2008). İnflamasyon bir çok hastalığın patogenezinde olduğu gibi prostat kanseri patogenezinde de rol oynamaktadır.

### **2.1.5.2. Oksidatif stres ve DNA hasarı**

Prostat karsinogenезinde yaşlanma ile ilişkili başlıca etkilerden birinin oksidatif stres ve bunun DNA hasarı üzerindeki kümülatif etkisi olduğunu öne sürülmektedir (Minelli A ve ark., 2009). Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) dengesizliğinden ve ROS' un hücrel seviyelerini kontrol eden detoksifiye edici enzimlerdeki eksiklikten kaynaklanır. ROS' leri lipidlere, proteinlere ve DNA' ya kümülatif zarar verir. Prostat hücreleri inflamasyon, hormonal deregülasyon, diyet ve/veya bazı genlerin baskılanması gibi epigenetik modifikasyonların bir sonucu olarak oksidatif strese karşı savunmasız kalmaktadır. Oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına bağlı olarak prostat kanseri arasındaki ilişkide dihidro-2'-deoksiguanozin'de (8-oxy-dG) rastlantısal bir artışla birlikte insan prostat kanserinde majör antioksidan enzimlerin azaldığı gösterilmiştir (Bostwick DG ve ark., 2000).

### **2.1.5.3. Telomer kısalması**

Prostat kanseri başlangıcında rol oynayan bir başka olay, genellikle DNA hasarı ile ilişkili olan ve kromozomal instabiliteye yol açabilen telomerlerin kısaltılmasıdır (Vukovic B ve ark., 2003). Telomer uzunluğu, hastalık sonucu ile ilişkili bulunmuştur (Joshua AM ve ark., 2007), prostat karsinomları ve birçok yüksek dereceli PIN'ler, iyi huylu prostat dokusunda gözlenmeyen telomeraz aktivitesini artırmaktadır (Koeneman KS ve ark., 1998). Bu gözlemler, telomer uzunluğunun, prostat kanseri ilerlemesi sırasında aktif olarak modüle edildiğini, ancak telomer kısalması ve kanser başlangıcı veya hücrel yaşlanmanın indüksiyonu arasındaki mekanik ilişkilerin şu anda belirsiz olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, telomer uzunluğunu düzenleyen çeşitli stratejiler, potansiyel terapötik ajanlar olarak araştırılmaktadır (Chen Z ve ark., 2003).

### **2.1.5.4. Yaşlılık**

Hücrel yaşlanma, hücrenin mitojenik sinyaller oluşturmasına rağmen proliferasyonun gerçekleşmesinin yeterli olmaması durumudur. (Evan GI ve d'Adda di Fagagna F, 2009). Son zamanlardaki çalışmalar, hücrel yaşlanmayı, onkogenik hareketlerden sonra malign fenotipin oluşumunu engelleyen güçlü bir tümör bastırma mekanizması olarak tanımlamıştır. Özellikle, aktive edilmiş onkogenlerin replikatif stres, ROS oluşumu veya DNA hasarına yanıt olarak çeşitli moleküler mekanizmalar yoluyla yaşlanmayı indüklediğine inanılmaktadır. Bu nedenle, onkogen bağımlı yaşlanma preneoplastik lezyonların malign duruma ilerlemesinde merkezi bir rol oynayabilir.



Prostat, hücre yaşlanmanın meydana geldiği ve prostat kansinogenezisi için bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, yaygın olarak kullanılan yaşlanmanın bir biyo-belirteci olan SA-β-Gal, insan prostatında biyopsi dokularındaki boyamalarda sıklıkla saptanmaktadır (Castro P ve ark., 2003).

#### **2.1.5.5. Genomik değişiklikler**

Prostat kanserinin kapsamlı genomik analizleri, kopya sayısı değişikliklerini ve prostat kansinogenezisiyle ilişkili kromozomal yeniden düzenlemeleri tanımlamıştır. Özellikle, 8q' deki kazanımlar ve 3p, 8p, 10q, 13q ve 17p' de kayıplar de dahil olmak üzere, kromozomal bölgelerin kazanımları veya kayıpları olarak karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) ile birtakım önemli somatik değişiklikler tanımlanmıştır. (Taylor BS ve ark., 2010). Daha önemlisi, bu genetik değişikliklerin birçoğu PIN'de ve ayrıca bu lezyonların prostat kanserine öncü ilişkisini destekleyen PIA lezyonları olarak tanımlanmıştır ve kanser prognozunun ilerletilmesi için önemini vurgulamıştır.

#### **2.1.5.6. Genetik etmenler**

Prostat kanseri için genetik yatkınlık lokuslarını tanımlamak için, hem erken başlangıçlı hastalıkların ailesel riski ile ilişkili kalıtsal faktörlerin analiziyle, hem de son zamanlarda genom çapında ilişkilendirme çalışmaları yoluyla geniş kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Genom çapında ilişki çalışmaları, kanser riski ile ilişkili birçok tek nükleotid polimorfizmi (SNP) belirlemiştir (Kader AK ve ark., 2009).

#### **2.1.5.7. Epigenetik değişiklikler**

Epigenetik pertürbasyonların, prostat kansinogenezinde önemli katkıda bulunan faktörleri temsil ettiği ve hastalığın ilerlemesi için yararlı biyobelirteçler sağlayabileceği düşünülmektedir (Nelson WG ve ark., 2007, 2009). Örneğin, DNA metilasyonu, sinyal iletimi, hormonal tepki, hücre döngüsü kontrolü ve *GSTP1* gibi oksidatif hasar cevabında yer alan genlerin susturulmasıyla ilişkilendirilmiştir. Dahası, prostat tümörleri, tümör hücrelerinin gen ekspresyon programında önemli bir sapma göstermesiyle sonuçlanan, kanser ilerlemesi ile çakışan kromatin modifikasyonundaki global değişiklikleri gösterir (Ke XS ve ark., 2009). Prostat kansinogenezisiyle ilişkili bir anahtar modifikasyon, histon H3'ün (H3K27-me3) lizin kalıntısı 27'nin trimetilasyonudur; bu, ilerlemiş hastalık ve metastazın anahtar onkogenik bir sürücüsü olan histon metiltransferaz enzimi Ezh2'nin aracılık ettiği bir durumdur (Varambally

S ve ark., 2002). H3K27-me3 işareti transkripsiyonel baskı ile ilişkili olduğundan, prostat kanserinde artmış seviyeler, Ras GTPase ailesinin bir üyesi olan DAB2IP gibi tümör baskılayıcı genlerin baskısıyla ilişkilidir (Chen H ve ark., 2005). Histon modifikasyonlarındaki global değişimler, kromatin susturmanın epigenetik izlerini de içeren yaşlanma ilişkili odakların (SAHF) gelişmesi yoluyla hücrel yaşlanma ile ilişkilidir (Funayama R ve Ishikawa F, 2007). Gelecekte, yeni nesil dizileme yaklaşımlarıyla histon modifikasyonlarının global analizleri, prostat karsinogenezisi için bu modifikasyonların kümülatif etkilerine dair geniş kapsamlı bilgiler sağlayabilir.

### **2.1.6. Prostat Kanseri Başlangıcı ve İlerlemesinin Moleküler Mekanizmaları**

Prostat kanser başlangıcında veya ilerlemesindeki mekanizmaların rolü tam olarak tespit edilememiştir. Prostat kanseri ile ilişkili mekanizmalar ve çeşitli proteinlerin olup olmadığı veya aralarında nedensel bir ilişki olup olmadığı bilinmemektedir.

#### **2.1.6.1. NKX3.1 down regülasyonu**

*NKX3.1* homeobox geninin down regülasyonu prostat kanseri başlangıcında sık ve kritik bir olayı temsil eder ve muhtemelen birden fazla mekanizmayı içerir (Abate-Shen C ve ark., 2008). *NKX3.1*, yüksek dereceli PIN lezyonları ve adenokarsinomların %85'ine kadar heterozigozite kaybı (LOH) sergileyen 150 Mb'lık minimum bir kromozom 8p21.2 silinmiş bölgesi içinde lokalizedir (Bethel CR ve ark., 2006).

Gelişim sırasında, *Nkx3.1*, ürogenital sinüsten yeni doğan prostat tomurcuklarının tüm epitel hücrelerinde eksprese edilir ve prostat epitelyumu için bilinen en erken belirteçdir (Bhatia-Gaur R ve ark., 1999). *Nkx3.1*'in yokluğunda, prostatik duktal dallanmada ve aynı zamanda sekretuar proteinlerin üretiminde önemli bir azalma vardır (Tanaka M ve ark., 2000).

#### **2.1.6.2. Myc up regülasyonu**

*MYC* onkojeni kapsayan 8q24 kromozom bölgesinin, ileri prostat tümörlerinin bir alt kümesinde somatik olarak güçlendirildiği uzun zamandır bilinmektedir (Sato K ve ark., 1999). Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalar, nükleer MYC proteininin birçok PIN lezyonunda up regüle edildiği gösterilmiştir. Gen amplifikasyonunun karsinomların çoğunluğunun arttığı gibi, *MYC* aşırı ekspresyonu için kanser başlangıcında bir rol önermiştir (Gurel B ve ark., 2008). Detaylı analizler, prostat tümörü örneklerinde risk alelleri ve MYC RNA ekspresyon seviyeleri arasında herhangi bir korelasyonu veya mikroRNA' lar (miRNA)

gibi protein kodlayıcı olmayan genlerin varlığını ortaya çıkarmamıştır (Pomerantz MM ve ark., 2009).

### **2.1.6.3. TMPRSS2-ERG translokasyonları**

Son zamanlardaki önemli çalışmalar, prostat kansinomlarının çoğunda *ETS* ailesinin transkripsiyon faktörlerini (ERG, ETV1 ve ETV4) aktive eden kromozomal yeniden düzenlemeleri tanımlamıştır (Saramaki OR ve ark., 2008). Bu yeniden düzenlemelerin en yaygın olanı bir *TMPRSS2-ERG* füzyon geni oluşturur ve bu da *TMPRSS2*'nin androjene tepki veren promotörünün kontrolü altında N-terminali kesilmiş ERG proteininin ifadesi ile sonuçlanır (Clark J ve ark., 2007).

### **2.1.6.4. PTEN**

*PTEN* prostat dahil olmak üzere birçok kanserde sıklıkla mutasyona uğramış veya silinmiş bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır (Salmena L ve ark., 2008). Prostat kanseri için *PTEN* kaybının önemi, prostat tümörlerinde sık sık azaldığı veya ekspresyon kaybının yanı sıra prostat kanserinde sıklıkla alel kaybına uğrayan kromozomal bölge 10q23 üzerindeki konumundan ortaya çıkmıştır (Dong B ve ark., 2007). Çalışmalar, *PTEN* allellerinin prostat kanserinde silinip silinmediğine, bir allelin silinmesine, kalan allelin mutasyona uğratılıp dönüştürülmediğine, *PTEN* proteininin ekspresyonunun azaltılmasına, inaktive edilmesine ya da subselüler lokalizasyonunun değiştirilmesine bağlı olarak çeşitli veriler oluşturmuştur.

### **2.1.6.5. Sinyal yolları Akt/mTOR ve MAPK sinyali**

Prostat kanserinde *Pten* işlev kaybının, öncelikle Akt1 aktivasyonu yoluyla Akt/mTOR sinyal yolunun up regülasyonu ile sonuçlandığını gösterir (Shen MM ve Abate-Shen C, 2007). Prostat kanserinde bu yolun up regülasyonu ayrıca Akt1'in aktive edici mutasyonları (Boormans JL ve ark., 2008) veya PI3K' nin p110 $\beta$  izoformunun aktivasyonu yoluyla gerçekleşebilir (Lee SH ve ark., 2010). Akt/mTOR yol aktivasyonunun fonksiyonel sonuçları, genetik olarak tasarlanmış fare modellerinde gösterildiği gibi, kastrasyona dirençli prostat kanseri, ortotopik greftleme veya doku rekombinasyon modelleri ile ve aynı zamanda insan hücresinde işlev kazandırma çalışmalarında önemlidir (Xin L ve ark., 2006). Akt aktivasyonu öncelikle hücre zarında oluşur ve sonuç olarak prostat kanseri hücrelerinde kolesterol düzeylerine duyarlıdır (Adam RM ve ark., 2007).

### 2.1.6.6. Onkojenik tirozin kinazlar

Onkojenik tirozin kinazların ekspresyonu, terapötik ilaç olarak kullanılabilmesi için birçok kanserde kapsamlı olarak çalışılmıştır (Gschwind A ve ark., 2004). Prostat kanserinde, özellikle Her2/Neu veya SRC (sarkoma ile ilişkili) tirozin kinazları aracılığıyla aberran tirozin kinaz sinyalleri, agresif hastalık, metastaz ilerlemesi ve kastrasyon direnci ile ilişkili olarak bulunmuştur. İlerlemiş hastalığı olan hastalarda önemli bir terapötik hedef olarak gösterilmiştir (Fizazi K, 2007). Özellikle, AR sinyalizasyonunun uyarılması, prostat kanseri hücrelerinde SRC' nin aktivasyonuna yol açar, bu da AR'nin fosforilasyonuna, kastrasyon direncine ve hücrel proliferasyona ve invaziviteye yol açabileceği bildirilmiştir (Kraus S ve ark., 2006). Bununla birlikte, SRC ve diğer onkojenik tirozin kinazların çoğu fonksiyonel analizi, kültürde veya ksenogrefflerde prostat kanseri hücre hatları çalışmaları ile sınırlı kalmıştır. İn vivo modellerin ve klinik örneklerin bağıntılı çalışmalarının daha fazla analizini gerekmektedir.

### 2.1.6.7. Gelişimsel sinyal yolları

Prostat gelişiminin moleküler analizleri sonucu meydana gelen değişikliklerin tespit edilmesi prostat karsinogenezisi için önemli bilgi sağlayabilir. Çünkü son çalışmalar, prostat tümörlerinin normal olarak embriyonik/neonatal organogenez sırasında eksprese edilen genlerin geniş bir yelpazesini ifade ettiğini göstermekte, bu da kanser progresyonunun gen ekspresyonunun yeniden aktive ettiğini göstermektedir (Pritchard C ve ark., 2009). Özellikle, Wnt sinyali kastrasyon direncinin ortaya çıkmasında rol oynayabilirken (Wang G ve ark., 2008), bazı genlerin aşırı ekspresyonundan Wnt sinyali ilişkili proteinlerde değişiklik meydana gelebilir (Yu X ve ark., 2009). İnsan tümörleri Wnt yolağında önemli bir protein olan  $\beta$ -katenin' in nükleer lokalizasyonunun, tümör progresyonu ile ters orantılı olduğunu ve Wnt sinyalleşmesinin prostat kanserinde rol oynayacağını göstermektedir (Whitaker HC ve ark. 2008). Hedgehog yoluna gelince; Hedgehog sinyalleşmesinin aktivasyonunun prostat kanseri ilerlemesinde önemli bir rol oynadığına dair önemli kanıtlar olmasına rağmen, bunun epitelyal hücrelerde bir otokrin mekanizmasından mı yoksa alternatif olarak stromal bileşenleri içeren parakrin sinyalleşmesi yoluyla gerçekleşip gerçekleşmediği açık değildir (Shaw A ve ark., 2009).

### 2.1.6.8. Ezh2

*EZH2* genleri, ilerlemiş prostat kanserinde sıklıkla regüle edilen bir histon lizin metiltransferazını kodlar. Bazı durumlarda gen amplifikasyonu ile (Saramaki OR ve ark., 2006) ve agresif tümörler ile ilişkilendirilmiştir (Bachmann IM ve ark., 2006). *EZH2* ekspresyonu miR-101 ile negatif olarak düzenlenir ve *miR-101* allellerinin bir veya her ikisinin de somatik kaybı ile birlikte kanser progresyonu sırasında miR-101 ekspresyonu azalır (Zhao B ve ark., 2007). Prostat kanserinde diğer *EZH2* hedef genleri, Ras ve NF-κB yollarının aktivasyonu yoluyla prostat kanseri metastazını arttıran *E-kaderin* ve DAB2IP dahil olmak üzere spesifik olarak metastaz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Min J ve ark., 2010).

### 2.1.6.9. miRNA' lar

miRNA'lar normal büyüme ve gelişme süreçlerinin yanı sıra kanserle ilişkili patojenik süreçleride düzenledikleri son yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Volinia S ve ark., 2006). İnsan prostat tümörleri ve ksenograftları ile ilgili miRNA ekspresyon profillemeye çalışmaları, miRNA' ların ekspresyonlarındaki değişikliklerin agresif ve kastrasyona dirençli prostat kanserlerinin ayırt edilebileceğini göstermiştir (Sun T ve ark., 2009). Bu bulgular ile uyumlu olarak, Dicer gibi miRNA sentezinin ve işlenmesinin anahtar enzimatik bileşenleri prostat tümörü ilerlemesi sırasında up regüle edilirken, Dicer'in koşullu silinmesi ile oluşturulan farelerin fonksiyonel analizleri, miRNA'ların prostat epitelyal proliferasyonunda için bir rolü olduğunu desteklemektedir (Zhang L ve ark., 2010). Dahası, miR-106b-25 kümelenmesi, PTEN ekspresyonunu negatif olarak düzenlerken, (Poliseno L ve ark., 2010a) miR-101'in genomik kaybı, prostat kanseri ilerlemesinde *EZH2*'nin up regülasyonuna yol açtığından, miRNA'lar kritik hedef genlerin düzenlenmesinde spesifik rollere sahiptir (Varambally S ve ark., 2008).

### 2.1.7. Translasyonel Uygulamaları

Son yıllarda, prostat kanseri ile ilgili translasyonel araştırmaların başlıca alanları, ilk olarak prostat karsinogenezini etkileyen diyet, yaşam tarzı, çevresel faktörleri anlamak ve bunun başlangıcını veya ilerlemesini geciktirmek için stratejileri tanımlamaya odaklanmıştır. İkinci olarak hastalığın agresif formlarını ve agresif olmayanlarını ayırt eden biyobelirteçlerin tanımlanması ve bu tür biyobelirteçlerin hastaların sınıflandırılması için kullanılmasını amaçlar. Üçüncü olarak kastrasyona dirençli prostat kanserinin tedavisinde ve ayrıca kemik metastazlarının önlenmesinde yeni terapötiklerin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Ümit verici

olabilecek yeni bir terapötik yaklaşımın bir örneği, ilerlemiş prostat kanseri hastaları için terapötik bir aşının FDA onayı ile immünoterapide kullanılmasıdır (Morse MA ve Whelan M, 2010). Aşağıda, temel araştırma, son teknolojik gelişmeler ve/veya in vivo analizler için sağlam preklinik modellerin uygulanmasından nasıl yararlanabileceğine odaklanarak, çeviri araştırması için ana yönleri kısaca vurgulanmaktadır.

### **2.1.7.1. Kanser önlenmesinde diyet ve yaşam tarzı faktörleri**

Epidemiyolojik araştırmalar, diyet/yaşam tarzı faktörlerinin, klinik prostat kanserinin ortaya çıkmasında popülasyon farklılıklarına önemli katkıda bulunduğu fikrini desteklemektedir (Kolonel LN, 2001). Özellikle, diyet ve yaşam tarzı farklılıkları, Asya ve Amerikan popülasyonları arasında klinik prostat kanseri insidansında önemli farklılıklar gösterebilir ve bu da kanser saptama oranındaki yaklaşık 10 yıllık bir değişimi yansıtır. Özellikle, Asyalılar Batı ülkelerine göç ettiğinde, kanser oranındaki bu farklılık ortadan kalkar (Dunn JE, 1975). Bununla birlikte, bu farklılıklar için moleküler ve mekanistik temeller tam olarak açıklanmamıştır.

Önemli veriler, diyet/yaşam tarzı faktörlerinin kronik iltihap ve/veya oksidatif stresi artırarak, nihayetinde DNA hasarı, epigenetik modifikasyonlar ya da kanser başlangıcı ile ilişkili diğer pertübasyonlara yol açarak, prostat kanseri insidansını etkilediği hipotezini desteklemektedir (Nelson WG, 2007). Bu model, sonuç olarak, prostat kanserine karşı korunmada antioksidanların ve anti-inflamatuar ajanların rolünü vurgulamıştır (DeWeese TL ve ark., 2001). Bu modeli test eden bazı önleme çalışmaları başarılı olmuştur; bunlardan biri, güçlü antioksidan likopen içeren büyük miktarda domates tüketiminin, prostat kanseri insidansının azalması ile sonuçlandığını göstermektedir (Chen L ve ark., 2001). Bununla birlikte, diğer çalışmalar antioksidanlarla takviyenin prostat kanseri riskini azaltacağını göstermiştir (Kirsh VA ve ark., 2006). Selenyum ve E vitamini ile takviye ile yarar sağlamayan SELECT çalışmasının sonucu büyük bir hayal kırıklığı yarattı (Lippman SM ve ark., 2009).

Ek çalışmalar, klinik öncesi fare modellerini araştırmak için epidemiyolojik bulgular kullanarak antioksidanların, anti-enflamatuar ajanların ve/veya diğer diyet faktörlerinin potansiyel etkinliğini ele almıştır. Örneğin, diyet kısıtlamasının anti-tümörijenik olduğunu gösteren kapsamlı bir literatür esasına dayanarak, genetik olarak yapılandırılmış farelerde diyet kısıtlaması veya düşük yağlı diyetlerin analizi, bu diyet müdahaleleri için moleküler hedef olarak PI3K-Akt sinyal yolunu ortaya çıkarmıştır (Kalaany NY ve Sabatini DM, 2009).

Bir başka umut verici ajan ise, tümörüne karşı korunmak için yeterli epidemiyolojik kanıt tarafından önerilmiş olan, fakat klinik çalışmalarda değişken etkinlik gösteren vitamin D'dir (Deeb KK ve ark., 2007). Özellikle, vitamin D uygulamasının zamanlamasının kritik olduğunu gösteren, genetik olarak tasarlanmış farelerde yapılan analizler, yararlı etkileri, prostat epitelyal hücrelerinde vitamin D reseptörünün ekspresyonunu teşvik ettiği için, sadece kanser progresyonunda erken gerçekleşmektedir (Banach-Petrosky W ve ark., 2006). Bu örnekler, epidemiyolojik analizlerin, kanser önleme için diyet müdahalelerinin etkili bir şekilde tasarlanması ve uygulanması için prelinik modellerdeki mekanizmaların sistematik olarak değerlendirilmesiyle bütünleştirilmesinin önemini vurgulamaktadır.

### **2.1.7.3. Önleme ve tedavi için AR sinyalini manipülasyonu**

Prostat kanserinin gelişmesi için AR sinyalizasyonunun temel rolü, prostat kanserinin önlenmesi için 5 $\alpha$ -redüktaz inhibitörler yaygın olarak kullanılmaktadır (Higgins B ve Thompson IM, 2004). Finasterid bir inhibitör olup prostat kanseri insidansında %24'lük bir azalma göstermiştir. AR'nin kastrasyon direncindeki merkezi rolüne bağlı olarak, yeni AR yolu inhibitörleri ileri prostat kanseri için potansiyel olarak önemli terapötikler sağlayabilir (Knudsen KE ve Scher HI, 2009). Bu bağlamda, agonist aktivitesinden tamamen yoksun ve AR'yi bikalutamide göre daha fazla afinite ile bağlayan ikinci nesil bir AR antagonisti olan MDV3100, kastrasyon direncine yeni bakış açıları sağlamıştır ve fare modellerinde ve insan evresi 1-2 deneyinde umut verici sonuçlar vermiştir (Scher HI ve ark., 2010). AR'nin N-terminal transkripsiyon düzenleyici bölgesini hedef alan diğer ajanlar, hücre hatları ve fare modellerinde değerlendirilmektedir (Andersen RJ ve ark., 2010). Bir başka umut verici AR yolu antagonisti, androjen biyosentezinde iki aşama için gerekli olan bir enzim olan CYP17'nin aktivitesini inhibe eden ve başlangıç klinik çalışmalarında ümit verici sonuçlar veren Abirateron Asetattır (Chen Y ve ark., 2009).

### **2.1.7.4. İleri hastalıkların tedavisinde sinyal yollarının hedeflenmesi**

Zayıf anlaşılan nedenlerle, standart kemoterapi rejimlerinin terapötik yararları, ilerlemiş prostat kanseri olan hastalarda sınırlı olmakla birlikte, geçtiğimiz birkaç yıl içinde iyileşmeler sağlanmıştır (Petrylak DP, 2007). Bu nedenle, güncel yaklaşımlar, Akt/mTOR ve MAPK sinyal yolları dahil olmak üzere, ilerlemiş prostat kanserinde aktive edilen sinyal yollarını hedeflemeyi amaçlamıştır.

### **2.1.8. Perspektifler ve Sonuçlar**

Geçtiğimiz 10 yıl içinde gerçekleşen muazzam ilerlemeyi dikkate alarak, önümüzdeki on yıl içinde, prostat kanserinin önlenmesi, teğhisi ve tedavisi için arağtırmalarda etkili stratejiler geliğtirilecektir. Gelecekteki alığmaların zorlukları arasında, çevresel arağtırmalar, diyet ve yağam tarzı etkilerinin prostat kanserinin geliğimine nasıl katkıda bulunduğu, moleküler faktörleri tanımlamaya yönelik arağtırmalar ve klinik analizlere epidemiyolojik alığmaları entegre etmek olacaktır. En önemlisi, prostat kanserine sahip erkeklerin etkili tanısı ve tedavi yönetimi için yüksek riskli ve dğk riskli grupların sınıflandırılması olacaktır. Bu nedenle, biyobelirteç keğfinin, muhtemelen hastalık ilerlemesi ile iliğkili sinyal yollarının doğru bir Şekilde aydınlatılmasını sağlamak önemlidir. Prostat kanserinde düzenleyici genlerin tanımlanmasına odaklanacak gelecekteki arağtırmalar hız kazabmaktadır. Prostat kanseri metastazının kemik tropizmi ve kastrasyona dirençli prostat kanserinin altında yatan mekanizmaların daha iyi anlağılmasını gerektiren prostat kanserinin ölümcül formlarına geiği önlemek için daha etkili stratejiler geliğtirilmelidir. Bu nedenle, son on yılda prostat kanserinin moleküler genetiği konusundaki bilgimiz geniğlemiğ olsa da, genel prostat kanseri sağkalım oranını arttırmak için yapılması gereken çok iç vardır.

### **2.2. İnterferonlar**

İnterferonlar (IFN' ler), iğgalci patojenlere karėı konak savunmasının ilk ağamalarından birini temsil eden güçlü antiviral aktiviteleri olan glikoproteinlerdir. IFN' ler ilk olarak 1957' de güçlü antiviral aktivitelere sahip heterojen çözünebilir bir glikoprotein sınıfı olarak tanımlanmığtır. Ekspresyonlarının indüksiyonu, virüslere veya bakteri enfeksiyonuna tepki olarak ortaya çıkar. Bağığıklık yanıtlarını modüle etme yetenekleri nedeniyle, kronik virüs enfeksiyonlarını kontrol etmek için dikkat çekici tedavi seçenekleri haline gelmiğtir. Bu proteinler, hücre yüzeyindeki reseptörlerinin yapısına bağlı olarak Tip I, Tip II ve Tip III IFN' ler olmak üzere üç gruba ayrılır. Diğer ilaçlarla kombinasyon halinde, Tip I IFN' ler, Hepatit C (HCV) ve Hepatit B (HBV) enfeksiyonlarını baskılayan bir 'bakım standardı' olarak kabul edilirken, Tip III IFN, faz III klinik alığmalarda HCV enfeksiyonu için tedavi edici sonuçları bulunmuğtur. Bununla birlikte, etkili olsa da, IFN' leri bir tedavi olarak kullanmak, dikkat gerektirir. IFN' ler, çok eğitli hücre tiplerini etkileyen güçlü sitokinlerdir. Sonuç olarak genellikle sistem rahatsızlığı olan hastalarda hoğ olmayan semptomlar ile karėılaėılır. Bu nedenle, virüs enfeksiyonunu baskılamak, yağam kalitesini korumak ve tedavi hedeflerine ulağmak için IFN ile tedavi edilen hastaların sürekli izlenmesi gereklidir.



Bağışıklık yanıtlarını modüle etme yetenekleri nedeniyle, çeşitli kanserler ve otoimmün hastalıklar için bir tedavi seçeneği olarak düşünülmüştür. Rekombinant IFN' lerin gelişmesiyle, IFN' ler arzının artık sınırlı olmadığı için daha da çekici bir tedavi seçeneği haline gelmiştir. Sadece antiviral ilaçlar kullanarak kronik virüs enfeksiyonunu kontrol etmek ilaca dirençli suşların oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle spesifik viral proteinleri hedefleyen immün terapide yaygın olarak kullanılan IFN' ler gibi tedavi seçenekleride ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda Tip I IFN'ler, HCV ve HBV enfeksiyonları için standart tedavinin bir parçası olmuştur. INF tedavisinde virüs dirençli alt popülasyonlarının ortaya çıkmadığı gözlenmiştir.

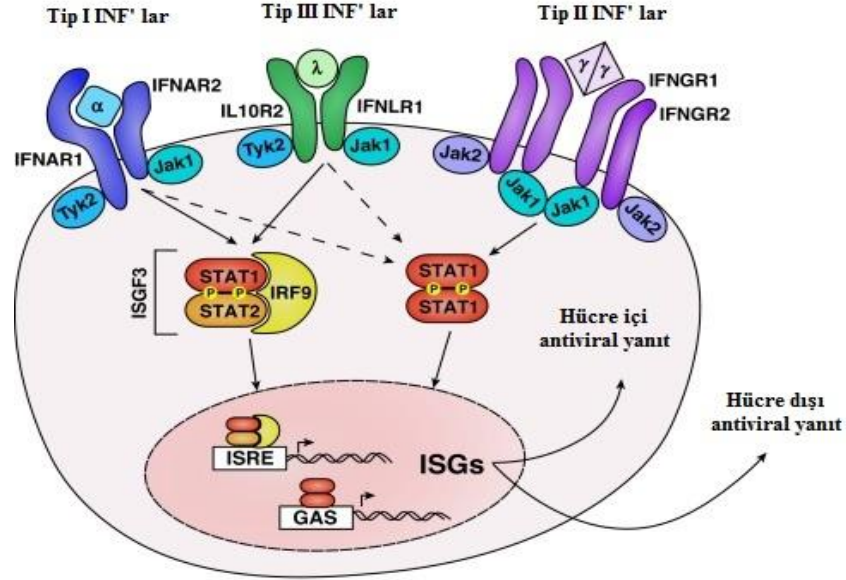
HCV, HBV ve HIV gibi bazı virüsler, konakçı immün yanıtlarından kaçınabilir ve konakçıda kronik bir enfeksiyona neden olabilir. Bu enfeksiyonlarda viral replikasyonu azaltmak ve ortadan kaldırmak terapötik müdahale gerektirir. Genomik mutasyonun yüksek insidansına bağlı olarak, virüsler, viral proteinleri hedef alan ilaçlara karşı direnç ve uyum sağlayabilmektedir. Bu nedenle, konakçı antiviral immün tepkisini geri kazandırabilen ve güçlendirebilen bir tedavi, virüs enfeksiyonunu kontrol etmede çok önemli hale gelmektedir. IFN proteinlerinin güçlü antiviral aktivitesi ve bağışıklık yanıtını modüle etme yetenekleri, IFN' leri antiviral tedavide kullanmak için mükemmel adaylar haline getirmektedir. Bununla birlikte, bağışıklık sistemi sağlık ve hastalık arasındaki dengeyi korumak için hassas ve ince bir manipülasyon gerektiren son derece karmaşık bir makinedir. IFN' ler, hastalıklara yönelik tedaviler olarak bunları kullanan güçlü sitokinlerdir ve konakçı tepkisinin hiperaktivasyonu ile bağışıklık homeostasisini dengeleyebilir. Ek olarak, geniş bir hücre tipi yelpazesi IFN' ler tarafından uyarılmaya yanıt verdiğiinden, IFN kullanımının sonuçları bağışıklık sisteminin ötesine uzanır. Bu nedenle, IFN' lerin virüs replikasyonunu başarılı bir şekilde baskılamak ve yayılan bir enfeksiyonu içermesi için klinik olarak kullanılması, konakçı anti-viral cevabı arttırmanın ötesine geçen potansiyel olarak zararlı yan etkiler için hastaların sürekli olarak izlenmesini gerektirecektir.

## **2.2.1. Tip I İnterferonlar: İnterferon Alfa/Beta (IFN- $\alpha/\beta$ )**

### **2.2.1.1. TİP I interferonlar ve dahil oldukları sinyal ileti yolları**

Tip I IFN' ler, IFN- $\gamma$ , IFN- $\lambda$ s (Tip III IFNler), IL-10 ve birkaç IL-10 homologları (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 ve IL-26) dahil olmak üzere,  $\alpha$ -sarmal sitokinlerin sınıf II ailesine aittir. Tip I IFN' ler viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara yanıt olarak tüm memeli hücreler tarafından üretilebilir. İnsanlarda, Tip I IFN ailesi, 14 gen tarafından kodlanan 12 IFN- $\alpha$  alt

tipinden, tek bir *IFNB* geni tarafından kodlanan IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  ve IFN- $\omega$ ' dan oluşmaktadır (Theofilopoulos AN ve ark., 2005). Araştırmalarda iyi tanımlanmış iki Tip I IFN, IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$  üzerinde odaklanılmıştır.



Şekil 7. İnterferon kanonik sinyal yolları.

Tip I, II ve III IFN'ler, hücre membranındaki spesifik reseptörlerine bağlanır ve JAK-STAT sinyal yolunu tetikler. Tip I ve III, yanıt veren genlerin promoter bölgesinde sırasıyla ISRE ve GAS'a bağlanan ISGF3 ve GAF'yi oluşturmak için hem STAT1 hem de STAT2'yi fosforile edebilirken, Tip II IFN sadece STAT1'i fosforile edebilir ve promoter bölgesinde GAS ile genlerin ekspresyonunu indükleyebilir. Şekli türkçeleştirir kaynak ver

Tüm Tip I IFN'ler aynı heterodimerik reseptör IFN $\alpha/\beta$  reseptörüne (IFNAR) bağlanarak sinyalleri iletir. IFNAR hemen hemen tüm hücre tipleri tarafından ifade edilir ve sırasıyla tirozin kinaz 2 (TYK2) ve Janus kinaz 1 (JAK1) ile ilişkili IFNAR1 ve IFNAR2 alt birimlerinden oluşur. IFNAR' ye bağlanma, IFNAR sitoplazmik bölgelerindeki tirozin kalıntılarını fosforile eden TYK2 ve JAK1 aktivasyonu ile sonuçlanır. Böylece daha sonra JAK tarafından hedeflenen sinyal transdüktörleri ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT), (çoğu hücre tipinde STAT1, STAT2 ve STAT3) için kenetlenme bölgeleri oluşturulur. Fosforlanmış STAT' ler (pSTAT' ler), homodimerler veya heterodimerler oluşturur ve çekirdeğe translokasyon yapar. PSTAT1 homodimeri, interferon ile uyarılmış genlerin (ISG' ler) promoter bölgesinde gama-aktive edilmiş diziye (GAS, TTCNNGAA) bağlanır. Bu hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır, pSTAT3 tarafından oluşturulan homodimer, güçlendirici dizi STAT3-bağlama elemanı içeren genlerin transkripsiyonunu aktive eder.

Fosforile edilmiş STAT1 ve STAT2, IRF9' un yapıya dahil edilmesine ile IFN ile uyarılan gen faktör 3 (ISGF3) kompleksinin oluşumuna yol açan bir heterodimer oluşturur. Bu kompleks daha sonra çekirdeğe aktarılır. IFN-uyarımlı yanıt elemanları (ISRE' ler) IFN duyarlı genlerin (ISG' ler) promotör bölgesinde bağlanır. Tip I antiviral aktiviteler için önemli olan genlerin transkripsiyonunu başlatır (Şekil 7) (Gonzalez-Navajas JM ve ark., 2012; Ivashkiv LB ve Donlin LT, 2014). STAT1, STAT2 ve STAT3' e ek olarak, Tip I IFN'nin belirli hücre tiplerinde STAT4, STAT5 ve STAT6'yı da aktive ettiği gösterilmiştir (van Boxel-Dezaire AH ve ark., 2006). JAK aktivasyonu ayrıca, Tip I IFN sinyal gücü ve büyüklüğünü daha da güçlendiren PI3K, NF- $\kappa$ B ve MAPK yolları dahil olmak üzere birçok alternatif sinyal yolunu da indükleyebilir.

### **2.2.1.2. Tip I interferonların antiviral işlevleri**

Tip I IFN, hücreden hücreye viral yayılımı sınırlamada virüs replikasyonunu engelleyen bir dizi protein indüklerler (Boasso A, 2013; Stetson DB ve Medzhitov R, 2006). 2'-5'-oligoadenilat sentetaz (OAS), viral RNA yıkımına aracılık eden latent nükleaz RNazL'ı aktive eden Tip I IFN ile indüklenen bir enzimdir. Ökaryotik başlatma faktörü 2 $\alpha$  ailesinin bir üyesi olan aktifprotein kinaz RNA (PKR), viral RNA translasyonunu bloke eden guanidin difosfatın geri dönüşümünü önler. Tip I IFN ile indüklenen diğer önemli antiviral proteinler, viral nükleokapsid lokalizasyonunu kısıtlayan miksovirus direnci (Mx) GTPazları, viral partiküllerin serbest bırakılması ile etkileşime giren interferon ile uyarılmış gen 15 (ISG15) ve tripartit motifi (TRIM) proteininin yanı sıra viral DNA'nın hipermutasyonunu indükleyen bir protein olan APOBEC3'dür. Enfeksiyonu sınırlamak ve lokalize etmek için, Tip I IFN'ler, aynı zamanda Fas ligandını (FasL), PDL-1 ve TRAIL'i düzenleyerek virüsle enfekte olmuş hücreleri yok etmek için apoptoz mekanizmasını aktive edebilir. Tip I IFN enfekte hücrelerde antiviral mekanizmayı aktive etmenin yanı sıra, hem doğal hem de adaptif bağışıklığı modüle ederek virüs enfeksiyonunu da sınırlayabilir. Tip I IFN'ler, enfekte hücreleri yok etmek ve enfeksiyonu sınırlandırmak için sitotoksitelerini arttırmak için NK hücrelerini doğrudan aktive eder. Bununla birlikte, patojenlerin neden olduğu hücre içi enfeksiyonun tamamen ortadan kaldırılması, adaptif immün yanıtın aktivasyonunu gerektirir ve Tip I IFN'lerin bu aktivasyon sürecinde aktif bir rolü vardır. Tip I IFN'ler, Th4 veya Th2 hücrelerine CD4<sup>+</sup> T hücresi farklılaşmasını kolaylaştıran dendritik hücrelerin (DC'ler) olgunlaşmasını teşvik eder (Boasso A, 2013; Stetson DB ve Medzhitov R, 2006). Çalışmalar, Tip I IFN' nin CD8<sup>+</sup> T hücrelerini uyurabildiğini ve bu hücrelerinin proliferasyon ile sonuçlandığını göstermiştir. Bu

Tip I IFN' lar NK ve CD8<sup>+</sup> hücreleri aracılığı ile IL-15 kemokinlerin ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Tip I IFN'lerin tüm bu hücre içi ve dışı etkileri ile hücre içi patojenlere karşı etkili bir yanıt oluşturmak için konakçı bağışıklık sistemini hazırlar.

Geniş antiviral aktivitesiyle, rekombinant IFN- $\alpha$  ilk kez 1986 yılında HCV tedavisinde kullanılmıştır. Ancak, hızlı emilim, kısa yarı ömür ve böbrek tarafından hızlı bir şekilde elimine edilmesinden dolayı, nükleosit analogu ribavirin eklenmesiyle bile sonuç istenenden daha az olmuştur. Sürekli ve stabil kan düzeylerinin daha yavaş emilimine ve korunmasına izin vermek için, bir polietilen glikol (PEG) parçası takılarak sentezlenen modifiye edilmiş IFN, 2001 yılında klinik uygulamalarda kullanılmaya başlamıştır (Zeuzem S ve ark., 2003; Aghemo ve ark., 2010).

Başarılı olsa da, hemen hemen tüm hücre tipleri IFNAR' ı ifade ettiğinden, IFN tedavisi sıklıkla istenmeyen sistemik yan etkilerle birlikte görülür. Yorgunluk, baş ağrısı, ateş, kas ağrısı, titreme ve psikiyatrik semptomlar gibi etkiler yaygın IFN- $\alpha$  kaynaklı yan etkilerdir. Tedavi sırasında gözlenen yaygın hematolojik anormalliklerden biri olan anemi temel olarak ribavirinin, nötropeni ve trombositopeni ise IFN- $\alpha$  tedavisinin bir sonucudur (Sulkowski MS ve ark., 2011). Semptomların şiddetine bağlı olarak doz azaltma veya tedavi kesilmesi gerekebilir. Sistemik yan etkiler nedeniyle, albümin-IFN- $\alpha$ , IFN- $\lambda$  ve konsensüs IFN- $\alpha$  dahil olmak üzere diğer IFN' ler, PEG-IFN- $\alpha$ ' nin yerini alacak potansiyel adaylar olarak çalışılmıştır. (Zhao HL ve ark., 2008). Albumin bağlı IFN- $\alpha$ ' nın, IFN- $\alpha$  ile ilgili yan etkilerin görülme sıklığını sınırlandırabilecek 2 haftalık ve hatta 4 haftalık bir doz uygulamasına izin verir. Bir faz I/II çalışması umut verici sonuçlar vermesine rağmen, bir faz III çalışmasının sonuçları, sadece ortak IFN- $\alpha$  ile ilişkili yan etkilerin değil, aynı zamanda PEG-IFN- $\alpha$ 2a tedavi gruplarına kıyasla pulmoner komplikasyonların artması nedeniyle albümin IFN- $\alpha$ 'nın güvenliğine ilişkin endişeleri ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak, FDA onayı başvurusu uygun görülmemiştir (Balan V ve ark., 2006; Zeuzem S ve ark., 2010).

HCV tedavisi için kullanılmasına ek olarak, PEG-IFN- $\alpha$ 2a ayrıca kronik HBV enfeksiyonunun tedavisinde de kullanılmıştır. Etkili bir aşı ile, HBV ile enfekte olan yaklaşık 350-400 milyon hasta vardır. Sitopatik olmayan HBV, immün yanıtları tetikleyebilir ve nihayetinde siroz ve HCC' ye neden olan sürekli karaciğer inflamasyonu ile sonuçlanır (Lavanchy D, 2004).

IFN- $\beta$ , multipl sklerozda da tedavi amacıyla kullanılsa da, IFN  $\beta$ ' nin IFN- $\alpha$ ' ya benzer antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterildiğinden, antiviral tedavide de kullanılmıştır. IFN- $\beta$ 'nin alternatif bir tedavi seçeneği olarak veya HCV enfeksiyonu için standart bakım ile kombinasyon halinde etkinliği Japonya, Kore ve Çin dahil olmak üzere Asya'da kapsamlı bir

şekilde araştırılmıştır (Ahn SH ve ark., 2009; Inoue K ve ark., 2009; Ishikawa T ve ark., 2012). İlâveten, IFN- $\beta$  ile tedavi, IFN- $\alpha$ 'ya kıyasla düşük bir yan etki görülmüştür. Bununla birlikte, IFN- $\beta$  tedavisi için sadece bir rekombinant IFN- $\beta$  formu olduğundan oldukça zordur. Bu IFN- $\beta$  biçimi daha kısa bir yarı ömre sahiptir ve arzu edilen bir sonuca ulaşmak için günde bir veya iki kez uygulama yapılmasını gerektirir.

## **2.2.2. Tip II İnterferon: İnterferon Gama (IFN- $\gamma$ )**

### **2.2.2.1. IFN- $\gamma$ ve dahil olduğu sinyal ileti yolları**

IFN- $\gamma$  molekülü, iki katlı simetriye sahip iki antiparalel katlanmış interlokasyon polipeptidden oluşur. Dimer oluşumu ve katlanması biyolojik işlevi için önemlidir ve omurgalılar arasında korunmuş olduğu gösterilmiştir (Savan R ve ark., 2009). Hemen hemen tüm hücrelerde IFN- $\gamma$  reseptörleri bulunur. IFN- $\gamma$  kaynağı, insan doğal öldürücü (NK) hücreleri ve T hücreleri olarak bilinir. IFN- $\gamma$ 'nin biyolojik etkisi, hücreler arasında ekspresyon seviyesi sürekli olarak yüksek olan iki ligand bağlayıcı IFN- $\gamma$ R1 ve IFN- $\gamma$ R2 zincirleri ile kontrol edilir. IFN- $\gamma$  ilk olarak IFN- $\gamma$ R1' e bağlanır ve IFN- $\gamma$ :IFN- $\gamma$ R1 kompleksinin oluşumu IFN- $\gamma$ R2 ile ilişkisini kolaylaştırır. Buna bağlı sinyal yolları harekete geçer (Schroder K ve ark., 2004). Bu ligand reseptör kompleksinin oluşumu, birbirlerini transaktive etmek için, N-terminal alanlarından IFN- $\gamma$ R1 ve IFN- $\gamma$ R2' ye JAK1 ve JAK2' nin bağlanmasına neden olur. Aktive edilmiş JAK' lar daha sonra, her bir IFN- $\gamma$ R1 zinciri üzerindeki tirozin kalıntısını fosforillerken, bu fosforilasyon STAT1 için bağlanma alanını oluşturur. pSTAT1' ler, nükleusa translokasyon yapan ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatan bir homodimer oluşturur (Şekil 7) (Saha B ve ark., 2008). JAK/STAT yolu, IFN- $\gamma$  stimülasyonu tarafından başlatılan birincil sinyal yoludur. IFN- $\gamma$  Tip I IFN' lere benzer şekilde, IFN- $\gamma$  tedavisinden sonra aktive olduğu gösterildiğinden, MAP kinaz, PI3K ve NF- $\kappa$ B sinyal yolağı gibi STAT1-bağımsız yollarını da aktive edebilir (Gough DJ ve ark., 2008). Ek olarak, IFN- $\gamma$ 'nin ayrıca kanonik olmayan bir sinyal yolunu da indüklediği gösterilmiştir. Bu yolda IFN- $\gamma$ , reseptör alt birimi IFNGR1 ve pSTAT1 ile birlikte, çekirdeğe translokasyon yapar ve IFN indüklenabilir genlerin promoter bölgesindeki GAS elementlerine bağlanarak gen ekspresyonunu indükler (Johnson HM ve ark., 2013).

### **2.2.2.2. IFN- $\gamma$ antiviral etkileri**

Virüs enfeksiyonu sırasında, IFN- $\gamma$  birkaç antiviral proteinin ekspresyonunu indükleyerek hücrel antiviral mekanizmayı tetikleyebilir. PKR, OAS ve Mx GTPaz' a ek

olarak, IFN- $\gamma$ , ayrıca viral proteinlerin yanlış translasyonununa yol açarak virüs replikasyonunu inhibe eden dsRNA' ya özgü adenosin deaminaz (ADAR) ekspresyonunu da arttırabilir. Tip I IFN' lere benzer şekilde, IFN- $\gamma$ , virüsle enfekte olmuş hücreleri ortadan kaldırmak için FasL' yi düzenleyerek apoptosisi indükleyebilir. Ayrıca, IFN- $\gamma$  hücrelerin antiviral durumunu daha da arttıran Tip I IFN ekspresyonunu arttırır. Antiviral proteinlerin indüksiyonuna ek olarak, IFN- $\gamma$  ayrıca hem doğuştan gelen hem de adaptif immün yanıtları modüle ederek antiviral etki gösterir. İlk olarak, IFN- $\gamma$ , enfeksiyon bölgelerine makrofajları, nötrofilleri ve T hücrelerini almak için endotel hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastlar tarafından proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu indükleyebilir (Roff SR ve ark., 2014). IFN- $\gamma$ , konakçı antiviral immüneyi tam olarak aktive etmek için antiviral sinyalleri doğuştan adaptif immün yanıtına iletmede kritik bir rol oynar. IFN- $\gamma$  sinyalini aldıktan sonra APC' ler, CD4<sup>+</sup> T hücresi aktivasyonunu ve viral enfeksiyona karşı adaptif immün yanıtın başlamasını kolaylaştıran MHC sınıf II ve uyarıcı moleküllerin ekspresyonunu arttırır. IFN- $\gamma$  ayrıca, APC' ler tarafından IL-12 ekspresyonunu indükler. IL-12, doğal immüneyin bir antiviral hücresel bileşeni olan NK hücrelerini aktive etmekle kalmaz, aynı zamanda CD4<sup>+</sup> Th1 T hücresi gelişimine de yol açar. Bu da viral enfeksiyonun kontrol edilmesinde çok önemlidir.

### **2.2.3. Tip III İnterferon: İnterferon Lambda (IFN- $\lambda$ )**

#### **2.2.3.1. IFN- $\lambda$ ve dahil olduğu sinyal ileti yolları**

IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 ve IFN- $\lambda$ 3 (veya sırasıyla IL-29, IL-28A ve IL-28B) dahil olmak üzere İnsan Tip III IFN' ler (IFN- $\lambda$ ' lar), 2003 yılında iki bağımsız grup tarafından tanımlanmıştır. IFN- $\lambda$  reseptörünü eksprese eden çeşitli hedef hücrelerde antiviral aktiviteye neden olabilir (Gad HH ve ark., 2009). Böylece, fonksiyonel olarak yeni bir IFN tipi olarak sınıflandırılmıştır. IFN- $\lambda$  proteinleri, sadece IFN- $\lambda$  tarafından kullanılan IL-10R2 zinciri (aynı zamanda IL-10, IL-22 ve IL-26 için reseptör komplekslerinin önemli bir kısmı) ve IFN- $\lambda$ R1 zincirinden (IL-28RA olarak bilinen) oluşan bir reseptör kompleksine bağlanarak etkisini gösterir. IFN- $\lambda$ , virüs ile enfekte olabilen hemen hemen tüm hücre tipleri tarafından ifade edilebilmesine rağmen; IFN- $\lambda$ R1 alt-birimi, esas olarak epitelyal kökenli hücreler olmak üzere sınırlı hücre tipleri tarafından oluşturulmaktadır. IFN- $\lambda$ R1' in ayrıca B hücreleri, T hücreleri, DC' ler ve makrofajlar gibi bazı kan bağışıklık hücrelerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca bu hücreler IFN- $\lambda$  ile uyarıldığında daha zayıf bir sinyalleme etkisi ile sonuçlanan kısa bir IFN- $\lambda$  reseptörü splice varyantını (sIFN-1R1/sIL-28R1) da ifade ettiği

belirlenmiştir (Witte K ve ark., 2009). Aksine, fibroblastlar, endotelial hücreler ve çoğu lökositler, IFN- $\lambda$ R1 zincirinin tamamını eksprese etmediği bu nedenle, IFN- $\lambda$  stimülasyonuna cevap oluşturmadıkları bildirilmiştir. IFN- $\lambda$  ilk aşamada IFN- $\lambda$ R1 zincirine bağlanır. Bu durum IL-10R2' nin komplekse katılmasını kolaylaştıran bir konformasyon değişikliğine yol açar. IFN- $\lambda$  ve IFN- $\lambda$  reseptör kompleksinin oluşumu JAK aktivasyonuna yol açar. Bunu IFN- $\lambda$ R1 zincirinin hücre içi tirozinlerinin fosforilasyonu izler. Daha sonra STAT1 ve STAT2 aktivasyonu ile meydana getirir (Şekil 7). IFN- $\lambda$  ya da IFN- $\alpha$  reseptör komplekslerinden aynı JAK-STAT sinyal transdüksiyon kaskadının aktivasyonu ile sonuçlanır (Dumoutier L ve ark., 2004).

### 2.2.3.2. IFN- $\lambda$ antiviral etkileri

Tip I IFN' ye benzer şekilde IFN- $\lambda$  da hedef hücrelerde antiviral aktiviteyi indüklemeye potansiyeline sahiptir. IFN- $\lambda$ ' nın, farklı fare hepatosit hücre dizilerinde HBV replikasyonunu inhibe edebildiği bildirilmiştir (Doyle SE ve ark., 2006; Robek MD ve ark., 2005). Son zamanlarda yapılan çalışmalar IFN- $\lambda$ ' nın makrofajlarda ve birincil T hücrelerinde HIV-1 replikasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir (Liu MQ ve ark., 2012; Tian RR ve ark., 2012). Lokal olarak verilen rekombinant IFN- $\lambda$ ' nın vajina ve akciğerlerde HHV-1, HHV-2 ve IAV replikasyonunu inhibe ettiği *in vivo* olarak ortaya konmuştur. Tip I ve Tip II IFN' lere benzer şekilde IFN- $\lambda$  da antiviral karakteristik proteinleri, OAS ve Mx proteininin ekspresyonunu da indükleyebilir (Sommereyns C ve ark., 2008; Brand S ve ark., 2005). IFN- $\lambda$  virüs çoğalmasını engellemeye ek olarak hücre yüzeyindeki MHC sınıf I proteinlerinin ekspresyon seviyelerini artırarak uzamış virüs enfeksiyonunu sınırlayabilir. Bu da virüsle enfekte hücrelerin doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını, yok edilmesini ve apoptozunu indükler (Kotenko SV ve ark., 2003).

### 2.2.4. Diğer Hastalıklarda Terapötik Ajanlar Olarak IFN' ler

Antiviral tedaviye ek olarak, IFN' ler ayrıca kanser ve otoimmün hastalıklarda da terapötik maddeler olarak kullanılmıştır. IFN- $\alpha$  Antiproliferatif, antianjiyogenetik ve immünomodülatör etkileri nedeniyle bir adjuvan olarak bazı kanserlerin tedavisine dahil edilmiştir. Melanomda, yüksek doz IFN- $\alpha$ 2b uygulanmasında (HDI, hem rekombinant hem de pegile edilmiş formlar) çoklu meta-analizler HDI'nın yüksek riskli melanomada sağkalımı önemli ölçüde artırdığını gösterilmiştir (Ismail A ve Yusuf N, 2014). IFN- $\alpha$  ayrıca renal hücreli karsinom için tedavinin bir parçası olarak çoklu klinik çalışmalarda da değerlendirilmiştir (Bracarda S ve ark., 2013; Maroto JP ve ark., 2013; Melichar B ve ark.,

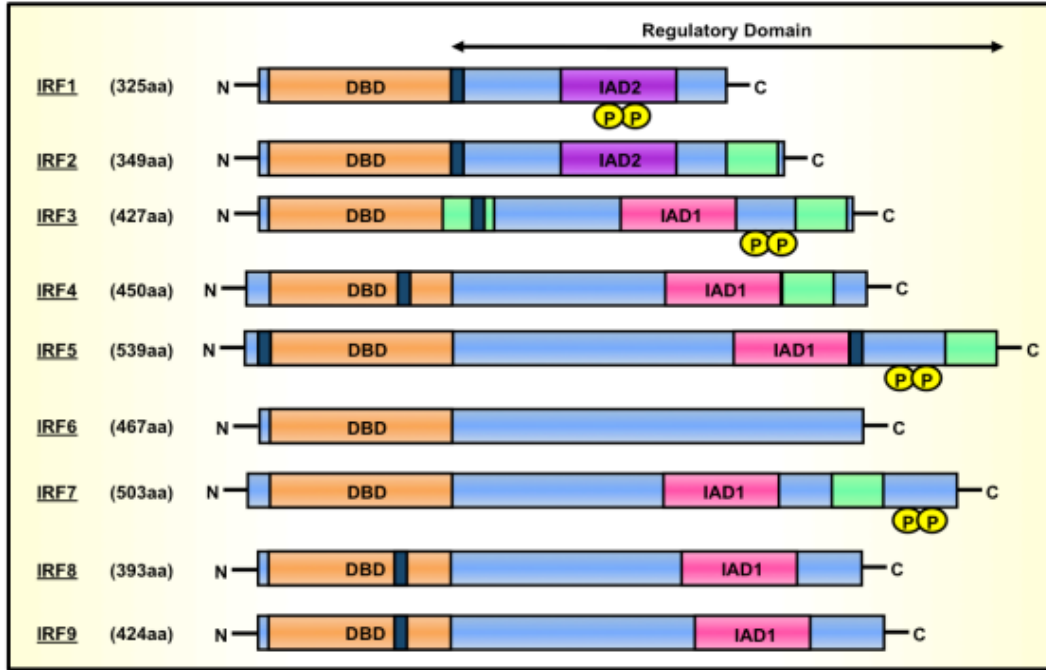
2013; Rini BI ve ark., 2014). Sonuç olarak hastalar, çeşitli kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde düşük doz IFN- $\alpha$  ile tedavi edildiğinde daha uzun progresyonsuz sağkalım gösterdikleri ortaya konmuştur. IFN- $\alpha$  Tirozin kinaz inhibitörü olan Imatinib' in keşfinden önce, kronik miyeloid lösemisinin (CML) tedavi kullanılmaktaydı. Imatinib hala CML için ön tedavi amacıyla kullanılırken Imatinib' nin etkinliğini arttırmak için PEG-IFN- $\alpha$ 2a veya PEG-IFN- $\alpha$ 2b ile kombine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, PEG-IFN ilavesinin, tedavi edilen hastalarda lösemi hücrelerinin sayısını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Johnson-Ansah H ve ark., 2013; Simonsson B ve ark., 2011; Talpaz M ve ark., 2013). IFN- $\beta$  ABD'de multipl skleroz (MS) tedavisi için ilk olarak 1993 yılında onaylanmıştır. Günümüzde birkaç FDA onaylı IFN- $\beta$  ürünü bulunmaktadır. Genellikle tedavi edilen hastalarda grip benzeri semptomlar gözlenirken, MS için IFN- $\beta$  ile tedavi, güvenli ve etkili bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. IFN- $\beta$ ' nin MS' in ilerlemesini nasıl engellediğinin tam mekanizması bilinmemekle birlikte, anti-enflamatuar etkileri ve düzenleyici T hücrelerinin oluşumunu indüklemeye yetenekleri, lökositlerin kan beyin bariyerini geçmesini önlemeleri ve otoreaktif T hücrelerinde apoptosisi teşvik etmeleri gibi özellikleri nedeni ile INF- $\beta$  MS tedavisinde dikkate değer bir uygulamadır (Kay M ve ark., 2013; Rommer PS ve Stuve O, 2013). Tip I IFN' lerle karşılaştırıldığında, IFN- $\gamma$  klinikte geniş olarak kullanılmaz. Bununla birlikte IFN- $\gamma$ ' nin, idiyopatik atopik dermatitin kan eozinofil sayısını azaltarak IgE ve T hücre proliferasyonunu inhibe etki gösterdiği bildirilmiştir (Misery L, 2011). IFN- $\gamma$ ' nin ayrıca, fagositik hücrelerde süperoksit oluşumundan sorumlu enzim kompleksinde bir defekti olan kronik granümatöz hastalarında da etkileri incelenmiştir. Bununla birlikte, bu hastalarda IFN- $\gamma$  kullanımı, altta yatan genetik hastalık için bir tedavi olarak değil, enfeksiyonların yeniden ortaya çıkmasını önleyerek prognoza olumlu katkı sağladığı iddia edilmiştir (Marciano BE ve ark., 2004).

### **2.3. İnterferon Düzenleyici Faktörler**

Sağkalım, hem tümör baskılamada hem de patojenlere karşı immünojenik yanıtları içeren moleküler savunma mekanizmalarına bağlıdır. Bu mekanizmaların bozulması kansere ve enfeksiyona yol açarken, hiperaktivite ise otoimmün hastalığa neden olabilir. İnterferon (IFN) düzenleyici faktörler (IRFler), bu tür savunma mekanizmalarında yer alan ve doğuştan gelen immün yanıtlara ve bazı fizyolojik işlevlere doğrudan karışan anahtar transkripsiyon faktörleridir (Honda K ve Taniguchi T, 2006; Paun A ve Pitha PM, 2007; Tamura T ve ark., 2008).



Interferon Düzenleyici Faktör (IRF) ailesinin transkripsiyon faktörleri, memelilerde dokuz üyeden oluşur: IRF1, IRF2, IRF3, IRF4 (PIP, LSIRF veya ICSAT olarak da bilinir), IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (ayrıca ICSPB olarak da bilinir) ve IRF9 (ISGF3 $\gamma$  olarak da bilinir) (Tamura T ve ark., 2008). IRF' ler ilk olarak Tip I IFN ve IFN' nin ekspresyonunu düzenlediği genlerin transkripsiyon düzenleyicileri olarak karakterize edilmiştir. IFN sisteminin ve özellikle makrofajların ötesinde konak savunmasının düzenlenmesi ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynadıkları açıkça gösterilmiştir. IRF1, IRF2 makrofajlara ek olarak, NK hücrelerinde önemli rol oynamaktadır, IRF6 keratinositlerde eksprese edilir, IRF3/IRF7 tip I IFN üretimi pDC' ler ve fibroblastlar tarafından düzenlenir. IRF1, IRF2, IRF4 T-hücrelerinde aktiftir ve IRF4, IRF5, IRF8' in B hücrelerinde rolleri vardır. İmmün regülasyonun rollerine ek olarak IRF' ler hücre döngüsü, apoptoz ve tümör baskılanmasının düzenlenmesinde de rol oynarlar (Honda K. ve ark., 2006 ).



Şekil 8. Interferon Düzenleyici Faktör (IRF) Transkripsiyon Faktörleri Ailesi

Bütün IRF'ler, N-terminalinde, 5 triptofan kalıntısından oluşan bir DNA bağlanma domeni (DBD - Turuncu) oluşur. C-terminali düzenleyici etki alanı genellikle Tip 1'in (IAD1 - Pembe) veya Tip 2'nin (IAD2 - Mor) bir IRF Bağlanma Alanını (IAD) içerir. Bazı IRF' ler, baskılama alanlarını (Yeşil) ve nükleer lokalizasyon sinyallerini (Koyu mavi) içerir. IRF1, IRF3, IRF5 ve IRF7'nin aktivitesi fosforilasyon olaylarına bağlıdır (Sarı). Şekil Lohoff M. ve Mak TW 2005'den alınmıştır.

IRF' ler yapısal olarak, N-terminallerinde, korunmuş beş triptofan tekrarından oluşan (Şekil 8) 120 amino asitlik bir DNA bağlanma alanı (DBD) içerir ve Myb onkoprotein ailesi ile yapısal benzerliğe sahiptirler (Veals SA ve ark., 1992). IRF DBD, bir heliks dönüşlü heliks motifi oluşturur. IRF1' in DNA ile kompleks halinde kristal yapısının analiz sonucu, 5-

GAAA-3 'ün etki alanı olmak üzere çekirdek bağlanma motifi olarak tanımlanan İnterferon-Uyarılmış Tepki Elementi (ISRE, A/GNGAAANNGAAACT) adındaki bir DNA dizisini tanıdığı belirtilmiştir (Escalante CR ve ark., 1998). İnsan Herpes Virüs 8 (HHV8) ve Kaposi Sarcoma Herpes Virüsünün (KHSV) (Moore PS ve ark., 1996; Russo JJ ve ark., 1996) genomlarında tanımlananlar gibi IRF'lerin (vIRF'ler) viral olarak kodlanan formları, DBD'deki triptofan kalıntılarının birkaçından yoksundur ve DNA'ya bağlanamaz (Ning S ve ark., 2011). Virüslerin özellikle yayılma amacıyla IRF aktivitesinin üstesinden gelmek için stratejiler geliştirmesi gerektiğinden antiviral yanıtlarda IRF'lerin önemini anlaşılmaktadır.

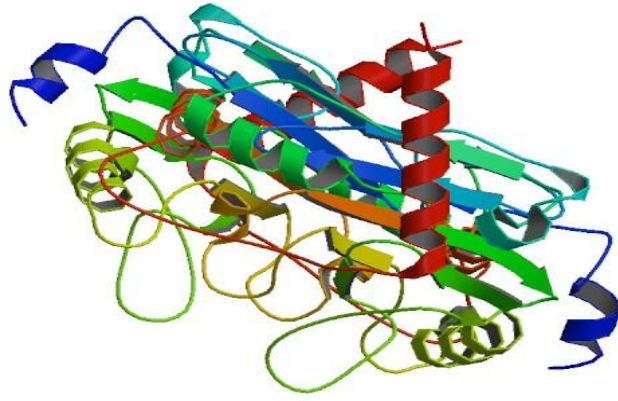
IRF'lerin çoğu (IRF1, IRF2 ve IRF6 hariç), C terminalde aktivasyon için önemli olan IRF ailesi üyeleri arasında homo- ve hetero-dimer formasyonu ve Smad ailesinin transkripsiyon faktörlerinin Mad-Homoloji 2 (MH2) alanına yapısal olarak benzeyen bir IRF bağlanma bölgesine sahiptir (IAD) (Qin BY ve ark., 2005; Takahasi K ve ark., 2003). IRF1 ve IRF2, IAD2 olarak bilinen IAD bölgesinin bir varyasyonuna sahiptir (Şekil 8) ve PU.1'in PEST alanına benzerlik gösterir. IAD aynı zamanda, IRF komplekslerinin bağlanabildiği çekirdek IRF-bağlanma motifine bitişik nükleotit sekanslarını daha fazla tanımlayabilen PU.1 ve STAT proteinleri gibi, ilişkisiz proteinler ile protein-protein etkileşimleri için de önemli bir arayüzdür.

IRF transkripsiyonel etkisi farklılık gösterir. Genellikle ko-faktörler ile oluşturulan protein komplekslerine bağlı olarak aktivasyon ve/veya baskı ile sonuçlanmak üzere IRF'nin fonksiyonunun, birçok unsur tarafından belirlendiği söylenebilir. IRF'ler hücre-tipi ve evrespesifik ekspresyon için, hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etme ya da baskılama yeteneğine sahiptir. Ayrıca translasyon sonrası modifikasyonlarda rol almış diğer IRF'ler ve transkripsiyonel aktivatörler/baskılayıcılarla etkileşime girme potansiyeline sahiptirler.

#### **2.4.1. İnterferon Regülatör Faktör 5 (IRF5)**

IRF5, tip I IFN genleri (Schoenemeyer A ve ark., 2005; Yasuda K ve ark., 2007) inflamatuvar sitokinler (Takaoka A, ve ark., 2005) ve tümör baskılayıcılar (Hu G. ve ark., 2005; Yanai H. Ve ark., 2007) olmak üzere çeşitli genlerin aktivitelerini düzeleyen dikkat çekici bir IRF aile üyesidir. IRF5'in ekspresyonu öncelikle B hücreleri ve dendritik hücrelerde saptanmıştır. IRF5 ekspresyonu tip I IFN, viral ekspresyon ve tümör baskılayıcı p53 ile uyarılmıştır (Barnes BJ ve ark., 2001; Barnes BJ ve ark., 2002; Mancl ME ve ark., 2005; Mori T ve ark., 2002). Tip I IFN yanıtları konakçı için faydalı olsa da, IRF5 tarafından uyarılan inflamatuvar sitokinler viral patojenez ile ilişkili morbidite ve mortaliteye önemli bir katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. IRF5 mutantlar sistemik lupus eritematoz (Graham RR

ve ark., 2006; Sigurdsson S ve ark., 2006), Sjogren sendromu (Miceli-Richard C ve ark., 2007), multipl skleroz (Kristjansdottir G ve ark., 2008) ve inflamatuvar bağırsak hastalığı (Dideberg V ve ark., 2007) dahil otoimmün hastalıkların patogenezi ile ilişkilidir. Bu nedenle, IRF5 aktivitesinin moleküler seviyede nasıl kontrol edildiğini anlamak, klinik açıdan önemlidir. Çünkü aktiviteyi arttıran terapötik ajanlar virüs enfeksiyonu veya tümör büyümesine karşı savunmada kullanılabilirken, aktiviteyi azaltan maddeler zararlı inflamatuvar yanıtları en aza indirmek için kullanılabilir (Hu G ve Barnes BJ. 2006).



**Şekil 9. Interferon Regulator Faktör 5 (IRF5) Transaktivasyon Bölgesinin Kristal Yapısı.**

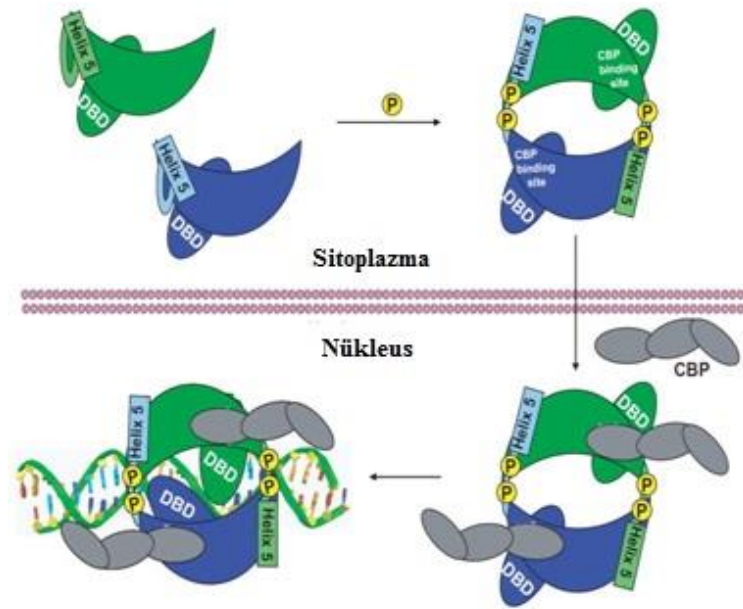
<https://cansar.icr.ac.uk/cansar/molecular-targets/Q13568/#> (27.11.2008)

IRF5 dahil olmak üzere IRF proteinleri, , bir N-terminal DNA bağlama domaini (DBD) ve aktivasyondan büyük ölçüde sorumlu bir C-terminal domain olmak üzere iki ana domain içerir. İyi korunmuş DBD (~120 amino asit içerir), IFN- $\beta$  'enhancer' bölgesinde pozitif IFL düzenleyici DNA dizilerini ve IFN kaynaklı genlerdeki IFN uyarımlı yanıt elemanlarını (ISRE) tanıır. Çeşitli IRF DBD' lerin DNA ile etkileşimlerinin detayları ve bunların IFN- $\beta$  geninin transkripsiyonel aktivasyonundaki diğer faktörlere dahil olmaları, (Escalante CR ve ark., 1998; Panne D ve ark., 2004; Escalante CR ve ark., 2007; Panne D ve ark., 2007) kristalografik analizlerle açıklanmıştır. C terminali kısımları IRF' lerin transkripsiyon aktivitesini düzenler. IRF3 ile IRF9, IRF' ler arasındaki homo ve heteromerik etkileşimlerin yanı sıra transkripsiyonel ko-modülatörlerle etkileşimden sorumlu bir C-terminal IRF ilişki domainine (IAD) sahiptir. IRF3, IRF4, IRF5 ve IRF7 IAD' nin transaktivasyon fonksiyonlarının, IAD' e komşu olan oto-inhibitör yapılar tarafından bastırıldığı gösterilmiştir (Barnes BJ ve ark., 2002; Lin R ve ark., 1999; Lin R ve ark., 2000).

Bu ailenin en çok çalışılan üyesi IRF3' tür. IRF3, tüm hücre tiplerinde aktive olana kadar inhibe edilmiş formda sitosol içinde yapısal olarak eksprese edilir. IRF3 viral

enfeksiyondan sonra, iki serin/treonin kinaz, TBK1 ve IKK $\beta$  tarafından fosforile edilir (Sharma S ve ark., 2003). Fosforilasyon, IRF3' ü homo- veya hetero- dimerizasyonunu indükler ve çekirdeğe translokasyon yapar. Çekirdekte dimer halinde CREB bağlayıcı protein (CBP) veya yakından ilişkili p300 ile bir araya gelerek, IFN- $\beta$  geninin promoter bölgesine bağlanmasına ve aktivasyonuna yol açar (Sato M ve ark., 1998; Lin R ve ark., 1998; Weaver BK ve ark., 1998). IRF3' ün transaktivasyon domeninin kristal yapıları (Takahasi K ve ark., 2003; Qin BY ve ark., 2003), anahtar fosforilasyon bölgelerini içeren C-terminal yakınındaki bir oto-inhibitör bölgenin konformasyonunu ortaya çıkar (Qin BY ve ark., 2005). Dolayısıyla, bu yapılar, fosforilasyonun bir C-terminalinde kontrol edici oto-inhibitör bölgenin açılmasını tetikler. Bu tür yapısal düzenlemelerin dimerizasyona nasıl bağlandığını veya dimerizasyonun CBP/p300'ün bağlanmasını neden desteklediği henüz açıklanamamıştır.

IRF5 fosforilasyonunun, CBP/p300' e dimerizasyonu ve bağlanmayı nasıl aktive ettiğini anlamak için, insan IRF5' inin kristal yapısını, dimer oluşumunu arttıran bir mutasyonla farklı yapısal proteinler belirlenmiştir. Fosforilasyon bölgeleri dahil C-terminali oto-inhibitör bölgesi, homodimerizasyona aracılık ettiği belirlenmiş ve konformasyonel değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. IRF5 için CBP/p300 bağlanma yüzeyi dimer içinde maskelenir ve fosforilasyon ile CBP/p300 bağlanması arasında yapısal bir açıklık sağlandığı tespit edilmiştir.



**Şekil 10. IRF5 homo veya heterodimer yapısı ve CBP proteini ile etkileşimi.**

İnterferon bağlanma alanı (IAD) bir hilal olarak gösterilmiştir. DNA Bağlama Alanı (DBD) IAD' nin arkasında bir oval olarak gösterilen IRF aile üyelerinin aktivasyonu için şematik diyagram. Fosforlanmamış IRF proteinleri genellikle, CBP/p300 bağlanma bölgesi maskelenerek, bir oto-inhibe edilmiş durumda sitoplazmada kalır. Fosforilasyon, bir dimer oluşturmak ve CBP bağlanma sahasının maskesini çıkarmak için, bir başka IRF ile birleşmesini tetikleyen C-terminal bölgesinin bir açılımını indükler. Fosforlanmış IRF dimerleri, diğer

promotörlerin yanı sıra IFN-y güçlendirici bölgesine bağlanan kompleksler oluşturmak için CBP/p300 ve diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileştikleri çekirdeğe translokasyona tabi tutulur. DBD'ler DNA'ya bağlandıklarında, IAD'nin iki katlı simetrisinin DBD'lere uzanmamasını gerektiren iki kattan ziyade, bir tandemde DNA'ya bağlanır.

Sonuç olarak interferon düzenleyici faktörler (IRF' ler) doğal immün yanıtta ve diğer fizyolojik süreçlerde gereklidir. Sitoplazmada bu proteinlerin aktivasyonu, C-terminali oto-inhibitör bölgesinde serin ve treonin kalıntılarının fosforilasyonu ile tetiklenir. Bu oluşum dimerizasyonu uyarır, çekirdeğe taşınmasını, koaktivatör CBP/p300 ile birleşmeyi ve transkripsiyonun başlamasını uyarır. Psödofosforile insan IRF5'in transaktivasyon domeninin kristal yapısı, intersubunit etkileşimlerinin büyük bir kısmının oldukça genişletilmiş bir C-terminal bölgesi içerdiği bir dimeri çarpıcı biçimde ortaya koymaktadır. İlgili bölgenin daha önce CBP/p300'ün fosforlanmamış IRF3' e bağlanmasını engellediği gösterilmiştir. Anahtar arayüz kalıntılarının mutasyonu gözlenen dimeri, IRF5 ve IRF3' ün fizyolojik olarak aktive edilmiş hali olarak destekler. Bu nedenle fosforilasyonun, C-terminal segmentini bir oto-inhibitörden dimerizasyon rolüne çeviren konformasyonel yeniden düzenlemeleri tetikleyerek IRF5 ve diğer aile üyelerini aktive etmesi muhtemeldir.

## **2.4. Kök Hücre**

### **2.4.1. Kök Hücre Tanımı**

Basitçe düşünüldüğünde kök hücre yaşamın kaynağı olarak tanımlanabilir. Patolojinin öncülerinden olan Dr. Rudolph Virchow'un belirttiği gibi 'Her hücre bir hücreden meydana gelir'. Bu döngünün en başında da döllenmiş ovum (zigot) bulunmaktadır. Zigot, canlılardaki farklılaşma kapasitesi en fazla olan (totipotent) olan hücre tipidir. Kısa süre içinde önce embriyo ve daha sonra da tüm doku ve organların oluşmasına öncülük etmektedir (Türkiye Bilimler Akademisi, 2009).

Zigot, uterusu tam bir gebelik ürünü verebilirken totipotent halde yani tüm hücre tiplerine farklılaşma kapasitesindedir. Daha ileri aşamada bulunan hücrelerin farklılaşma potansiyelleri azalmaktadır. Morula hücreleri bir embriyonun her bölümünü teşkil edebilirler. Bu nedenle totipotent olarak kabul edilirler. Ardından gelen blastokist hücreleri, fetusu oluşturan yaklaşık 200 çeşit farklı hücre tipine farklılaşabilme kapasitesine sahiptir ve pluripotent olarak isimlendirilirler. İmplantasyon sonrası endoderm, ektoderm ve mezoderme farklılaşan hücreler multipotent karakterdedirler. Multipotent hücreler hangi tabakada iseler ancak o tabakalara ait hücre tiplerine farklılaşabilirler ve gametlerin tek tip hücreye farklılaşabilen yani unipotent hücreleri oluşturabilirler. Tablo-1 Kök hücrelerin tipi, farklılaşma kapasiteleri ve yönlerini göstermektedir.

**Tablo 1. Kök hücre tipleri, farklanma etkinkikleri ve farklanma yönleri.**

İsim	Hücre Tipi (Yerleşim)	Farklanma kapasitesi	Farklanma Yönü
EKH	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyo ve embriyo dışı dokular
EKH	Blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyo gövdesi (Tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri
EKH	Ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
YKH	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi

Matur İ ve Solmaz S 2011 ‘den alınmıştır.

Embriyonik kök hücreler (EKH) blastokistin iç hücre kitlesinde yer alan hücreler olarak tanımlanmaktadır. EKH’ler ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarına ve ileride oluşturacakları doku ve organ sistemlerine ait tüm yapılara farklılaşma kapasitesine sahip pluripotent olarak adlandırılan hücrelerdir. Fötüstan oluşumundan sonra çocukluk dönemi ve hatta yetişkinde belirli bazı bölgelerde multipotent yani dokuya göre bir veya birkaç hücre tipine farklılaşabilme kapasitesine sahip yetişkin kök hücreler (dokuya özgü kök hücreler) bulunmaktadır. Bu hücreler gerektiğinde çoğalabilen ve sınırlı sayıda hücreye farklılaşabilen hücrelerdir (Türkiye Bilimler Akademisi, 2009; Özel HB ve ark. 2008; Sağsöz H ve ark. 2008)

#### **2.4.2. Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri**

Embriyonik kök hücre araştırmaları, embriyonik kök hücrelerin (EKH) sınırsız olarak kendilerini yenileyebilme özellikleri ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetenekleri (plastisite) sayesinde rejeneratif tıbbın en gözde konularından biri haline gelmiştir. Farklılaşmamış EKH’ ler memeli pluripotent hücrelerine özel moleküler belirteçleri ekspres etme özelliğine sahiptir. EKH’ lerin farklılaşmadan kendilerini yenileyebilmesi ve pluripotentlik özelliklerinin sağlanması için bu belirteçlerin uygun düzeyde olması gerekmektedir. Bu belirteçlerin ekspresyonundaki değişim embriyo gelişim safhalarının belirlenmesinde, farklı türlerdeki embriyoların tanımlanmasında ve karakterizasyonlarının ortaya çıkarılmasında etkin rol oynamaktadır. Bundan dolayı EKH belirteçlerinin görevlerinin daha iyi anlaşılması klinikteki tedavi metodlarının geliştirilmesine ve hastalık modellerinin araştırılmasına katkı sağlayabilir.

Embriyonik kök hücreler (EKH), preimplantasyon blastokist dönemindeki iç hücre kitlesinden (İHK) köken alan hücrelerdir. Bu hücreler kendi kendilerini yenileyebilirler. Ayrıca, endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üç hücre tabakasına da farklılaşabilen pluripotent özellikte hücrelerdir (Evans MJ ve Kaufman MH, 1981; Martin GR, 1981). Bu yüzden EKH'ler erken embriyonik gelişimin ve hücrelerin gelişimlerinin anlaşılmasında, dejeneratif hastalıklara ve yaralanmalara karşı hücre temelli tedavi metodlarının geliştirilmesinde eşsiz bir role sahiptir. EKH'ler hakkında çalışmalara başlandığından bu yana, EKH'lerin kendi kendini yenileme ve farklılaşma mekanizmaları üzerinde etkili olan sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve yüzey belirteçleri gibi genetik ve epigenetik pek çok etken araştırılmıştır. Memeli blastokistlerinin iç hücre kitlelerinden kaynaklanan EKH'ler başka hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir. İHK' de gözlemlenen EKH'lerin bu pluripotentlik özelliği pek çok transkripsiyon faktörü tarafından sağlanmaktadır. Transkripsiyon faktörleri organizmanın ihtiyaçlarına göre; uygun zamanda, uygun miktarda ve uygun hücrede gen ifadenmesinin sağlanmasında görev almaktadır. Genlerin düzenlenmesinde; ifade artışına (up regülasyon) yada ifade azalışına (down regülasyon) yol açarlar. Aynı zamanda bu transkripsiyon faktörlerinin çoğu gelişim sürecinde aktif olarak rol oynarlar.

### **2.4.3. Hücre Yüzey Belirteçleri**

Farklılaşmamış EKH'ler; memeli pluripotent hücrelerine spesifik moleküler belirteçleri ekspres etme özelliğine sahiptirler. İnsan EKH'lerinde sıkça eksprese edilen yüzey belirteçleri glikolipid yapıdaki antijenler olan SSEA-3 ve SSEA-4 ile proteoglikan yapıdaki TRA 1-60 ve TRA 1-81' dir. Hücre yüzey antijenleri hücrelerin tanımlanmasında ve hücrelerin farklılaşmasının analiz edilmesinde oldukça önemlidir. Özellikle seviye spesifik antijenler (SSA) gelişime bağlı olarak erken embriyonik safha boyunca düzenlenirler. Bu yüzden yüzey belirteçleri, EKH'lerin farklılaşmasının gösterilmesinde sıklıkla kullanılan önemli belirteçlerdir.

#### **2.4.3.1. Seviye spesifik embriyonik antijenler (SSEA)**

Seviye spesifik embriyonik antijenler karbonhidrat epitoplari içeren lakto ve globo-seri glikolipidlerdir (Shamblott MJ ve ark., 1998; Solter D ve Knowles BB, 1978). Gelişim süresince bu karbonhidrat ilişkili SSEA1, SSEA3 ve SSEA4 antijenler hücre yüzey etkileşimlerinin kontrolünde yer alırlar. SSEA-1 (CD15/Lewis x) preimplantasyon aşamasındaki germ hücrelerinde ve teratokarsinoma hücrelerinin yüzeyinde eksprese

edilirken; EKH' lerde ve embriyonik karsinoma hücrelerinde ekspresyonu bulunamamıştır (Solter D ve Knowles BB, 1978; Knowles BB ve ark., 1978). SSEA-1 ekspresyonu insan hücrelerinin farklılaşması sırasında artmaktadır. SSEA-3, farklılaşmamış EKH' lerde, embriyonik germ hücrelerinde, EKH ve de teratokarsinoma hücrelerinde eksprese edilmektedir.

SSEA-4 seramid bağlı glikosfingolipid yapı ile ilişkili bir yüzey antijenidir. SSEA-4 ekspresyonu insanda döllenmemiş yumurtada, primitif endoderimde, preimplantasyon döneminde erken safhada bulunan embriyodaki İHK' sında ve embriyonal karsinoma hücrelerinde gözlenir; fakat blastokist aşamasında ve İHK' da eksprese edilmezler (Shevinsky LH ve ark., 1982; Kannagi R ve ark., 1983).

#### **2.4.3.2. TRA-1-60 ve TRA-1-81**

İnsan pluripotent kök hücreleri ve embriyonal karsinoma hücrelerinin (Andrews PW ve ark., 1984) yüzeyinde bulunan TRA-1-60 ve TRA-1-81 antijenleri EKH' lerin tanımlanması ve izolasyonunda sıklıkla kullanılan antijenlerdir. Ayrıca teratokarsinoma ve embriyonik germ hücrelerinde de ekspresyonları mevcuttur (Henderson JK ve ark., 2002; Draper JS ve ark., 2002; Schopperle WM ve DeWolf WC, 2007). Embriyolarındaki yüzey belirteçlerinin ekspresyon zamanlarını kıyaslamak için yapılan çalışmada SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 ve TRA-1-81 indirekt immünfloresan boyama yöntemiyle incelenmiştir. TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA3 ve SSEA4 zona pellusidasından ayrılan (hatch olan) blastokistlerde temel olarak İHK'de yer almaktadır Buna karşın SSEA1'cin ekspresyonu blastokistlerin de trofektodermden sağlanmaktadır (Henderson JK ve ark., 2002).

#### **2.4.4. Transkripsiyon Faktörleri**

Pluripotensiden sorumlu transkripsiyon faktörler olan Nanog, OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc ve Lin 28 proteinleri yeniden programlama etkenleri olarak tanımlanmaktadır. Bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu İHK, epiblast ve farklılaşmamış EKH' lerde oldukça fazladır (Niwa H, 2007). Bu genlerin her birinin transkripsiyonunun eksikliğinde pluripotentiğin sağlanamamasından dolayı erken safhada embriyonik ölüm gerçekleşmektedir (Nichols J ve ark., 1998; Mitsui K ve ark., 2003; Avilion A ve ark., 2003). Transkripsiyon faktörleri kanser gelişiminde de önemli role sahip olup bu konudaki araştırmalar hızla devam etmektedir.



#### **2.4.4.1. Nanog**

Nanog proteini, hücrenin nükleer bileşenine lokalize olmuş, 305 aminoasit içeren DNA materyalinin bağlanmasını kolaylaştıran bir proteindir. Nanog proteini EKH'lerin, pluripotent özelliğini etkileyen bir faktördür. İlk kez kompaktlaşma safhasında görülür, implantasyonda varlığını sürdürürken, implantasyondan hemen sonra ekspresyon düzeyi düşer. Bu gen embriyonik kök hücreleri ve embriyonik germ hücreleri gibi farklılaşmamış hücrelerinde eksprese olurken; testis, over gibi farklılaşmış hücrelerde de saptanmıştır (Mitsui K ve ark., 2003). Nanog, İHK' nin ortaya çıkmasında özellikle germ hücrelerinin oluşumunda gerekli bir proteindir. Aynı zamanda in vitro olarak farklılaşmanın engellenmesinde önemli rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür (Cavaleri F ve Schöler, H 2009). Nanog geninin mRNA' sı pluripotent hücrelerinde bulunurken, olgunlaşmış hücrelerde bulunmamaktadır. Nanog geninin eksprese olmaması, hem EKH' lerin hem de İHK' nın kendi kendini yenileme özelliklerinin kaybına yol açar. Bu durum EKH' lerin ekstraembriyonik doku hücrelerine dönüşmelerini indükler (Mitsui K ve ark., 2003; Chambers I ve ark. 2003).

#### **2.4.4.2. SOX2**

SOX2 geni EKH' lerin pluripotansi özelliğinin korunması için vazgeçilmez bir genidir (Masui S ve ark., 2007). Morula ve blastokist gibi erken embriyonik safhalarda, germ hücrelerinde ve epiblastta ifade edilir. Embriyo gelişiminde SOX2 geninin ifadesinin baskılanması durumunda epiblast oluşumunda bazı sorunların gelişmesinden dolayı embriyolar yok olur. Trofektodermal ve kısmen endodermal farklılaşmayı engelleyerek EKH' lerin pluripotansiyel özelliğinin sürdürülmesinde gereklidir (Adachi K ve ark., 2010). SOX2' nin en önemli görevlerinden birisi de OCT4 ekspresyonunu regüle etmesidir. Yapılan çalışmalarda SOX2 ve OCT4' ün birbirinin ifadesini etkileyerek kök hücrelerin pluripotent karakterinin oluşturulmasında görev aldıkları gösterilmiştir (Masui S ve ark., 2007). SOX2' nin ifadesinin eksikliğinin hücrelerin %98.5' inin trofektoderm hücrelere dönüşümüne yol açar. SOX2' nin ifadesini artışı trofektoderm soyuna ait hücrelere dönüşümünü sağlar (Adachi K ve ark., 2010).

#### **2.4.4.3. OCT4**

OCT4, EKH'lerin pluripotensi özelliğinin korunmasında ana rol oynayan bir proteindir. Bu nedenle bu hücrelerin teşhisinde en iyi bilinen ve en çok kullanılan transkripsiyon faktörleri arasındadır. OCT4 transkripsiyon faktörü, insanda *POU5f1* geni

tarafından kodlanır. Blastokist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinde eksprese olur ve farklılaşma süresi boyunca ekspresyonu azalır. Bu faktörün ifade seviyesi değişkenlik göstermekle beraber hücre kaderinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Eksik veya fazla eksprese olması EKH'lerin farklılaşmasına yol açar. Embriyonik kök hücrelerin gelişiminde bu transkripsiyon faktörünün ifade seviyesinin 3 önemli etkisi gözlemlenmektedir: (1) OCT4 ifadesindeki artış, hücrelerin primitif endoderm ve mesoderm yönünde farklılaşmasına neden olmaktadır. (2) Düşük seviyede ifade edildiğinde ise; hücreler pluripotent özellikte kalmakta ve farklılaşma olmamaktadır. (3) İfadesinin baskılanması ve eksik ifadenmesi durumunda hücrelerin pluripotenslik kapasiteleri kaybolmakta ve sonucunda bu hücreler trofoektoderm yönünde farklılaşmaktadır (Wu G ve Schöler HR, 2014).

OCT4 protein seviyesi gastrulasyon aşamasında belirli seviyelerde seyrederek. Primitif endoderm hücreleri farklılaşmaya ve ektoderme göç etmeye başladıklarında, bu hücrelerin OCT4 protein seviyeleri geçici olarak artar. Daha sonra OCT4 gen ekspresyonu primitif endoderm ve epiblast hücrelerinde baskılanır. Gastrulasyon aşamasında seyreden bu durum embriyo implantasyon aşamasında da aynıdır. Son olarak OCT4 gen ekspresyonu primordiyal germ hücrelerini baskılar; bu hücreler ekstra embriyonik mezodermin ilk özelleşen hücreleridir. OCT4 farklılaşmış hücrelerde eksprese olmaz. İnsanda İHK hücrelerinde trofoektoderm hücrelerine kıyasla daha fazladır. OCT4 geni fare oositlerinde ana transkripsiyon faktörü olarak eksprese edilir. Zigotun ilk yarıklanmasında kaybolur, embriyo dört hücreli aşamaya geldiğinde tekrar görülür. Bu gen gastrulasyon sonrası farklılaşmış hücrelerde bulunmaz (Niwa H ve ark., 2000).

#### **2.4.4.4. Klf:**

Klf (Krupple-like factor) ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, gelişimi ve apoptozisi olmak üzere pek çok biyolojik aktivitenin sürdürülmesini sağlar. Klf ailesinden Klf5, OCT4 ve Nanog'un transkripsiyonunu düzenlemekle beraber gelişimsel süreçte oldukça önemlidir. Klf4 ve Klf2 ise; EKH'lerin pluripotensliğinin sağlanmasından sorumlu Nanog, Myc gibi başka transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını düzenlerler. Klf gen ailesi tek başlarına EKH'lerin kendilerini yenileme kapasitelerinde etkin rol oynamamaktadır (Parisi S ve ark. 2008).

#### **2.4.4.5. Myc Ailesi:**

Myc ailesi kanserle olan ilişkisi açısından protoonkogen fonksiyon yürütmektedir. Yamanaka ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; c-Myc trans geninin reaktivasyon kazanması sonucu uyarılmış pluripotent kök hücrelerinin yaklaşık %20'si ölümcül teratomlara neden olmuştur (Okita K ve ark., 2008). Bunun sonucunda bu faktörün kullanılması, ciddi endişelere neden olmuştur.c-Myc, genomda yaklaşık 4.000 bölgeye bağlanıp genomun gevşemesini sağlayarak diğer transkripsiyon faktörlerinin genoma bağlanmasını kolaylaştırır.

#### **2.4.4.6. Lin28:**

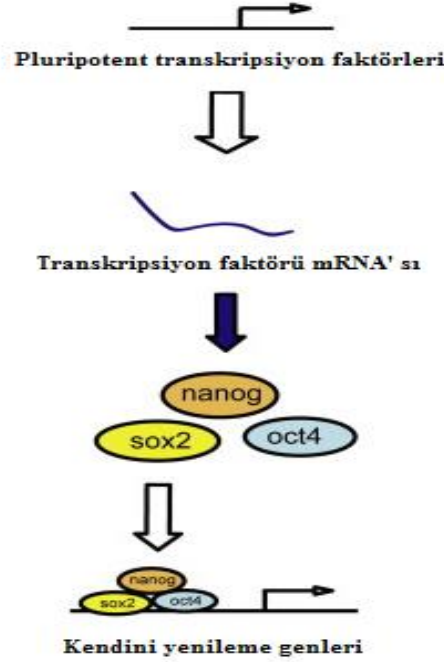
Lin28 mRNA bağlayan bir proteindir. EKH'ler ve embriyonik karsinoma hücrelerinde çoğalma ve farklılaşma döngüsünde rolü bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda Lin28'in kullanılabilirliğini gösterilmiştir. fakat daha sonra bu faktörün mutlak gerekli olmadığı gösterilmiştir (Yu J ve ark., 2007).

#### **2.4.5. Transkripsiyon Faktörlerinin Birbirleriyle İlişkisi:**

OCT4, Nanog ve SOX2 genleri insan ve fare embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmasında veya farklılaşmayıp pluripotentliğinin korunmasında rol oynayan önemli transkripsiyon faktörleridir. Ayrıca bu genlerin ekspresyonu hücrelere kendini yenileme özelliği sağlamaktadır. EKH'lerin pluripotentliğinin oluşmasını sağlayan *Fgf4*, *Utf1*, *Nanog* ve *SOX2* gibi pek çok transkripsiyon faktörünün fonksiyonunu, OCT-Sox aktivatörü gerçekleştirmektedir (Maruyama M ve ark., 2005). SOX2 ve diğer Sox faktörleri (Sox4, Sox11, Sox15) OCT-Sox aktivatörüne bağlı genlerin ekspresyonunu önemli derecede etkilemektedir. OCT4 ekspresyonunu pozitif veya negatif yönden etkileyen çoklu genleri ise sadece SOX2 düzenlemektedir (Masui S ve ark., 2007). SOX2, EKH'lerin kendi kendini yenileme fonksiyonlarında mutlak olarak gereklidir. OCT4 transkripsiyonel aktivasyonu oldukça ilişkili olan SOX2; EKH'lerin pluripotentliğinin sağlanmasında eşsiz bir role sahiptir. Masui ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda SOX2 seviyelerindeki azalma sonucu 623 genin aktivasyona, 648 genin inaktivasyona uğradığı gösterilmiştir. Bu gen ekspresyon değişiklikleri; OCT4 ve Nanog ekspresyonunda artış, Sox ailesinden Sox4, Sox11, Sox15' in ekspresyonunda ise azalışa sebep olmuştur (Masui S ve ark., 2007).

Nanog, OCT4 ve Stat3' ün pluripotentliğin sağlanmasında hücrelerin kendi kendini yenilemede rolleri kanıtlanmıştır. Preimplantasyon döneminde hücrelerin trofektoderme farklılaşacağına veya pluripotent bir şekilde kalacağına ilk olarak morula safhasında karar

verilir. Bu aşamada Nanog ekspresyonu düşük olduğu için anahtar faktör OCT4' tür. İkinci olarak hücrelerin primitif endoderme farklılaşacağına veya İHK hücrelerinin epiblast gibi pluripotent bir şekilde kalacağına blastokist aşamasında karar verilir. Nanog bu aşamada eksprese edilmeye başlanır ve fonksiyonu hücrelerin geleceğinin belirlenmesinde çok kritiktir. Sonuç olarak EKH' lerin trofektoderme veya primitif endoderme farklılaşmasının önlenmesinde sırasıyla OCT4 ve Nanog temel yapı taşlarıdır. Ancak hücrelerin kendi kendini yenilemesinde bu faktörler yeterli değildir. Stat3 tarafından aktive edilmiş LIF (lösemi inhibitör faktör)' e ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak preimplantasyon morula döneminde OCT4 ve SOX2' nin, blastokist dönemindeyse OCT4 ve SOX2' ye ilaveten Nanog' un da EKH' lerin farklılaşmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir. EKH' lere SOX2 gen ekspresyonu kendisi ve OCT4 geni tarafından, OCT4 gen ekspresyonu ise kendisi ve SOX2 geni tarafından düzenlenmektedir (Okumura-Nakanishi N ve ark., 2005).



**Şekil 11. Transkripsiyon faktörleri.**

SOX2, OCT4 ve Nanog gibi kök hücre transkripsiyon faktörlerinin birlikte etkileşimi hücrenin kaderini belirler. (Wang Y ve ark., 2013)

Bir embriyonun normal gelişim sürecini tamamlayabilmesi için kök hücre belirteçlerinin embriyo gelişim zamanına uygun şekilde dağılımını ve değişimini tamamlaması gerekir. Çok farklı fonksiyonlara sahip bu kök hücre belirteçlerinin anormal artması ya da azalması; embriyonik kök hücrelerde morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere, dolayısıyla da embriyo anomalilerine sebep olabilir. EKH' lerin farklı hücre tiplerine

dönüşebilmelerinin temel mekanizmalarının incelenmesi, farklılaşma ve yönlendirmede rol alan genlerin araştırılması, türler arası EKH'lerin ayrımının yapılması bu yüzey belirteçleri ve transkripsiyon faktörleri mekanizmalarının ve fonksiyonlarının çok iyi bilinmesine bağlıdır. Embriyolarda kök hücre potansiyelindeki hücrelerin varlığının ve farklı kök hücre belirteçlerinin ifade düzeylerinin araştırılması; gerek embriyolar gerekse embriyonik kök hücreler ile ilgili araştırmalarda ve tedavilerde yol gösterici sonuçlar ortaya çıkaracaktır.

**Tablo 2. İnsan embriyolarında preimplantasyon safhalarındaki hücre yüzey antijen ekspresyonları.**

Antijenler	2-8 Hücre	Morula	İHK	Trofoblast
SSEA1	-	+	-	+
SSEA3	-	+		-
SSEA4	-	+		-
TRA-1-60	-	+	++	-
TRA-1-81	-	-	++	-

(Henderson J.K ve ark. 2002).

Kök hücre faktörlerinin kanser, immune hastalıklar gibi çok çeşitli etkenlerle değişebilen patolojik durumlar ile ilişkileri konusunda araştırmalar son yıllarda artmaya başlamıştır. Henüz bu faktörlerin hangi sinyal yolağı ile ilişkili oldukları ve hangi proteinler ile interaktif etkileştikleri bilinmemekle birlikte bu konuda temel araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

PC3 hücre hattı	ATCC –CRL-1435
RPMI-1640	Sigma
DMSO	Sigma
FBS	Gibco
%25 Trypsin-EDTA (1X)	Gibco
Penicilin-Streptomycin (10.000 units)	Sigma
DPBS	Sigma
Kemilüminesans Reaktif	Santa Cruz

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Laminar Kabin	Bilser Biosafety Cabinet
CO <sub>2</sub> İnkübatör	Nüve EC 160
ELISA	Thermo Labsystems Multiskan Spectrum
SDS – PAGE	Bio-Rad (Tetra Cell)
Western Blot	Bio-Rad ( Transblot Turbo)
Mikroskop	Olympus BX51
Orbital Shaker	İsolab
Rotator	İsolab
Santrifüj	Hattick/Ependorf
Etüv	MRC
Elektroporator	Bio-Rad

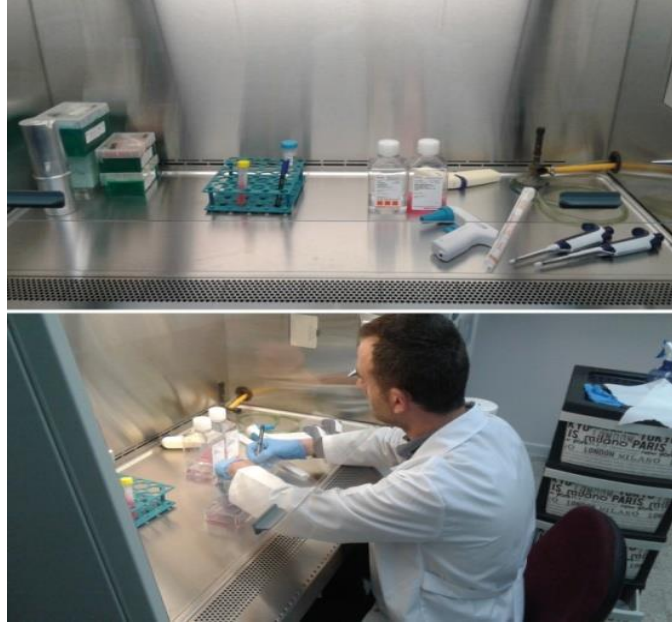
#### 3.3. Hücre Kültürü

Çalışmalarda prostat kanser hücre hattı olan PC3 hücresi kullanıldı. PC3 hücresi ATCC (CRL-1435) den ticari olarak temin edildi.

##### 3.3.1. Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması

PC3 hücreleri 25 cm<sup>2</sup> lik flasklara ekildi. Hücre kültürü ortamı olarak % 10 FBS, Penicilin-Streptomycin (100 ünite), L-Glutamine ve 2mM NaHCO<sub>3</sub> içeren RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. Hücreler 37°C’de, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılıp çoğaltıldı.

Hücreler büyüdüğünde farklı ortama geçirmek için pasajlandı. Pasajlamada, önce RPMI-1640 medyum çekilip FBS' i ortamdaki uzaklaştırmak için DPBS ile yıkandı. Sonra hücreleri flasktan kaldırmak için Tripsin-EDTA çözeltisi ekleyip CO<sub>2</sub> etüvünde yaklaşık 1 dakika tutuldu. Tripsin-EDTA' nın aktivitesini durdurmak için FBS içeren medyum konuldu. Hücrele falkon tüpe toplanıp oda sıcaklığında 1200rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılıp çöken pellet medyumda süspansiyon edilip yapılacak işleme göre hücre kültürü platelerine ekim yapıldı. Şekil 1 de çalışmada kullanılan laminar kabin gösterilmektedir.



**Resim 1. Tezde kullanılan hücre kültürü kabini ve malzemeleri.**

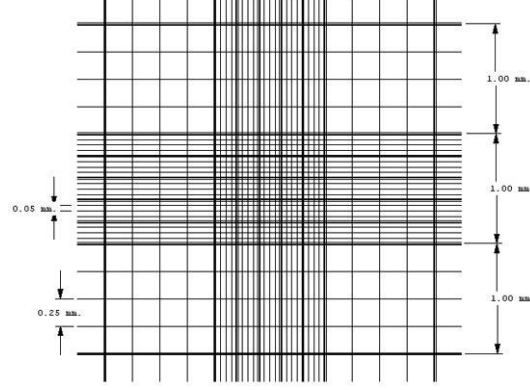
### 3.3.2. Hücre Sayımı

Yapılan çalışmalarda 25 cm<sup>2</sup> flask ve 6 kuyucuk plâtelere kullanılmıştır. Plâtelere ekim yapılmadan önce her kuyucuğa belli sayıda hücre ekebilmek için hücreyi pasajlandıktan sonra Tripan Mavisini ile boyayıp Thoma Lamında (Iso Lab) hücre sayımı yapıldı (Şekil 12).



**Şekil 12. Hücre sayımı yapılan Thoma Lamı.**

Thoma lamı ile hücre sayımı yönteminin esası; mikroskop altında  $0.1 \text{ mm}^3$  hacimde sayım yapılarak hesaplama yardımıyla numunenin bir mL'sinde bulunan hücre sayısını belirlemektir (Şekil 13).



**Şekil 13. Thoma lamında sayım yapılan karelerin toplam görüş alanı.**

Bu işlem için Thoma lamı üzerinde bulunan sayım bölgelerinden faydalanılır. Sayım bölgesinin toplam alanı  $1 \text{ mm}^2$  dir. Lamel yapıştırıldığında sayım bölgesinin yüksekliği de  $0.1 \text{ mm}$ 'dir. Sayım işlemini kolaylaştırmak amacıyla her bir sayım bölgesi de kendi içerisinde karelere bölünmüştür.

Sayım için;  $10 \mu\text{L}$  hücre süspansiyonu,  $15 \mu\text{L}$  PBS,  $25 \mu\text{L}$  Tripan Mavisi karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra Thoma Lamına  $10 \mu\text{L}$  yüklenerek ışık mikroskopunda sayım yapılır. Bu durumda ölü hücreler metilen mavisi ile boyanır, canlı hücreler boyanmaz. Yalnızca boyanmamış hücreler sayılarak canlı hücre sayımı gerçekleştirilebilir. Thoma Lamındaki 16 kareli olan 4 bölgede ayrı ayrı sayım yapılarak bu 4 bölgenin ortalaması alınır. Seyrelme faktörü de dikkate alınarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplanarak her bir kuyucuğa ekilecek olan hücre miktarı belirlenir.

### **3.4. pIRF5 ve pOCT4 Çoğaltılması ve İzolasyonu**

Projede kullanılan ekspresyon plazmidleri Rutgers Kanser Araştırma Merkezinden Dr. Betsy Barnes tarafından temin edilmiş ve daha önceki araştırmalarda kullanılmıştır (Cevik O ve ark. 2017). pIRF5 ve pOCT4 plazmidleri *E.coli* DH5 $\alpha$  suşuna transformasyonu elektroporasyon ile gerçekleştirildi. Plazmid içermeyen *E.coli* DH5 $\alpha$  suşu ön hazırlıklar yapılarak logaritmik üreme fazına getirildi. Bu fazda bakterilerin kompetanlığı en yüksek düzeydedir. Uygun miktarda negatif yüklü plazmid DNA ve pozitif yüklü bakteri bir araya getirilerek plazmidlerin hücre zarına tutunmaları sağlandı ve çok kısa süre ile elektrik akımını uygulanarak hücre zarının yapısında küçük porlar oluşumuna ve dolayısıyla



plazmidlerin hücre içine girmesi sağlandı. Plazmid içeren bakterilerin seçilimi yapıldı ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere ya petri içerisinde +4°C' da 6 aya kadar yada gliserol içerisinde -80°C' da uzun süreli olarak saklandı.

### 3.4.1. Elektroporasyon

Elektroporasyonda aşağıdaki işlem basamakları izlendi;

LB Broth hazırlanması;

5g NaCl

5g Tripton

2.5g Maya ekstraktı

500ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü.(pH 7.5, NaOH ile ayarlandı)

Şişe ile otoklavlandıktan sonra +4°C' da saklandı.

LB Agar hazırlanması;

5g NaCl

5g Tripton

2.5g Maya ekstraktı

7.5g Agar

500ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü.

Otoklavlandı ve soğuması beklendikten sonra uygun antibiyotik (Ampisicilin için 100ug/ml veya kanamisin için 50ug/ml) konsantrasyonu eklenerek petrilere döküldü. Katılaştıktan sonra +4°C' da saklandı.

1. Bakteri Kültürleri Araçlarının ve Reaktiflerinin Hazırlanması (1.gün, Öğleden Sonra)

a. Öğleden sonra, steril olarak (örneğin, 100 x 13 mm) borosilikat cam test tüplerine 1-5 ml otoklavlanmış LB broth'u küçük bir bakteri (E. coli) alikotu ile inoküle edildi.

b. İnoküle edilmiş test tüplerini 37°C sıcaklıkta (sıcak oda veya inkübatör) barındıran bir silindir tamburuna yerleştirildi, karıştırıcı üzerinde yüksek hızda gece boyu inkübe edildi.

c. Cam ateşle yumuşatıldı ve daha sonra bir cımbız veya pens ile 135° açı bükme yönlendirmek kadar bir Bunsen brülör alev çubuğunun ortasında ısıtma bir cam çubuktan 'hokey sopası' şeklinde bir hücre yayma çubuğu hazırlandı . Çubuğu, uç ile ilk viraj arasındaki orta noktaya bir kez daha ısıtıldı ve 45° açıyla içeri doğru büküldü (birinci virajın ters yönünde).

d. LB-agar antibiyotikler olmadan hazırlayın ve soğuduktan sonra elektroporasyon protokolünün hazırlanmasında uygun antibiyotiği ilave edilir. Antibiyotik içeren LB-agar

petrilere dökülür (elektroporasyona tabi tutulacak vektör üzerindeki direnç işaretleyicisine göre) ve 4 ° C'de saklanır.

e. E. coli için otoklavlanmış ddH<sub>2</sub>O hazırlandı ve 4° C'de saklandı.

## 2. Elektrokompentant Bakterilerin Büyümesi (2. gün, Sabah)

a. Her bir LB agar petrisine bakteri kültürünün 100 ul' sini dağıtıldı, donmuş gliserol stokları da kullanılabilir ve doğrudan petriye aktarılabilir.

b. Hokey sopası şeklindeki hücre yayıcıyı %100 EtOH içine batırıldı, kullanmadan önce ya da yayılmadan önce sterilize etmek için kalan EtOH' yi kısa bir süre için boşaltıldı ve yakıldı. 100 µl bakteri kültürünü, agar yüzeyini bozmayacağından (kırılmadığından) emin olarak, steril cam hücre yayıcı ile eşit olarak yayıldı.

c. Petri 4-6 saat 37°C' de ya da ince bir bakteri üremesi ayırt edinceye kadar inkübe edildi. Hücreler aktif olarak büyürken en kompetant fazdadır.

## 3. Elektrokompentant Bakteriyel Hücrelerin Hazırlanması (2. gün, Öğleden Sonra)

a. Bakteri, agar yüzeyini delmemeye veya kırmayacağından emin olarak steril bir öze ile toplandı. Tek bir transformasyon için 2 mm çapında bir bakteri kitlesi yeterlidir. Tipik olarak bu, ince bakteri yüzeyini inokülasyon döngüsü ile iki veya üç kez kazımaya ihtiyaç duyar. Aynı plakadan birkaç örnek (tipik olarak 4-6 arasında) toplanabilir.

b. 1 ml buz soğukluğunda steril ddH<sub>2</sub>O (E. coli için) içinde bakteri kütlesi tekrar süspanse edildi, hiçbir kümeleşme görülmeğe kadar iyice karıştırıldı. Buz üzerinde tutuldu.

c. Her bir bakteri süspansiyonu 4°C' ye ayarlanmış soğutulmuş mikrosantrifüjde 5 dakika boyunca 5000 xg' de santrifüj edildi.

d. Süpernatantı atıldı, aynı hacimde buz soğukluğunda steril ddH<sub>2</sub>O içinde bakteriyel pelleti yeniden süspansiyon haline getirildi ve toplam üç yıkama için iki kez daha önce yapıldığı gibi santrifüj adımını tekrarlandı.

e. Süpernatant çıkarıldı, pellet tekrar süspansiyon haline getirildi ve 40 µl buz soğukluğunda steril ddH<sub>2</sub>O içinde bakteriyel pellet iyice gevşetildi ve buz üzerinde tutuldu.

## 4. Elektrokompentant Bakterilerin Transformasyonu (2. gün, Öğleden Sonra)

a. 40 µl bakteriyel süspansiyona soğutulmuş 1 µg kadar plazmid DNA (Tris-EDTA tamponu) ilave edildi ve bu karışımı steril 0.2 cm'lik boş bir küvete aktarıldı.

b. Küvet elektroporasyon odasına yerleştirildi ve 1,8 kV, 25 µF' de elektroporasyon yapılır. Zaman sabiti ~5.0 msn olmalıdır ve hiç bir ark oluşmamasına dikkat edildi.

c. 1 ml LB Broth içine yeniden süspansiyon haline getirerek ve daha önce otoklavlanmış borosilikat cam test tüpüne transfer ederek hücre süspansiyonu hızla geri kazanıldı.

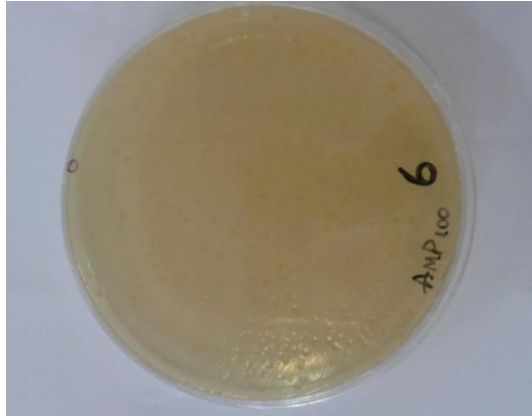
d. Antibiyotik seçimi olmadan 30 dakika süreyle 37° C' de havalandırılmış büyüme koşulları altında (silindir tamburunda) inkübe ederek hücrelerin iyileşmesine izin verildi.

e. Bakterileri önceden hazırlanmış LB agar petrisine uygun selektif ajan (antibiyotik) varlığında inoküle edilir ve 37° C'de gece boyu inkübe edildi.



**Resim 2. Elektroporasyonda kullanılan elektroporator.**

Elektroporasyondan sonra petri üzerindeki koloniler seçilir. Mavi koloniler plazmid içermeyen kolonilerdir. Beyaz koloniler hedef plazmidleri içermektedir (Resim 3).

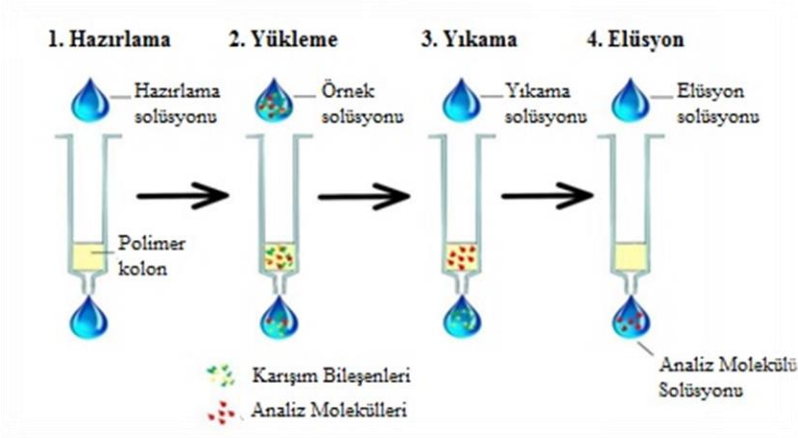


**Resim 3. Elektroporasyonu yapılan E.coli bakterilerinin LB Agar'da seçimi.**

### **3.4.2. Plazmid İzolasyonu**

pIRF5 ve pOCT4 plazmidini içeren dondurulmuş stok bakteri kültürü oda sıcaklığında çözündürüldü. Bakteri kabini içerisinde alev açık olarak 8ml LB Medyum içerisine antibiyotik ve pIRF5 ve pOCT4 plazmidini içeren stok bakteri ayrı ayrı eklenerek gece boyu 37° C'da çalkalamalı etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Çoğaltılan bakteriler plazmid izolasyonunda kullanıldı.

Plazmid izolasyonunda QIAGEN Plazmid Mini Kiti (cat. nos. 12123) kullanıldı. Kit içerisindeki izolasyon protokolü izlendi (Şekil 14).



**Şekil 14. Plazmid izolasyon basamakları.**

- Gece boyu inkübasyona bırakılan bakteriler 6000 xg de 15 dk santrifüj edildi.
- Bakteri pellet 0.3 ml P1 buffer içerisinde çözüldü.
- Üzerine 0.3 ml P2 buffer ilave edildi ve karışması için hafifçe 4-6 defa alt üst edildi. Oda ısısında (15-25°C) 5 dakika inkübe edildi.
- 0.3 ml P3 buffer ilave edilerek hafifce karıştırıldı ve buz üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- +4°C'de soğutmalı santrifüjde 14.000-18.000 xg olacak şekilde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant bulanık ise santrifüj tekrarlandı.
- Qiagen kolonu içerisine 1 ml QBT solusyonu eklenerek yerçekimi ile inmesi beklendi.
- Elde edilen süpernatantlar kolana yüklenerek yerçekimi etkisiyle kolondan akması beklendi.
- Kolon 2 x 2 ml olacak şekilde QC buffer ile yıkandı ve kolondan yerçekimi ile akması beklendi.
- Kolona bağlanan DNA temiz bir 2 ml lik ependorfa 0.8 ml QF buffer ile elue edildi. QF buffer önceden 65° C de ısıtıldı.
- DNA mixi üzerine oda sıcaklığındaki izopropanol eklenerek DNA çöktürmesi yapıldı. 15.000 xg de 30 dakika +4°C de santifüj edildi. Supernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- DNA pellet 1 ml oda ısısındaki % 70'lik ethanol ile yıkandı ve 15.000 xg de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice döküldü.
- Pellet 5 – 10 dakika ethaol uçana kadar kurutuldu. Ardından yeterli miktarda uygun buffer içerisinde çözüldü (TE buffer, pH 8.0).
- DNA örneğinin bir kısmı miktar ve saflık kontrolü yapmak amacıyla ayrı bir ependorfa alınarak kalan kısım ilerki deneylerde kullanılmak üzere -20° C da saklandı.

### 3.4.3. Plazmidlerin Saflık ve Miktar Tayini

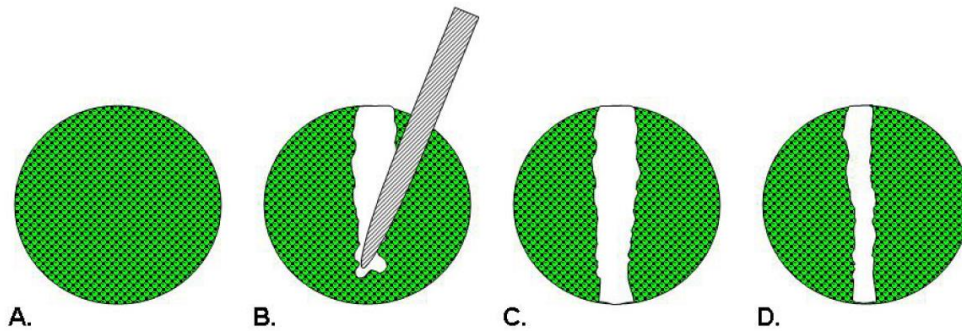
İzole edilen plazmidler nanodropta ölçümü alındı. Bu işleme ek olarak % 0,03 ethidium bromür %1 lik agoroz jel dökülerek örnekler 6x DNA Loading buffer ile kuyucuklara yüklendi ve 100V akımda yürütüldü. Jel Chemi Doc görüntüleme cihazında görüntülendi.

### 3.5. IRF5 ve OCT4 için Transfeksiyonu

pIRF5 ve pOCT4 ekspresyon plazmiti kullanılarak IRF5 ve OCT4 protein overekspresyonu sağlanmasında 6 kuyucuk plate için 1 µg DNA ile transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyonda plazmid özel bir transfeksiyon reaktifi içerisindeki lipozomla Lipofectamine 2000 kaplanarak hücre içine girişi sağlandı. Bunun için kullanılan ticari kitin protokolüne göre yapıldı. Transfeksiyonun gerçekleştiği 8-12 saat sonra mikroskoptan görüntü alınarak hücre canlılıkları kontrol edildi ve 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrasında hücreler IP ve western blot deneyleri için kullanıldı.

### 3.6. IRF5 ve OCT4 Overekspresyonunun Migrasyon Üzerine Etkisi

Scratch testi, hız, süreklilik ve polarite gibi temel hücre göçü parametrelerini ölçmek için yaygın olarak kullanılan basit, tekrarlanabilir bir testtir. Hücreler confluens olmak için büyürken pipet ucu ile ince bir yara açılır. Yara kenarındaki hücreler polarize olur ve yara boşluğuna göç eder. Bu tahlilin avantajları, spesifik kemoatraktanların veya gradyan odalarının kullanılmasını gerektirmemesi ve 'tek hücre' göç tahlillerinde güçlü cevaplar göstermeyen hücre tiplerinde bile güçlü bir yönlü göç yanıtı üretmesidir. Ardışık zamanlarda görüntüleme kullanılarak gerçekleştirildiğinde en güvenilir şekilde analiz edilir ve bu da değerli hücre morfolojisi/protein lokalizasyonu bilgisini verebilir (Şekil 15).



Şekil 15. Scratch tayini.

(A) Konfluent hücre hattı. (B) Steril bir pipet ucu ile hücre hattında bir yara oluşturulması. (C) Çizilerek oluşturulan yara. (D) Yaranın açılmasından 24 saat sonra yaranın kapanma miktarı. (Keren IH and Renee LH, 2011)

pIRF5 ve pOCT4 ile transfeksiyon sonrasında IRF5 ve OCT4 proteinlerinin overekspresyonun hücre migrasyonuna olan etkisi araştırılmıştır. Transfeksiyondan sonra hücreler 37°C’ de, % 95 nem ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılıp çoğaltıldı. Hücreler %50 confluens olunca steril bir ortamda pipet ucu ile Şekil 15’de gösterildiği gibi kuyucukarın ortasından baştan başa çizildi. 0 ve 24 saat görüntüleri alınarak transfeksiyonun migrasyon ve proliferasyon üzerine olan etkisi değerlendirildi.

### 3.7. BCA Protein Tayini

Bicinchoninicasit (BCA) protein tayin kiti (Santa Cruz BCA Protein Assay Kit, sc-202389) konsantrasyonu bilinmeyen örneklerdeki protein miktarını belirlemek için kullanılır. Prensipte odasıcaklığında sistein, sistin, triptofan ve trozin kalıntıları bakır<sup>+2</sup> iyonlarını bakır<sup>+1</sup> e indirgerler. Daha yüksek sıcaklıklarda (37° C ila 60° C), proteindeki peptid bağları da bu indirgemeyi gerçekleştirir, bu aynı zamanda spesifik kalıntıların varlığına kıyasla protein miktarına daha güçlü bir şekilde bağlanan sonuç üretir. Her bakır<sup>+1</sup> iyonu, 2 BCA molekülü ile kompleks oluşturur. Kompleks 562 nm de absorbens veren mor renk oluşturur. Bilinmeyen örnekteki absorbens miktarı standart ile karşılaştırılır ve örnekteki toplam protein miktarı hesaplanır.

Patlatma solüsyonu ile toplanan örnekler BCA protein tayin kitine uygun şekilde 96 well eliza plakasına 2 tekrarlı olarak yüklendi. Üzerlerine hazırlanan BCA solüsyonu eklenerek 37°C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 562 nm de ölçüm alındı. Alınan absorbens değerleri Microsoft Excel 2007 programına aktarılarak toplam protein miktarları hesaplandı.

Hazırlanan çözeltiler:

- BCA solüsyonu: Reaktif A ve Reaktif B 1:50 oranında hazırlandı.
- BCA standart solüsyonu: 2 mg/ml stok solüsyon, PBS ile 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml ve 31,25 µg/ml olacak şekilde seri dilüsyon yapıldı.
- 96 well eliza plakasına 25 µl örnek veya 25 µl standartlar yüklendi. Yükleme yapılan kuyuların üzerine 200 µl BCA solüsyonu eklendi.
- 37° C’ da 30 dakika inkübe edildi.
- Ünkübasyon sonrasında Thermo Labsystems – Multiskan Spectrum plaka okuyucuda 562nm de ölçüm alındı.



**Resim 4. BCA Protein tayini. Multiskan Spectrum ve eliza plate yüklemesi.**

### **3.8. Hücrelerde Yapılan Western Blot Çalışmaları**

Hücreler toplandıktan sonra patlatma tampon kullanılarak buz içerisinde bekletildi ve patlamaları sağlandı. 12.000 xg de 4°C de 10 dakika santrifüj edilerek üstfazda Western Blot çalışmaları yapıldı.

Hazırlanan çözeltiler:

- 4X yığınlama jeli çözeltisi: 0.5 M Tris, % 0.4 SDS, pH:6.8
- 4X Ayırma jeli çözeltisi: 1.5 M Tris, % 0.4 SDS, pH:8.8
- % 30 Akrlamit-bis çözeltisi
- % 10 Amonyum Persülfat çözeltisi (APS)
- % 10 SDS çözeltisi
- TEMED
- 2X Örnek yükleme tamponu: %4 SDS, %20 gliserol, %10  $\beta$ -merkaptoetanol, %0.004 bromfenol mavisi ve 0.125 M TrisHCl, (pH 6.8)
- Elektroforez yürütme çözeltisi: 5 m MTris, 38.4 mM Glisin, % 1 SDS
- Transfer çözeltisi: 5 mM Tris, 38.4 mM Glisin, %20 Metanol
- Bloklama çözeltisi: %2.5'lik BSA çözeltisi
- TBST: 20 mM Tris, 154 mM NaCl, % 0.1 Tween 20
- Primer antikor (1:1000): GAPDH (sc-25778), IRF5 (sc-390364), OCT4 (sc-9081), SOX2 (sc-17320), NANOG (sc-33759)
- Sekonder antikor (1:3000): (HRP konjugatlı sc-2030(R), sc-2020(G), sc-516102(M))
- Kemilüminesans Reaktif: Santa Cruz (sc-2048)
- Film Banyosu çözeltileri

**Tablo 3. SDS-poliakrilamid jelin yoğunluğuna göre hazırlanışı.**

Madde	% 4'lük Yığınlama jeli	% 12'lik Ayırma jeli	%15'lik Ayırma jeli
4X yığınlama çözeltisi	1.25 ml	-	-
4X Ayırma çözeltisi	-	2.5 ml	2.5 ml
% 30 Akrilamid-bis	0.65 ml	4 ml	5 ml
%10 SDS	50 µL	100 µL	100 µL
APS	25 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	10 µL	10 µL
Distile su	3.05 ml	3.4 ml	2.4 ml

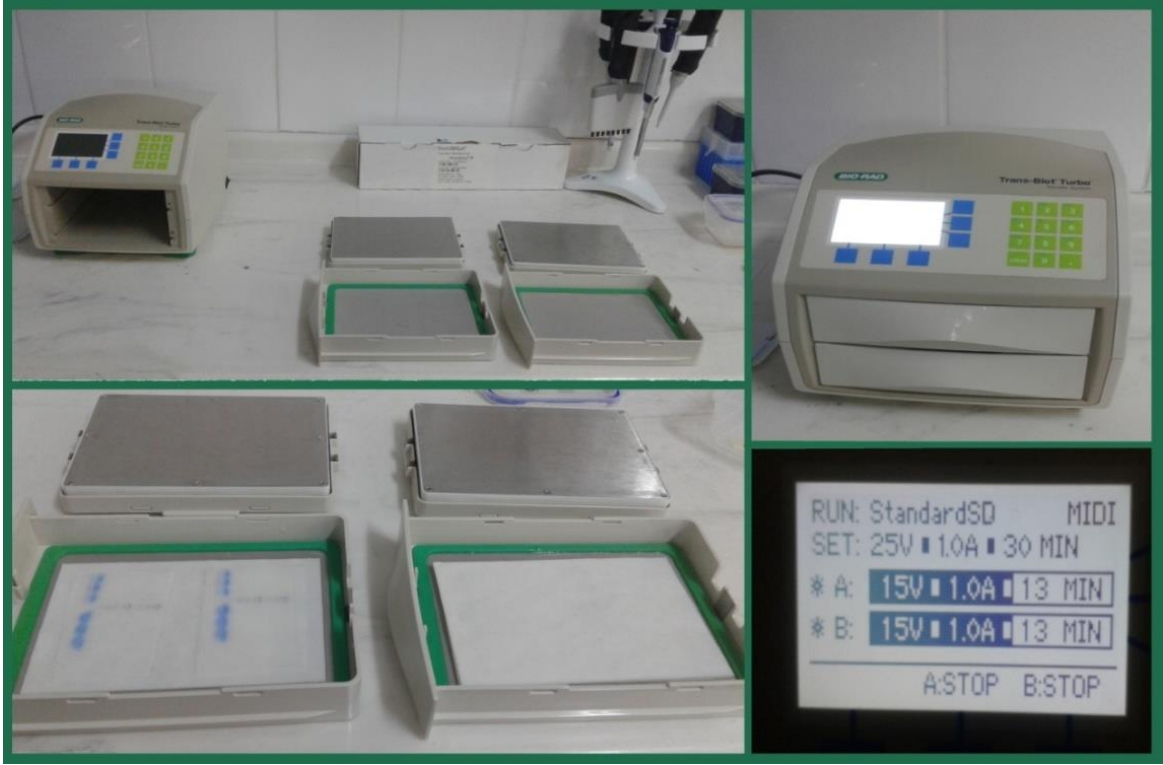
Jeller hazırlanıp camlar arasında polimerleşmesi sağlandıktan sonra tanka yerleştirilir. İçerdikleri protein miktarları tespit edilen örnekler, 1:1 oranında hazırlanan örnek yükleme tampon ile 5 dakika 95°C kaynatıldı. Her kuyucuğa 25 µg/mL oranında protein içeren numuneler yüklendi. Bir kuyuya 5 µl standart (Intron, 24052) yüklendi. Elektroferezde numuneler ilk önce 100 Volt akımda 1 saat yürütüldü (Resim 5).



**Resim 5. SDS-PAGE jel döküm ekipmanı, solüsyonlar ve elektroferez.**

Elektrofez sonrasında jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için yarı kuru sistemle immunoblotting yapıldı. PVDF membrane blotlama kağıdının üzerine yerleştirildi. Membran üzerine jel dikkatlice yerleştirilerek blotlama işlemi 25 Volt akım ve 1 Amper dirençde 30 dakika gerçekleştirildi (Resim 6).





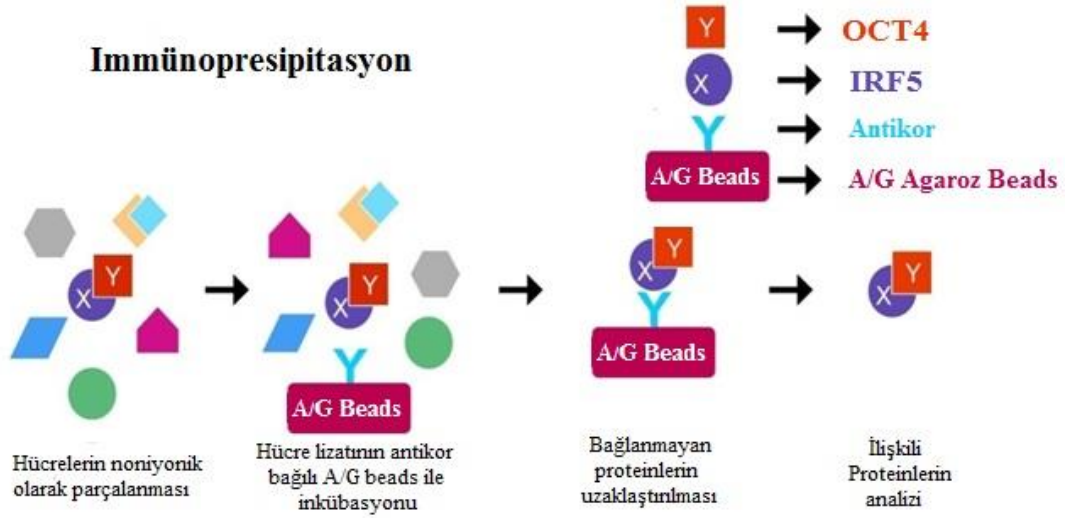
**Resim 6. Jeldeki proteinlerin PVDF membrane transferi.**

Proteinlerin PVDF membrane transferinden sonra membran 2 saat süre ile oda ısında BSA ile bloklandı. 2 saat sonra primer antikor ile +4<sup>0</sup>C’de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBST ile 3 kez yıkandı. Membran, sekonder antikorla odasıcaklığında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBST ile 3 kez yıkandı. Ardından kemilüminesans substrat içeren çözelti ile (Santa Cruz Immuno Cruz™ Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048) ile 1 dakika karanlıkta inkübe edildi.

Film banyosu ile elde edilen bandlar dansitometrik analiz yapılarak değerlendirildi. GAPDH örneklerdeki değişiklikleri elimine edebilmek için dansitometrik analiz ve hesaplamalar referans protein olarak kullanıldı. Bandların dansitometrik analizi İmageJ (NIH, USA) programında yapıldı.

### **3.9. İmmünopresipitasyon (IP) Deneyleri**

İmmünopresipitasyon deneyleri lizat içerisindeki hedef proteinin ve o protein ile ilişki içerisinde olan proteinlerin bir A/G Agarose Beads üzerinde tutuklanması ve yıkamalar ile diğer proteinlerin uzaklaştırılıp saf olarak hedef proteinlerin elde edilmesi prensibine dayanır (Şekil 16). İmmünoresipitasyondan sonra doğruluk kontrolü için SDS-PAGE ve/veya Western Blot çalışmaları ile yapılır.

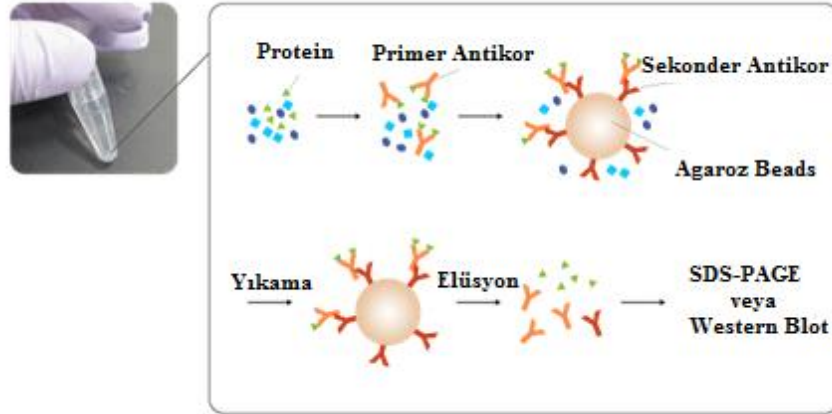


**Şekil 16. İmmünopresipitasyon deneyinin basamakları.**

X - IRF5 proteinini, Y - OCT4 proteinini temsil etmektedir.

<https://www.mybiosource.com/learn/assay-learning-center/coimmunoprecipitation/> (27.11.2018)

Patlatma solusyonu ile toplanan hücreler 12.000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Üst fazdan 1 input örnekleri için ayrılarak 1:3 oranında hazırlanan 4x örnek yükleme tampon ile 5 dakika 95<sup>0</sup>C kaynatıldı. Örnekler western blot deneylerinde kullanılmak için -20<sup>0</sup>C'de saklandı.



**Şekil 17. İmmünopresipitasyon ile protein saflaştırma basamakları.**

<http://ruo.mbl.co.jp/bio/g/support/method/immunoprecipitation.html> (27.11.2018)

IP denemesi için supernatant örneklerinden 500µl ayrı birependorfa alındı. İçerisine 10µl uygun primer antikor konularak ependorfların ağzı parafilm ile kapatıldı.+4<sup>0</sup> C'de rotator üzerinde 6 saat inkübasyona bırakıldı (Resim 7). 6 saatsonunda primer antikor ile inkübasyona bırakılan örneklerin üzerine protein A/G agarose eklenerek +4<sup>0</sup> C'de rotator üzerinde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Protein, antikor ve AG Beads etkileşimleri Şekil 18'de gösterilmiştir. Inkübasyon sonunda örnekler +4<sup>0</sup> C'de 3000 rmp 10 dakika santrifüj edildi. Pellet RIPA buffer ile yıkandı. Yıkamalar sonunda kalan pellet 1:1 oranında hazırlanan

2x örnek yükleme tampon ile 5 dakika 95<sup>0</sup>C kaynatıldı. Tüm örnekler western blot deneylerinde kullanılmak üzere -20<sup>0</sup> C'de saklandı.



**Resim 7. IP deneyinde Rotator üzerindeki hücre lizatı ve primer antikor.**

### **3.10. İstatistiksel Analiz**

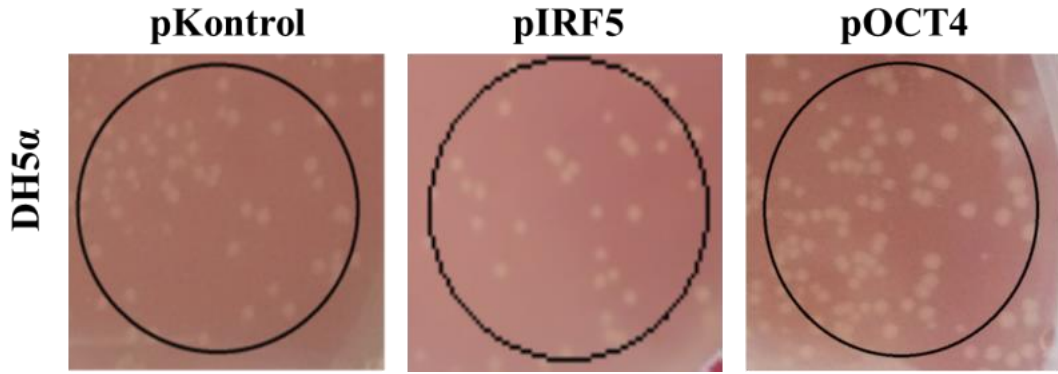
Bu tez çalışmasında İstatistiksel analiz yönteminin seçimi ve uygunluğunun tespitinde normal dağılımlar araştırılmış ve SPSS 15.00 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkın karşılaştırılması için One Way Anova ve post\_hoc test olarak Tukey testi kullanılmış, gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar ise student T testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

## 4.BULGULAR

### 4.1. Plazmidlerin oğaltılması ve Klonların Seçimi

Elektroporasyon ile transformasyonu yapılan bakteriler LB Agarda büyütüldü ve koloniler seçilerek ayrı petrilerde üretildi. İzolasyon için kolonilerden alınan bakteri ktrleri LB medyumda üretilerek plazmid izolasyonunda kullanıldı.

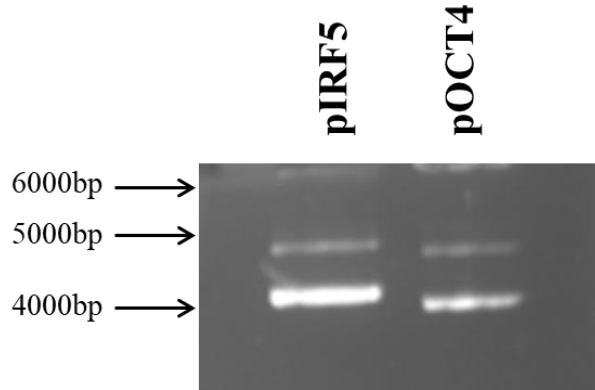
Kontrol grubuna kıyasla pIRF5 plazmidini içerek bakteriler daha az koloni oluştururken pOCT4 plazmidini içeren bakteriler daha fazla koloni oluşturduğu gözledi (Resim 8).



Resim 8. DH5α Bakterileri Kompetent hücre kolonileri.

### 4.2. Plazmid İzolasyonu Sonrasında Agaroz Jel Elektroforezi

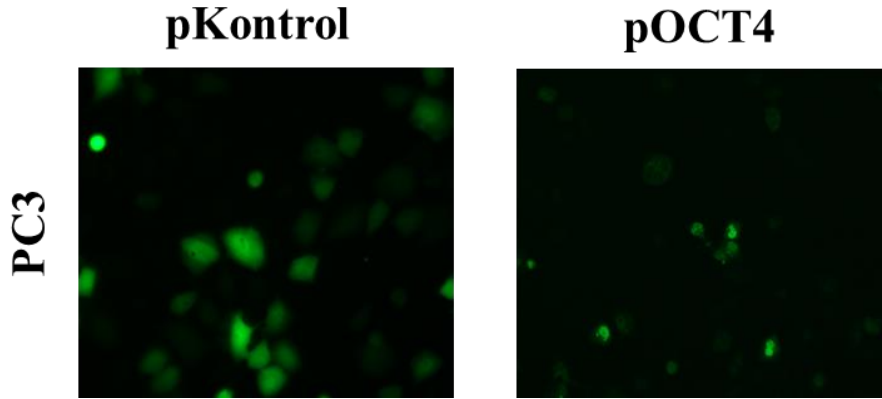
İzole edilen plazmidlerin Nanodrop lmleri alındı miktarı ve saflığı belirlendi. Bu denemeye ek olarak Agaroz jel elektroforezi yapıldı. Miktar ve saflık doğrulaması 2 deneme ile doğrulandı. İzole edilen plazmidler kullanılan DNA markeri ile %1'lik Agaroz jelde yerleri belirlendi. Görüntü 2 bant şeklinde elde edildi. st bant nicking plazmid DNA, alt bant süpersarmal plazmid DNA olarak beklenen sonuçlar elde edildi (şekil 18).



şekil 18. Agaroz jel elektroforezinde plazmidlerin ayrıştırılması.

### 4.3. Plazmidlerin Ekspresyonlarının Kontrolü

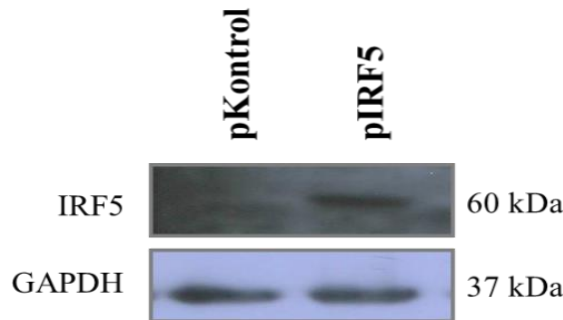
pKontrol-GFP ve pOCT4-GFP plazmidlerinin GFP ekspresyon kontrolü yapıldı. Kontrol grubunda GFP proteininin overekspresyonu yapıldı ve hücrenin her yerinde lokalize olduğu görüldü. pOCT4+GFP ile yapılan overekspresyonda ise nükleus çevresinde lokalize olduğu görüldü. OCT4 proteininin nükleer bir protein olup, ekspresyon sonrası nükleus çevresinde hareketliliği Florasans Mikroskop ile görüldü (Resim 9).



Resim 9. Plazmid transfeksiyonunun PC3 hücrelerinde ekspresyonu.

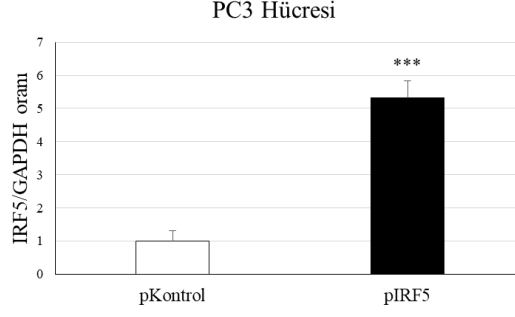
### 4.4. Overekspresyon Yapılan Proteinlerin Western Blot Analizleri

Western Blot analizlerinde IRF5 proteininin overekspresyonu gösterildi. Kontrol grubuna göre daha yüksek oranda IRF5 protein ekspresyonu bandı gözlemlendi. Referans protein olarak GAPDH kullanılarak karşılaştırıldı (Şekil 19).



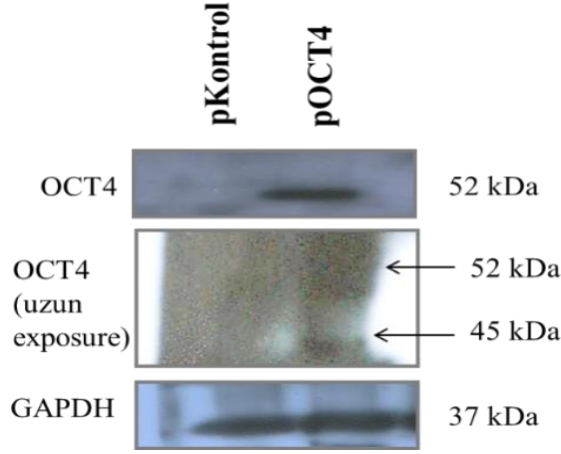
Şekil 19. pIRF5 ekspresyon vektöründe IRF5 protein ekspresyon western blot ile kontrolü.

pIRF5 ile overekspresyon yapılan hücrelerde kontrol grubuna oranla IRF5 proteini yaklaşık 5.3 kat fazla miktarda sentezletildi. IRF5 overekspresyonu PC3 hücrelerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve kontrol grubuna göre artışı anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ) (Şekil 20).



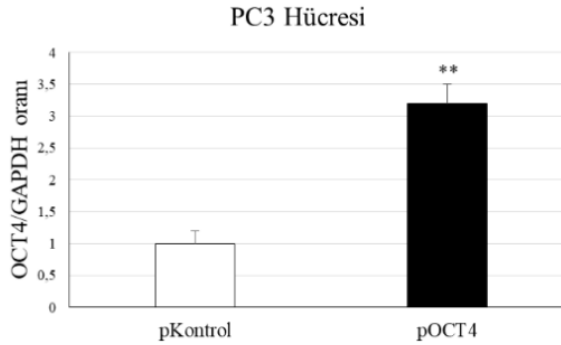
Şekil 20. pIRF5 ekspresyon vektöründe IRF5 protein ekspresyon düzeyleri.

Western Blot analizlerinde OCT4 proteinin overekspresyonunun PC3 hücrelerinde gerçekleşip gerçekleşmediği gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre daha yüksek oranda OCT4 protein ekspresyonu sağlandı. OCT4 proteinin 45 kDa ve 52 kDa da 2 farklı bant verdiği bilinmektedir. Uzun exposure ile 2 bant (45kDa) olarak over ekspresyonun olduğu gösterildi. Referans protein olarak GAPDH kullanıldı (Şekil 21).



Şekil 21. pOCT4 ekspresyon vektöründe OCT4 protein ekspresyon western blot ile kontrolü.

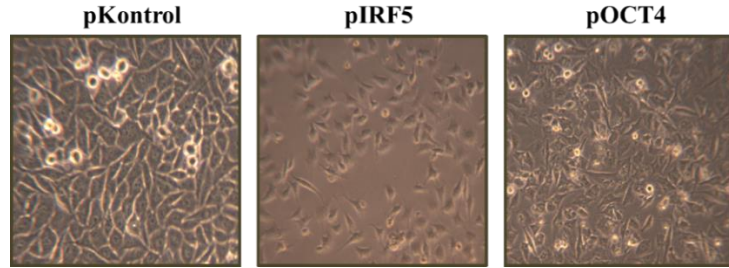
pOCT4 ile overekspresyon yapılan hücrelerde kontrol grubuna oranla OCT4 proteinin yaklaşık 3.2 kat fazla miktarda sentezletildi. OCT4 proteini overekspresyonu PC3 hücrelerinde gerçekleştirilmiş ve kontrol grubuna göre artış anlamku bulunmuştur (Şekil 22).



Şekil 22. pOCT4 ekspresyon vektöründe OCT4 protein ekspresyon düzeyleri.

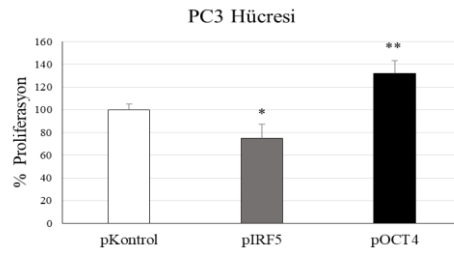
#### 4.5. Transfeksiyon Sonucu Hücrelerdeki Değişiklikler

Transfeksiyon sonrası PC3 hücrelerinin morfolojilerini değerlendirmek için mikroskop altında hücresel değişiklikler ve proliferasyon incelenmiştir. IRF5 proteininin hücre proliferasyonunu negatif yönde etkilediği buna karşılık OCT4 proteinin proliferasyonu pozitif yönde etkilediği gözlemlendi. (Resim 10)



Resim 10. pIRF5 ve pOCT4 ekspresyon vektörlerinin transfeksiyon sonrası hücre morfolojileri.

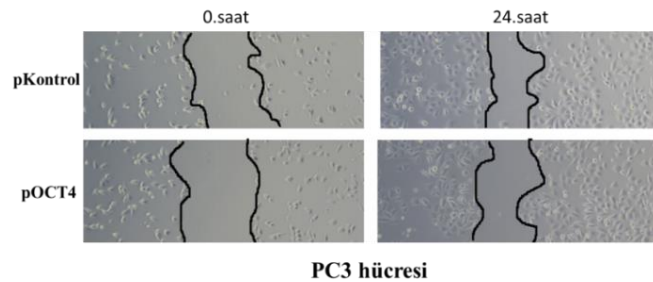
İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunun proliferasyonu %100 olarak alındığında pIRF5 ile transfeksiyon yapılan hücrelerde proliferasyon yaklaşık olarak %75, pOCT4 ile transfeksiyon yapılan hücrelerde ise yaklaşık olarak %130 olarak bulunmuştur. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  kontrol grubu ile karşılaştırıldığında) (Şekil 23).



Şekil 23. pIRF5 ve pOCT4 vektörlerinin hücre proliferasyonu üzerine etkisi.

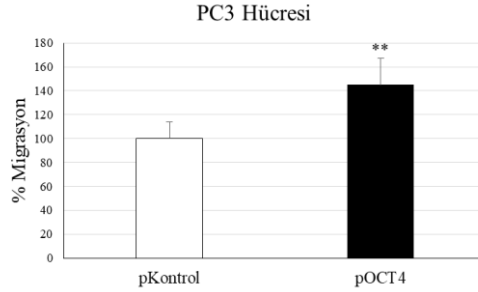
#### 4.6. OCT4'ün Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi

Migrasyon denemesi için scratch yöntemi kullanılarak elde edilen verilerde kontrol grubuna kıyasla pOCT4 vektör plazmidini ile overekspresyon sağlanan hücrelerde; plate üzerine açılan yaranın daha fazla kapandığı gözlemlendi. Bu sonuç OCT4 proteinini migrasyonu hızlandırdığını göstermektedir (Resim 11).



Resim 11. pOCT4 ekspresyon vektörünün PC3 hücrelerinde migrasyon plate görüntüsü.

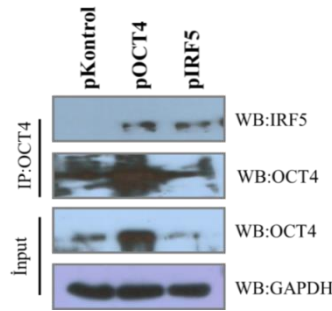
İstatistiksel olarak pOCT4 ekspresyon vektörünün PC3 hücrelerinde kontrol grubuna oranla yaklaşık %45 arttırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlar OCT4 proteinin PC3 hücrelerinde proliferasyonu pozitif yönde etkilediğini göstermektedir (\*\* p<0,01 kontrol grubuna göre). (Şekil 24)



Şekil 24. pOCT4 ekspresyon vektörünün PC3 hücrelerinde migrasyon değişiklikleri.

#### 4.7. IRF5 ile OCT4 Protein Etkileşimleri Sonuçları

OCT4 ve IRF5 overekspresyon yapılan PC3 hücrelerinde OCT4 ile IP yapılan örneklerde hem IRF5 hemde OCT4 yoğun bir şekilde görülmektedir. Aynı örneklerin inputlarında OCT4 kontrolü yapıldığında IRF5 overekspresyon yapılan hücrelerde kontrol hücrelerine göre OCT4 protein ekspresyonu daha az olduğu görülmektedir. IRF5 overeksprese olduğu zaman OCT4 düzeyleri azalmış olabilir. IRF5 ve OCT4 proteinlerinin birbirleri ile ilişkide olduğu bantlarda görülmektedir. GAPDH endojen protein kontrolü olarak kullanılmış ve protein miktarlarının her bir kuyuda eşit oldukları gösterilmiştir. (Şekil 25)

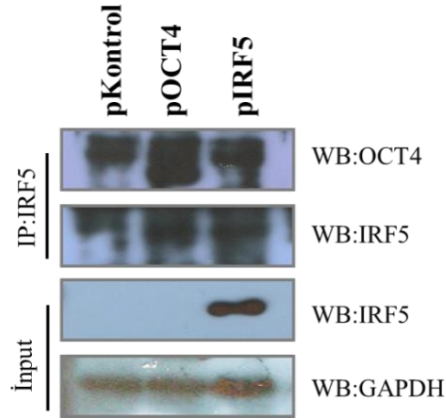


Şekil 25. OCT4 ile IP yapılan örneklerde OCT4 ve IRF5 protein ilişkisi.

IRF5 ile yapılan IP örneklerinde OCT4 ve IRF5 overekspresyonu yapılan hücreler karşılaştırıldığı zaman OCT4 bantlarının her iki blottada olduğu görülmektedir. Kontrol hücrelerinde de bu bantlar görülür ve IRF5 overekspresyon yapılanlarda bantlarında daha yoğun olduğu görülmektedir. Aynı şekilde örneklerin IRF5 bantları değerlendirildiği zaman kontrol grubuna göre bantlar daha yoğundur. Inputlarda IRF5 overekspresyon düzeyleri kontrol edildiği zaman yalnızca pIRF5 plazmidi ile overekspresyon yapılan örneklerde bant

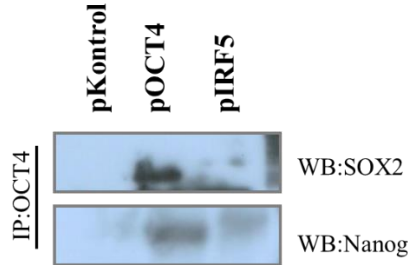


görülmektedir. GAPDH endojen protein olarak kullanılmış ve her bir kuyuda örneklerin eşit yüklendiği görülmektedir. (Şekil 26)



Şekil 26. IRF5 ile IP yapılan örneklerde OCT4 ve IRF5 protein ilişkisi.

Kök hücre faktörlerinden diğerleri Nanog ve SOX2 bantları IRF5 ve OCT4 overekspresyon yapılan hücrelerde OCT4 ile IP yapılan örneklerde kontrol edilmiştir. OCT4, IP yapılan örneklerinde etkileşimde olduğu Nanog ve SOX2 proteinlerinin PC3 hücrelerinde de olduğu görülmektedir. OCT4 proteinin diğer kök hücre faktörleri ile birlikte PC3 hücrelerinde ekspresyon yaparak hücrede çeşitli sinyallerin gerçekleşmesine katkıda bulunmuştur. (Şekil 27)



Şekil 27. OCT4 ile IP yapılan örneklerde SOX2 ve Nanog protein ilişkisi.

IP sonuçları bütünü ile değerlendirildiği zaman IRF5 ve OCT4 proteinleri birbirleri ile etkileşerek transkripsiyonda önemli rol oynar. İki proteinin birbirleri ile etkileşimde olması ve farklı bölgelerden bağlanmalar yaparak çeşitli fonksiyonları yerine getirmesi konusunda ileri analizlere ihtiyaç vardır.

## 5. TARTIŞMA

Prostat kanseri ileri yaşlarda erkeklerde sık görülen kanser türü olmasının yanı sıra erkeklerde ölüm oranları açısından da ikinci sıradadır. Prostat kanseri heterojenitesi çoğunlukla adenokarsinom olarak tanımlanır ve biyopsi örneklerinde çeşitli boyamalar ile türü saptanmaya çalışır. Bununla birlikte, kanda prostat spesifik antijen (PSA) testi yapılarak da prostat kanserinin teşhisi ve tedavide izlemi gerçekleştirilir. Prostat kanserinin farklı hücre türüne sahip olması sebebiyle hücresel değişiklikler ve moleküler mekanizmalar hastalık tanısının konulması açısından önemlidir. Andorjene bağımlı ve andorjenden bağımsız farklı prostat kanser hücrelerinin yapısal özelliklerinin farklılığı nedeniyle moleküler olarak hücresel yanıtları da farklılık gösterir. Özellikle androjenreseptörleri ekspre eden prostat kanser hücreleri için tedavide anti-androjenler kullanılırken, androjen reseptörü içermeyen prostat kanser hücreleri için bu tedavi uygun değildir. Prostat kanseri teşhisi konulduğu zaman, genellikle prostatın cerrahi eksizyonu, radyoterapi, kemoterapi, anti-androjen tedavi gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır. Son yıllarda tümör dokusunu küçültmek ve saptanamayan prostat kanser hücrelerini azaltmak için immunoterapi, gen tedavisi ve yenilikçi ilaç hedef tedavileri konusunda araştırmalar son yıllarda hız kazanmaktadır. Bu nedenle prostat kanserinde membranaspesifik proteinlerdeki değişiklik, hücre içerisinde proteinlerin birbiri ile etkileşimi ve transkripsiyon faktörlerinin hücresel değişiklikleri kontrol mekanizmaları tanı ve tedavinin geliştirilmesi açısından oldukça önem kazanmaktadır.

Prostat kanser hücreleri olarak bilinen ve androjen reseptörü bulunmayan PC3 hücreleri kök hücre olmasalar bile kök hücre özelliklerini taşıyan çeşitli faktörleri içermektedir. Bu hücreler kök hücre faktörü olarak bilinen Nanog, OCT4, SOX2, Lin28B ve Klf4 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini içermektedir (Kong ve ark 2010). Embriyonik kök hücre faktörleri olarak bilinen bu faktörlerin hücre farklılaşmasında rollerinin olduğu bilinirken kanserli hücrelerde bulunmaları ve bazı proteinler ile ilişkilerinin olduğunun tespit edilmesi son yıllarda kanser araştırmalarında önem kazanmıştır.

Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (OCT4) POU ailesinin bir üyesi olup, organizmada önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Organizmanın gelişiminde öneme sahip oynamakla birlikte yapılan çalışmalarda kanser kök hücrelerin gelişimi ve farklılaşmasında görevli olduğu (Cherepanova OA ve ark. 2016; Hu T ve ark. 2010), tümör hücrelerinde kemorezistans geliştirdiği de gösterilmiştir (Wang XQ ve ark. 2010; Linn DE ve ark. 2010). OCT4 düzeylerinin anormal ifadesinde özofagus, mide, meme, küçük olmayan

hücre, akciğer, prostat kanseri ve oral skuamöz hücreli karsinom gibi bazı malign tümörlerin gelişiminde ve başlamasında etkili olduğu bildirilmiştir(Ezeh UI ve ark. 2005; Chen YC ve ark. 2008).

Heptoselüler kanser hastaları (HCC) ile yapılan bir çalışmada kanser prognozükötüleştikçe OCT4 düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. HCC kanser hücre hatları kullanılarak OCT4 düzeyleri artırıldığı zaman hücrelerde metaztaz yeteneklerinin ve migrasyon düzeylerinin yükseldiği görülmüştür. Hep3B karaciğer kanser hücrelerinde OCT4 düzeyleri susturulduğu zaman kanser hücrelerinin büyümediği ve migrasyon yeteneklerinin azaldığı tespit edilmiştir (Wang Gve ark., 2018).

Biz çalışmamızda PC3 prostat kanser hücrelerinde OCT4 over ekspresyon yapılan örneklerde migrasyon düzeylerinin arttığını saptadık. Kontrol gruplarına göre daha hızlı bölünen, hızlı yayılan ve hücrelerdeki morfolojik değişikliklerde OCT4 protein ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin hücrenin büyüme eğilimini arttırdığını bulduk. Endometriozis hastaları ile yapılan bir klinik çalışmada sağlıklı gruba göre hastalarda OCT4 gen ve protein düzeylerinin yüksek olduğu ve endometrial hücrelerin migrasyonunda OCT4 ün etkili olduğu gösterilmiş veVimentin, Twist ve Slug proteinleri ile migrasyonun tetiklediği öne sürülmüştür (Chang JH ve ark. 2013). İnvazivservikal kanser dokuları ile normalservikal epitelyum dokuları ile yapılan başka bir çalışmada ise OCT4 düzeylerinin kanser hastalarının dokularında yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Hela ve SiHa hücrelerinde OCT4 düzeyleri indüklenmiş ve bu modifiye hücreler kullanılarak xenograft tümör modeli oluşturulmuştur. Tümör büyümesi karşılaştırıldığında Hela-OCT4 ve SiHa-OCT4 ile indüklenen tümörlerin boyutlarının daha büyük olduğu ve Ki-67 düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir (Wang YD ve ark. 2013). Endometriazis hastaları ile yapılan başka bir araştırmada ise OCT4 proteininin TGF-B ve TGF-B reseptörü üzerinde etkili olarak migrasyonu düzenlediği, Snail ve N-kaderin proteinlerininendojen OCT4 düzeylerini kontrol ettiği bildirilmiştir (Au HK ve ark. 2015).

Prostat kanseri ve OCT4 ile ilgili yapılan araştırmalara baktığımız zaman OCT4' ün prostat kanserinin prognozunda nasıl rol oynadığı tam olarak tespit edilememiştir. HPE, insan prostat epitel hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada öncelikli olarak embriyonik kök hücre belirteçleri olan Nanog, OCT4 ve SOX2 düzeylerinin bu hücrelerde yüksek olduğu görülmüştür. Bu hücrelerdenhTERT kullanılarakprogenitör hücre olan HPET prostat kanser kök hücreleri geliştirilmiştir. Araştırmada hemprogenitör hücre belirteçleri CD144, CD133 Nestin, C-kit ekspresyonununhemde OCT4, Nanog, SOX2 ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir (Gu G ve ark. 2007). Bu transkripsiyon faktörlerinin hücre ölümünden hücrenin

gelişimine kadar bir çok noktada moleküler anahtar özelliği gösterdikleri bildirilmiştir. Embriyonik kök hücre belirteci olan OCT4 için mesoderm ve endoderm aşamasında farklılaşmada başlatıcı rol oynarken, trophektoderm aşamasında ise downregüle olarak farklılaşmayı geriye çevirdiği bildirilmiştir (Niwa Hve ark., 2000). Prostat kanser hücrelerinde endojen OCT4 düzeyleri incelendiği en az ekspresyonun PC3 hücrelerinde olduğu bildirilmektedir. Bu konuda yapılan bir araştırmada OCT4 düzeylerinin DNA metil transferazlar (DNMT) tarafından kontrol edildiği öne sürülmüştür. PC3 hücrelerinde DNMT1 inhibitörü olan 5-Aza (5-Azacytidine) ile muamele edildiğinde OCT4 düzeylerinin artışına bağlı olarak migrasyonun arttığı ileri sürülmüştür. Aynı zamanda N-kaderin, Zeb2 ve Vimentin düzeylerinde değiştiği metilasyonda bu transkripsiyon faktörlerinin birbirleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lee E ve ark. 2016).

İnterferonlar, patojenlere karşı hücre savunma sistemleri tarafından salgılanan glikoproteinlerdir. Bu proteinler, hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmasına bağlı olarak Tip I, Tip II ve Tip III IFN' ler olmak üzere üç gruba ayrılır. IFN' ler, çok çeşitli hücre tiplerini etkileyen ve virüs enfeksiyonunu baskılayan proteinler olmasının yanı sıra kanser tedavisinde kullanılması ile ilgili olarak güncel araştırmalar yaygınlaşmaktadır (Minn 2015). İnterferonların salınımı hücre içinde interferon düzenleyici faktörler olarak bilinen IRF'ler tarafından kontrol edilir. IRF5 bir transkripsiyon faktörü olup tip 1 IFN genlerinin aktivasyonunu gerçekleştirir (Yanai H ve ark 2007). IRF5 çeşitli inflamatuarsitokinleri, bazı tümör baskılayıcı genleri uyarmakta ve antiviralaktivitesinde olduğu bildirilmektedir (Barnes ve ark 2002). IRF5 için tip1 interferonlar üzerinde etki göstermesi kanser araştırmalarında çeşitli proteinler üzerinde de farklı etki mekanizmalarını etkileyebileceği öne sürülmektedir. IRF5 yapısal olarak fosforilasyon bölgesi ve DNA ya bağlanma bölgesi içeren bir transkripsiyon faktörü olup bazı genlerin transkripsiyonları üzerinde etkilidir. Stoplazmadafosforilekalde bulunduğu zamanda çeşitli proteinler ile etkileşimde bulunacağı ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. İnterferonregülatör faktör proteinleri çoğunluklap300/CBP proteinine bağlanarak çeşitli transkripsiyon mekanizmalarında rol oynadığı ve bazı genlerin aktivasyonu/inhibisyonunu düzenlediği bilinmektedir (Brian K ve ark. 1998). IRF5 transkripsiyon faktöründe CBP/p300 dimerizasyonunu gerçekleştirerek bağlanmayı gerçekleştirir ve DNA da konformasyonu değiştirerek diğer faktörlerin bağlanmasını kolaylaştırır. Virüs ile infekte BJAB hücrelerinde (B-celllymphomacellline) IRF5 ve IRF7'nin hedef proteinleri konusunda yapılan araştırmada p300/CBP proteinleri ile etkileşen faktörlerin hücre farklılaşmasında rol oynayan faktörler ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Barnes B ve ark. 2004). İnterferon gamma' nın p300/CBP bağlanma bölgesi

aracılığı ile STAT1 tarafından etki göstererek anti-viral etki gösterdiği tespit edilmiştir (Jue J ve ark. 1996). STAT proteinleri çekirdek ile sitoplazma arasında çeşitli sinyallerin iletimini gerçekleştirerek kanser regülasyonunda önemli role sahip transkripsiyon faktörleridir. Kanserlerde hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasının kontrol edilebilmesi için kök hücre faktörleri ile STAT proteinlerinin ilişkileri konusunda yapılan araştırmalar son yıllarda önem kazanmaktadır. Embriyonik kök hücre kültürü yapılarak OCT4'ün STAT3 proteini tarafından kontrol edildiği ve JAK/STAT yolağını kullanarak farklılaşma sürecinde etkili olduğu gösterilmiştir (Dang VD ve ark. 2013). Bu bağlamda STAT3 proteini ve interferon regülatör faktörler arasında ilişkisi olup olmadığı konusunda yapılan çalışmalarda IRF7, IRF5, IRF5 proteinlerinin STAT1, STAT3 proteinleri ile etkileşime girdiği ve transkripsiyon kompleks oluşumunda tip 1 interferonları kontrol ettiği öne sürülmüştür (Dimitris T ve Tom M 1995; Paula M ve ark 1995). Bu bilgiler ışığında IRF5 p300/CBP proteinleri ve STAT proteinleri ile etkileşime girip çeşitli kök hücre faktörlerini bu yolla kontrol ediyor olabilir.

Literatürde IRF proteinlerinin kök hücre faktörleri ile ilişkisi konusunda kısıtlı sayıda araştırma vardır. İnterferon regülatör faktör-7 (IRF7)'nin HFF1 insan normal meme hücrelerinde kök hücre faktörlerinden OCT4, SOX2 ve Nanog ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Normal meme hücrelerinde yapılan mikroarray sonuçlarına göre kök hücre faktörleri ile TLR sinyal yolağında görevli olan transkripsiyon faktörlerinin adezyonun yeniden programlanmasında etkili olduğu öne sürülmüştür (Cai Y ve ark. 2015). Bu tez çalışmasında OCT4 over ekspresyon yapılan hücrelerde OCT4 proteininin IRF5 proteini ile etkileşim yaptığı tespit edilmiştir. IRF5 over ekspresyon yapılan örneklerde hem kontrol hemde OCT4 aşırı ekspresyon edilen hücrelerinde de etkileştiği tespit edilmiştir. Prostat kanserinde IRF5 proteininin OCT4 proteininin ekspresyonu üzerinde değişiklik yapıp yapmadığı konusunda ileri analizlere ihtiyaç vardır. Fakat iki proteinin birbiri ile etkileşim içerisinde olduğu ve bunu ortak kullanılan sinyal yolları ilişkili proteinler ile gerçekleştirebildikleri immunopresipitasyon deneyleri ile gösterilmiştir. Prostat kanserin tedavisinde hücrenin migrasyon yeteneğinin azaltılması ve endojen olarak salınan proteinler ile yeni biyobelirteçlerin bulunması ve hedef terapötiklerin geliştirilmesi konusunda bu araştırma gelecekte yapılacak olan çalışmalara öncülük edebilir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmasında IRF5 ve OCT4 proteinlerinin PC3 insan prostat kanser hücreleri hücrelerinde etkileşime girdikleri aşırı protein ifadesi yapılarak immunopresipitasyon deneyleri ile gösterilmiştir. Prostat kanserinde IRF5 ve OCT4 ilişkisinin daha detaylı araştırılması ve bu konuda farklı proteinler ile etkileşimleri konusunda ileri çalışmalar yapılması yeni tedavilerin ortaya çıkması hususunda destek sağlayabilir. Bu projede elde edilen bulgular ile yeni sinyal yollarının aydınlatılması ileride prostat kanseri tanı ve tedavisi için yeni ilaç veya tedavi uygulamalarının geliştirilmesine fayda sağlayabilir.

## KAYNAKLAR

**Abate-Shen C, Shen MM, Gelmann E.** Integrating differentiation and cancer: The Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation* 2008, 76:717–727.

**Abate-Shen C, Shen MM.** Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development* 2000, 14:2410–2434.

**Adachi K, Suemori H, Yasuda Sh, Nakatsuji N, Kawase E.** Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells* 2010, 15:455–469.

**Adam RM, Mukhopadhyay NK, Kim J, Di Vizio D, Cinar B, Boucher K, et al.** Cholesterol sensitivity of endogenous and myristoylated Akt. *Cancer Research* 2007, 67:6238–6246.

**Aghemo A, Rumi MG, Colombo M.** Pegylated interferons alpha2a and alpha2b in the treatment of chronic hepatitis C. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2010, 7:485–494.

**Ahn SH, Lee HW, Kim YS, Kim JK, Han KH, Chon CY, et al.** Recombinant interferon-Beta-1alpha plus ribavirin for the treatment of chronic HCV infection: a prospective, randomized, comparative pilot study. *Gut and Liver* 2009, 3:20–25.

**Andersen RJ, Mawji NR, Wang J, Wang G, Haile S, Myung JK, et al.** Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer Cell* 2010, 17:535–546.

**Andrews PW, Banting G, Damjanov I, Arnaud D, Avner P.** Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma* 1984, 3: 347–361.

**Au HK, Chang JH, Wu YC, Kuo YC, Chen YH, Lee WC, et al.** TGF- $\beta$ I Regulates Cell Migration through Pluripotent Transcription Factor OCT4 in Endometriosis. *PLoS One*. 2015, 16;10:e0145256.

**Avilion A, Nicolis S.K, Pevny L.H, et al** Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*. 2003; 17: 126–140.

**Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, et al.** Molecular genetics of prostate cancer EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *Journal of Clinical Oncology* 2006, 24:268–273.

**Balan V, Nelson DR, Sulkowski MS, Everson GT, Lambiase LR, Wiesner RH, et al.** A Phase I/II study evaluating escalating doses of recombinant human albumin-interferon-alpha fusion protein in chronic hepatitis C patients who have failed previous interferon-alpha-based therapy. *Antiviral Therapy* 2006, 11:35–45.

- Banach-Petrosky W, Ouyang X, Gao H, Nader K, Ji Y, Suh N, et al.** Vitamin D inhibits the formation of prostatic intraepithelial neoplasia in Nkx3.1;Pten mutant mice. *Clinical Cancer Research* 2006, 12:5895–5901.
- Bardia A, Platz EA, Yegnasubramanian S, De Marzo AM, Nelson WG.** Anti-inflammatory drugs, antioxidants, and prostate cancer prevention. *Current Opinion in Pharmacology* 2009, 9:419–426.
- Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE & Pitha PM.** Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Molekular and Cellular Biology* 2002, 22:5721–5740.
- Barnes BJ, Moore PA & Pitha PM.** Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon  $\alpha$  genes. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276:23382–23390.
- Barnes BJ, Richards J, Mancl M, Hanash S, Beretta L, Pitha PM.** Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during in nateresponsetoviralinfection. *The Journal of Biological Chemistry* 2004, 279:45194-207.
- Berruti A, Mosca A, Porpiglia F, Bollito E, Tucci M, Vana F, et al.** Chromogranin A expression in patients with hormone naive prostate cancer predicts the development of hormone refractory disease. *The Journal of Urology* 2007, 178:838–843
- Bethel CR, Chaudhary J, Anway MD, Brown TR.** Gene expression changes are age-dependent and lobe-specific in the brown Norway rat model of prostatic hyperplasia. *The Prostate* 2009, 69:838–850.
- Bethel CR, Faith D, Li X, Guan B, Hicks JL, Lan F, et al.** Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intra-epithelial neoplasia, and adenocarcinoma: Association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Research* 2006, 66: 10683–10690.
- Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, et al.** Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes & Development* 1999, 13:966–977.
- Blum DL, Koyama T, M’Koma AE, Iturregui JM, Martinez-Ferrer M, Uwamariya C, et al.** Chemokine markers predict biochemical recurrence of prostate cancer following prostatectomy. *Clinical Cancer Research* 2008, 14:7790–7797.
- Boasso A.** Type I Interferon at the Interface of Antiviral Immunity and Immune Regulation: The Curious Case of HIV-1. *Scientifica* 2013, 2013:580968.
- Boormans JL, Hermans KG, van Leenders GJ, Trapman J, Verhagen PC.** An activating mutation in AKT1 in human prostate cancer. *International Journal of Cancer* 2008, 123:2725–2726.
- Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM, et al.** Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer* 2000, 89:123–134.



**Bracarda S, Porta C, Boni C, Santoro A, Mucciarini C, Pazzola A, et al.** Could interferon still play a role in metastatic renal cell carcinoma? A randomized study of two schedules of sorafenib plus interferonalph 2a (RAPSODY). *European Urology* 2013, 63:254–261.

**Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Vlotides G, et al.** SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 331:543–548.

**Brian K, Weaver BK, Kumar KP and Nancy NC.** Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Molecular and Cellular Biology* 1998, 18:1359-1368

**Cai Y, Dai X, Zhang Q, Dai Z.** Gene expression of OCT4, SOX2, KLF4 and MYC (OSKM) induced pluripotent stem cells: identification for potential mechanisms. *Diagnostic Pathology* 2015, 24;10:35

**Capasso LL.** Antiquity of cancer. *International Journal of Cancer* 2005, 113:2–13.

**Castro P, Giri D, Lamb D, Ittmann M.** Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate* 2003, 55:30–38.

**Cavaleri F, Schöler H.** Molecular Bases of Pluripotency. *Essentials of Stem Cell Biology. Lanza R (Ed.), San Diego, USA, Academic Press, 2009; 39-60.*

**Cevik O, Li D, Baljinnnyam E, Manvar D, Pimenta EM, Waris G, et al.** Interferon regulatory factor 5 (IRF5) suppresses hepatitis C virus (HCV) replication and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry* 2017, 292: 21676-21689. doi: 10.1074/jbc.M117.792721.

**Chambers I, Colby D, Robertson M, et all.** Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003, 113:643–655.

**Chang JH, Au HK, Lee WC, Chi CC, Ling TY, Wang LM, et al.** Expression of the pluripotent transcription factor OCT4 promotes cell migration in endometriosis. *Fertility Sterility* 2013, 99:1332-1339.e5.

**Chen H, Tu SW, Hsieh JT.** Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280:22437–22444.

**Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M, Duncan C, Sharifi R, Ghosh L, van Breemen R, et al.** Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *Journal of the National Cancer Institute* 2001, 93:1872–1879.

**Chen Y, Clegg NJ, Scher HI.** Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: New agents for an established target. *The Lancet Oncology* 2009, 10:981–991.

- Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, et al.** Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* 2008, 3:e2637.
- Chen Z, Koeneman KS, Corey DR.** Consequences of telomerase inhibition and combination treatments for the proliferation of cancer cells. *Cancer Research* 2003, 63:5917–5925.
- Cherepanova OA, Gomez D, Shankman LS, Swiatlowska P, Williams J, Sarmiento OF, et al.** Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is athero protective. *NatMed* 2016, 22:657–665.
- Clark J, Attard G, Jhavar S, Flohr P, Reid A, De-Bono J, et al.** Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene* 2008, 27:1993–2003.
- Clark J, Merson S, Jhavar S, Flohr P, Edwards S, Foster CS, et al.** Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 2007, 26:2667–2673.
- Dang VD, Jun U, Daniel MM, Chanchao L, Yi Z, Bo F, et al.** A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4–NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes & Development* 2013, 27:1378–1390.
- Deeb KK, Trump DL, Johnson CS.** Vitamin D signalling pathways in cancer: Potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 2007, 7:684–700.
- DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. 2003.** Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 2003, 361:955–964.
- DeWeese TL, Hruszkewycz AM, Marnett LJ.** Oxidative stress in chemoprevention trials. *Urology* 2001, 57:137–140.
- Dideberg V, et al.** An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Human Molecular Genetics* 2007, 16:3008–3016.
- Dimitris T and Tom M.** Virus induction of human IFN $\beta$  gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 1995, 83:1091–1100
- Dong B, Kim S, Hong S, Das Gupta J, Malathi K, Klein EA, et al.** An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, 104:1655–1660.
- Doyle SE, Schreckhise H, Khuu-Duong K, Henderson K, Rosler R, Storey H, et al.** Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes. *Hepatology* 2006, 44:896–906.
- Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW.** Surface antigens of human embryonic stem cells: Changes upon differentiation in culture. *Journal of Anatomy* 2002, 200:249–258.

- Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyns C, Kotenko SV, Renauld JC.** Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 2004, 279:32269–32274.
- Dunn JE.** Cancer epidemiology in populations of the United States—with emphasis on Hawaii and California—and Japan. *Cancer Research* 1975, 35:3240–3245.
- Epstein JI.** An update of the Gleason grading system. *The Journal of Urology* 2010, 183:433–440.
- Escalante CR, Nistal-Villan E, Shen L, Garcia-Sastre A & Aggarwal AK.** Structure of IRF-3 bound to the PRDIII-I regulatory element of the human interferon- $\beta$  enhancer. *Molecular Cell* 2007, 26:703–716.
- Escalante CR, Yie J, Thanos D & Aggarwal AK.** Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature* 1998, 391:103–106.
- Evan GI, d’Adda di Fagagna F.** Cellular senescence: Hot or what? *Current Opinion in Genes & Development* 2009, 19:25–31.
- Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. *Nature* 1981, 292:154–156.
- Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA and Clark AT.** Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005, 104:2255–2265.
- Fizazi K.** The role of Src in prostate cancer. *Annals of Oncology* 2007, 18: 1765–1773.
- Funayama R, Ishikawa F.** Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* 2007, 116:431–440.
- Gad HH, Dellgren C, Hamming OJ, Vends S, Paludan SR, Hartmann R.** Interferon-lambda is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family. *The Journal of Biological Chemistry* 2009, 284:20869–20875.
- Gonzalez-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E.** Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature reviews Immunology* 2012, 12:125–135.
- Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, Clarke CJ.** IFN $\gamma$  signaling—does it mean JAK-STAT? *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2008, 19:383–394
- Graham RR et al.** A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics* 2006, 38:550–555.
- Grignon DJ.** Unusual subtypes of prostate cancer. *Modern Pathology* 2004, 17:316–327.
- Grisanzio C, Signoretti S.** p63 in prostate biology and pathology. *Journal of Cellular Biochemistry* 2008, 103:1354–1368.

**Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A.** The discovery of receptor tyrosine kinases: Targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2004, 4:361–370.

**Gu G, Yuan J, Wills M and Kasper S.** Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. *Cancer Research* 2007, 67:4807–4815.

**Gurel B, Iwata T, Koh CM, Jenkins RB, Lan F, Van Dang C, et al.** Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Modern Pathology* 2008, 21:1156–1167.

**Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, et al.** Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002, 20: 329–337.

**Higgins B, Thompson IM.** The prostate cancer prevention trial: Current status. *The Journal of Urology* 2004, 171: 15–18. doi: 10.1097/01.ju.0000107440.15626.11.

**Holcomb IN, Grove DI, Kinnunen M, Friedman CL, Gallaher IS, Morgan TM, et al.** Genomic alterations indicate tumor origin and varied metastatic potential of disseminated cells from prostate cancer patients. *Cancer Research* 2008, 68:5599–5608.

**Honda K & Taniguchi T.** IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews. Immunology* 2006, 6:644–658.

**Honda K, Takaoka A and Taniguchi T.** Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 2006, 25: 349–60.

**Hu G & Barnes, BJ.** Interferon regulatory factor-5-regulated pathways as a target for colorectal cancer therapeutics. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2006, 6:775–784.

**Hu G, Mancl ME & Barnes BJ.** Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death. *Cancer Research* 2005, 65:7403–7412.

**Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y and Sun S.** Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Research* 2008, 68:6533–6540.

**Humphrey PA.** Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *Journal of Clinical Pathology* 2007, 60:35–42.

**Inoue K, Watanabe T, Yamada M, Yoshikumi H, Ogawa O, Yoshida M.** Efficacy of interferon Beta combined with cyclosporine induction and intensified therapy for retreatment of chronic hepatitis C. *Transplantation Proceedings* 2009, 41:246–249.

**Ishikawa T, Kubota T, Abe H, Nagashima A, Hirose K, Togashi T, et al.** Efficacy of the regimen using twice-daily beta-interferon followed by the standard of care for chronic hepatitis C genotype 1b with high viral load. *Hepatology Research* 2012, 42:864–869.

**Ismail A, Yusuf N.** Type I Interferons: Key Players in Normal Skin and Select Cutaneous Malignancies. *Dermatology Research and Practice* 2014, 2014:847545.

- Ivashkiv LB, Donlin LT.** Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews Immunology* 2014, 14:36–49.
- Johnson HM, Noon-Song EN, Dabelic R, Ahmed CM.** IFN signaling: how a non-canonical model led to the development of IFN mimetics. *Frontiers in Immunology* 2013, 4:202.
- Johnson-Ansah H, Guilhot J, Rousselot P, Rea D, Legros L, Rigal-Huguet F, et al.** Tolerability and efficacy of pegylated interferon-alpha-2a in combination with imatinib for patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2013, 119:4284–4289.
- Joshua AM, Vukovic B, Braude I, Hussein S, Zielenska M, Srigley Jet al.** Telomere attrition in isolated high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and surrounding stroma is predictive of prostate cancer. *Neoplasia* 2007, 9:81–89.
- Jue J, Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravati D, Horvath CM, et al.** Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proceedings of the National Academy of Science* 1996, 93:15092-15096
- Kader AK, Sun J, Isaacs SD, Wiley KE, Yan G, Kim ST, et al.** Individual and cumulative effect of prostate cancer risk-associated variants on clinicopathologic variables in 5,895 prostate cancer patients. *The Prostate* 2009, 69:1195–1205.
- Kalaany NY, Sabatini DM.** Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction. *Nature* 2009, 458:725–731.
- Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F et all.** Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *The Embo Journal* 1983, 2:2355-2361.
- Kay M, Hojati Z, Dehghanian F.** The molecular study of IFNbeta pleiotropic roles in MS treatment. *Iranian Journal of Neurology* 2013, 12:149–156.
- Ke XS, Qu Y, Rostad K, Li WC, Lin B, Halvorsen OJ, et al.** Genome-wide profiling of histone h3 lysine 4 and lysine 27 trimethylation reveals an epigenetic signature in prostate carcinogenesis. *PLoS ONE* 2009, 4:e4687. doi: 10.1371/journal.pone.0004687.
- Kirsh VA, Hayes RB, Mayne ST, Chatterjee N, Subar AF, Dixon LB, et al.** Supplemental and dietary vitamin E, b-carotene, and vitamin C intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 2006, 98:245–254.
- Knowles BB, Aden DP, Solter D.** Monoclonal antibody detecting a stage-specific embryonic antigen (ssea-1) on preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma cells. *Current Topics Microbiology and Immunology* 1978, 81: 51–53.
- Knudsen KE, Scher HI.** Starving the addiction: New opportunities for durable suppression of AR signaling in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2009, 15:4792–4798.
- Koeneman KS, Pan CX, Jin JK, Pyle JMIII, Flanigan RC, Shankey TV, et al.** Telomerase activity, telomere length, and DNA ploidy in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *The Journal of Urology* 1998, 160:1533–1539.

- Kolonel LN.** Fat, meat, and prostate cancer. *Epidemiol Reviews* 2001, 23:72–81.
- Komiya A, Suzuki H, Imamoto T, Kamiya N, Nihei N, Naya Y, et al.** Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *International Journal of Urology* 2009, 16:37–44.
- Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Wang Z, Sethi S, et al.** Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One*, 2010, 5:e12445.
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al.** IFN- $\lambda$  mediates antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology* 2003, 4:69–77.
- Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. 1,** Ankara: *Türkiye Bilimler Akademisi*, 2009.
- Kraus S, Gioeli D, Vomastek T, Gordon V, Weber MJ.** Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) and Src regulate the tyrosine phosphorylation and function of the androgen receptor. *Cancer Research* 2006, 66:11047–11054.
- Kristjansdottir G. et al.** Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations. *Journal of Medical Genetics* 2008, 45:362–369.
- Lavanchy D.** Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis* 2004, 11:97–107.
- Lee E, Wang J, Yumoto K, Jung Y, Cackowski FC, Decker AM, et al.** DNMT1 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells, Which Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Neoplasia* 2016, 18:553-66.
- Lee SH, Poulogiannis G, Pyne S, Jia S, Zou L, Signoretti S, et al.** A constitutively activated form of the p110 $\beta$  isoform of PI3-kinase induces prostatic intraepithelial neoplasia in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, 107:11002–11007.
- Leversha MA, Han J, Asgari Z, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, et al.** Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2009, 15:2091–2097.
- Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ.** Prostate-specific antigen and prostate cancer: Prediction, detection and monitoring. *Nature Reviews Cancer* 2008, 8:268–278.
- Lin R, Heylbroeck C, Pitha, PM & Hiscott J.** Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Molecular and Cellular Biology* 1998, 18:2986–2996.
- Lin R, Mamane Y & Hiscott J.** Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275:34320–34327.

**Lin R, Mamane Y. & Hiscott J.** Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Molecular and Cellular Biology* 1999, 19:2465–2474.

**Linn DE, Yang X, Sun F, Xie Y, Chen H, Jiang R, et al.** A role for OCT4 in tumor initiation of drug-resistant prostate cancer cells. *Genes & Cancer* 2010, 1:908-916.

**Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, et al.** Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: The selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *JAMA* 2009, 301:39–51.

**Liu MQ, Zhou DJ, Wang X, Zhou W, Ye L, Li JL, et al.** IFN-lambda3 inhibits HIV infection of macrophages through the JAK-STAT pathway. *PloS One* 2012, 7:e35902.

**Liu W, Laitinen S, Khan S, Vihinen M, Kowalski J, Yu G, et al.** Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nature Medicine* 2009,15:559–565.

**Logothetis CJ, Lin SH.** Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nature Reviews Cancer* 2005, 5:21–28.

**Lohoff M. and Mak TW.** Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 2005. 5:125-35.

**Mancl ME et al.** Two discrete promoters regulate the alternatively spliced human interferon regulatory factor-5 isoforms. Multiple isoforms with distinct cell type-specific expression, localization, regulation, and function. *Journal of Biological Chemistry* 2005, 280:21078–21090.

**Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, et al.** Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clinical Infectious Diseases* 2004, 39:692–699.

**Maroto JP, del Muro XG, Mellado B, Perez-Gracia JL, Andres R, Cruz J, et al.** Phase II trial of sequential subcutaneous interleukin-2 plus interferon alpha followed by sorafenib in renal cell carcinoma (RCC). *Clinical & Translational Oncology* 2013, 15:698–704.

**Martin GR.** Isolation of a pluripotent cell line from early Mouse embryo cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1981;78:7634–7638.

**Maruyama M, Ichisaka T, Nakagawa M. & Yamanaka S.** Differential roles for Sox15 and SOX2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *The Journal Of Biological Chemistry*.2005, 280:24371– 24379 .

**Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et all.** Pluripotency governed by SOX2 via regulation of OCT3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* 2007, 9:625–635.

- Melichar B, Bracarda S, Matveev V, Alekseev B, Ivanov S, Zyryanov A, et al.** A multinational phase II trial of bevacizumab with low-dose interferon-alpha2a as first-line treatment of metastatic renal cell carcinoma: BEVLiN. *Annals of Oncology* 2013, 24:2396–2402.
- Min J, Zaslavsky A, Fedele G, McLaughlin SK, Reczek EE, De Raedt T, et al.** An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kB. *Nature Medicine* 2010, 16:286–294.
- Minelli A, Bellezza I, Conte C, Culig Z.** Oxidative stress-related aging: A role for prostate cancer? *Biochimica Biophysica Acta* 2009, 1795:83–91.
- Minn AJ.** Interferons and the Immunogenic Effects of Cancer Therapy. *Trends in Immunology* 2015, 36:725-737.
- Misery L.** Therapeutic perspectives in atopic dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2011, 41:267–271.
- Mitsui K, Takuzawa Y, Itoh H, et al.** The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003, 113: 631–642.
- Moore PS, et al.** Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science* 1996, 274: 1739-44.
- Mori T et al.** Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* 2002, 21:2914–2918.
- Morse MA, Whelan M.** A year of successful cancer vaccines points to a path forward. *Current opinion in molecular therapeutics* 2010, 12:11–13.
- Nelson WG, De Marzo AM, Yegnasubramanian S.** Epigenetic alterations in human prostate cancers. *Endocrinology* 2009, 150:3991–4002.
- Nelson WG, Yegnasubramanian S, Agoston AT, Bastian PJ, Lee BH, Nakayama M, et al.** Abnormal DNA methylation, epigenetics, and prostate cancer. *Frontiers in Bioscience* 2007, 12:4254–4266.
- Nelson WG.** Prostate cancer prevention. *Current Opinion in Urology* 2007, 17:157–167.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al.** Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor OCT4. *Cell* 1998, 95: 379–391.
- Ning S, Pagano JS and Barber GN.** IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes and Immunity*. 2011, 12:399-414.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG.** Quantitative expression of OCT-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cell. *Nature Genetics* 2000, 24: 372–6.
- Niwa H.** How is pluripotency determined and maintained? *Development* 2007, 134: 635–646.



- Ohuri M, Wheeler TM, Scardino PT.** The New American Joint Committee on Cancer and International Union Against Cancer TNM classification of prostate cancer. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994, 74:104–114.
- Okita K, Ichisaka, T, Yamanaka S.** Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007, 448:313–317.
- Okumura-Nakanishi N, Saito M, Niwa H, Ishikawa F.** OCT-3/4 and SOX2 Regulate OCT-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *The Journal Of Biological Chemistry*.2005, 280:5307–5317.
- Özel HB, Ozan E, Dabak Ö.** Embriyonik kök hücreler. *Turkish Journal of Medical Science*, 2008, 28:333-341.
- Panne D, Maniati T & Harrison, SC.** Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon- $\beta$  enhancer. *The EMBO Journal*. 2004, 23:4384–4393.
- Panne D, Maniatis T & Harrison SC.** An atomic model of the interferon- $\beta$  enhanceosome. *Cell* 2007, 129:1111–1123.
- Parisi S, Passaro F, Aloia L, et al.** Klf5 is involved in self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* 2008, 121:2629–2634.
- Paula M, Pitha PC, Au WC, Lowther W, Yuang YT, Schafera L, et al.** Role of the interferon regulatory factors (IRFs) in virus-mediated signaling and regulation of cell growth. *Biochimie* 1998, 80:651-658.
- Paun A & Pitha PM.** The IRF family, revisited. *Biochimie* 2007, 89, 744–753.
- Peehl DM.** Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocrine Related Cancer* 2005, 12:19–47.
- Petrylak DP.** New paradigms for advanced prostate cancer. *Reviews in Urology* 2007, 9:S3–S12.
- Ploussard G, de la Taille A.** Urine biomarkers in prostate cancer. *Nature Review Urology* 2010, 7:101–109.
- Poliseno L, Salmena L, Riccardi L, Fornari A, Song MS, Hobbs RM, et al.** Identification of the miR-106b;25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Science Signaling* 2010a, 3:ra29. doi: 10.1126/scisignal.2000594.
- Pomerantz MM, Beckwith CA, Regan MM, Wyman SK, Petrovics G, Chen Y, et al.** Evaluation of the 8q24 prostate cancer risk locus and MYC expression. *Cancer Research* 2009, 69:5568–5574.
- Pritchard C, Mecham B, Dumpit R, Coleman I, Bhattacharjee M, Chen Q, et al.** Conserved gene expression programs integrate mammalian prostate development and tumorigenesis. *Cancer Research* 2009,69:1739–1747.

- Qin BY, et al.** Crystal structure of IRF-3 in complex with CBP. *Structure* 2005, 13:1269–1277.
- Qin BY, et al.** Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nature Structural Biology* 2003, 10:913–921.
- Rini BI, Bellmunt J, Clancy J, Wang K, Niethammer AG, Hariharan S, et al.** Randomized phase III trial of temsirolimus and bevacizumab versus interferon alfa and bevacizumab in metastatic renal cell carcinoma: INTORACT trial. *Journal of Clinical Oncology* 2014, 32:752–759.
- Robek MD, Boyd BS, Chisari FV.** Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *Journal of virology.* 2005; 79:3851–3854.
- Roff SR, Noon-Song EN, Yamamoto JK.** The Significance of Interferon-gamma in HIV-1 Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis. *Frontiers in Immunology* 2014, 4:498.
- Rommer PS, Stuve O.** Management of secondary progressive multiple sclerosis: prophylactic treatment-past, present, and future aspects. *Current Treatment Options in Neurology.* 2013; 15:241–258.
- Russo JJ, et al.,** Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1996, 93:14862-7.
- Sağsöz H, Ketani MA.** Kök hücreler. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2008, 1: 29-33.
- Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D.** Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine* 2010, 50:1–14
- Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP.** Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 2008, 133:403–414.
- Saramaki OR, HarjulaAE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T.** TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clinical Cancer Research* 2008,14:3395–3400.
- Saramaki OR, Tammela TL, Martikainen PM, Vessella RL, Visakorpi T.** The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2006, 45:639–645.
- Sato K, Qian J, Slezak JM, Lieber MM, Bostwick DG, Bergstralh EJ, et al.** Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1999, 91:1574–1580.
- Sato M, Tanaka N, Hata N, Oda E. & Taniguchi T.** Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN- $\beta$  gene. *FEBS Letters* 1998, 425:112–116.
- Savan R, Ravichandran S, Collins JR, Sakai M, Young HA.** Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009, 20:115–124.

**Scher HI, Beer TM, Higano CS, Anand A, Taplin ME, Efstathiou E, et al.** Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: A phase 1–2 study. *Lancet* 2010, 375:1437–1446.

**Schoenemeyer A et al.** The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280:17005–17012.

**Schopperle WM and DeWolf WC.** The tra-1-60 and tra-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma. *Stem Cells* 2007, 25: 723–730.

**Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA.** Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 2004, 75:163–189.

**Shah RB, Mehra R, Chinnaiyan AM, Shen R, Ghosh D, Zhou M, et al.** Androgen-independent prostate cancer is a heterogeneous group of diseases: Lessons from a rapid autopsy program. *Cancer Research* 2004, 64:9209–9216.

**Shamblott MJ, Axelman, J, Wang S, et al.** Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*.1998; 95: 13726–13731.

**Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al.** Prostate pathology of genetically engineered mice: Definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Research* 2004, 64:2270–2305.

**Sharma S, et al.** Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003, 300:1148–1151.

**Shaw A, Gipp J, Bushman W.** The Sonic Hedgehog pathway stimulates prostate tumor growth by paracrine signaling and recapitulates embryonic gene expression in tumor myofibroblasts. *Oncogene* 2009, 28:4480–4490.

**Shen MM, Abate-Shen C.** Pten inactivation and the emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Research* 2007, 67:6535–6538.

**Shevinsky LH, Knowles BB, Damjanov I et al.** Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human terato- carcinoma cells. *Cell* 1982, 30:697-705.

**Shiraishi T, Watanabe M, Matsuura H, Kusano I, Yatani R, Stemmermann GN.** The frequency of latent prostatic carcinoma in young males: The Japanese experience. *In Vivo* 1994, 8:445–447.

**Sigurdsson S. et al.** Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *American Journal of Human Genetics* 2005, 76:528–537 (2005).

**Simonsson B, Gedde-Dahl T, Markevarn B, Remes K, Stentoft J, Almqvist A, et al.** Combination of pegylated IFN-alpha2b with imatinib increases molecular response rates

in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. *Blood* 2011, 118:3228–3235.

**Solter D, Knowles BB.** Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (ssea-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1978, 75: 5565–5569.

**Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T.** IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathogens*. 2008; 4:e1000017.

**Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, et al.** Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 2009, 457:910–914.

**Stetson DB and Medzhitov R.** Type I interferons in host defense. *Immunity* 2006, 25:373–381.

**Sulkowski MS, Cooper C, Hunyady B, Jia J, Ogurtsov P, Peck-Radosavljevic M, et al.** Management of adverse effects of Peg-IFN and ribavirin therapy for hepatitis C. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2011, 8:212–223.

**Sun T, Wang Q, Balk S, Brown M, Lee GS, Kantoff P.** The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Cancer Research* 2009, 69:3356–3363.

**Takahashi K. et al.** X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nature Structural Biology* 2003, 10:922–927.

**Takaoka A et al.** Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005, 434:243–249.

**Talpaz M, Hehlmann R, Quintas-Cardama A, Mercer J, Cortes J.** Re-emergence of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2013, 27:803–812.

**Tamura T, Yanai H, Savitsky D & Taniguchi T.** The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual Reviews Immunology* 2008, 26:535–584.

**Tanaka M, Komuro I, Inagaki H, Jenkins NA, Copeland NG, Izumo S.** Nkx3.1, a murine homolog of *Drosophila* bagpipe, regulates epithelial ductal branching and proliferation of the prostate and palatine glands. *Dev Dyn* 2000, 219:248–260.

**Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al.** Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010, 18:11–22.

**Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH.** Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annual review of immunology* 2005, 23:307–336.

**Tian RR, Guo HX, Wei JF, Yang CK, He SH, Wang JH.** IFN-lambda inhibits HIV-1 integration and posttranscriptional events in vitro, but there is only limited in vivo repression of viral production. *Antiviral Research* 2012, 95:57–65

**Timms BG.** Prostate development: A historical perspective. *Differentiation* 2008, 76:565–577.

**Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM, et al.** Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nature Genetics* 2007, 39:41–51.

**van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR.** Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 2006, 25:361–372.

**Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, et al.** Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008, 322:1695–1699.

**Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al.** The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002, 419:624–629.

**Veals SA, et al.** Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology* 1992, 12:3315-24.

**Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al.** A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103:2257–2261.

**Vukovic B, Park PC, Al-Maghrabi J, Beheshti B, Sweet J, Evans A, et al.** Evidence of multifocality of telomere erosion in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HPIN) and concurrent carcinoma. *Oncogene* 2003, 22:1978–1987.

**Wang G, Wang J, Sadar MD.** Crosstalk between the androgen receptor and  $\beta$ -catenin in castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Research* 2008, 68:9918–9927.

**Wang G, Zhou H, Gu Z, Gao Q, Shen G.** Oct4 promotes cancer cell proliferation and migration and leads to poor prognosis associated with the survivin/STAT3 pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports* 2018, 40:979-987.

**Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L, Yang ZF, Lu P, Chen KK, et al.** Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway. *Hepatology* 2010, 52:528-539.

**Wang YD, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS.** OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death and Disease* 2013, 8:4:e760.

**Whitaker HC, Girling J, Warren AY, Leung H, Mills IG, Neal DE.** Alterations in  $\beta$ -catenin expression and localization in prostate cancer. *The Prostate* 2008, 68:1196–1205.

**Witte K, Gruetz G, Volk HD, Looman AC, Asadullah K, Sterry W, et al.** Despite IFN- $\lambda$  receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or

melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines. *Genes and Immunity* 2009, 10:702–714.

**Wu G, Schöler HR.** Role of OCT4 in the early embryo development. *Cell Regeneration* 2014, 3:7.

**Xin L, Teitell MA, Lawson DA, Kwon A, Mellingshoff IK, Witte ON.** Progression of prostate cancer by synergy of AKT with genotropic and nongenotropic actions of the androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103:7789–7794.

**Yanai H et al.** Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2007, 104:3402–3407.

**Yasuda K et al.** Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production. *The Journal of immunology* 2007, 178:6876–6885.

**Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al.** Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007, 318:1917- 1920.

**Yu X, Wang Y, Jiang M, Bieri B, Roy-Burman P, Shen MM, et al.** Activation of b-catenin in mouse prostate causes HGPIN and continuous prostate growth after castration. *The Prostate* 2009, 69:249–262.

**Zeuzem S, Sulkowski MS, Lawitz EJ, Rustgi VK, Rodriguez-Torres M, Bacon BR, et al.** Albinterferon Alfa-2b was not inferior to pegylated interferon-alpha in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 1. *Gastroenterology* 2010, 139:1257–1266.

**Zeuzem S, Welsch C, Herrmann E.** Pharmacokinetics of peginterferons. *Seminars in Liver Disease* 2003, Suppl 1:23–28.

**Zhang L, Zhang B, Valdez JM, Wang F, Ittmann M, Xin L.** Dicer ablation impairs prostate stem cell activity and causes prostate atrophy. *Stem Cells* 2010, 28:1260–1269

**Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al.** Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development* 2007, 21:2747–2761.

**Zhao HL, Yao XQ, Xue C, Wang Y, Xiong XH, Liu ZM.** Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering. *Protein Expression and Purification* 2008, 61:73–77.

## **EKLER**

## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : Mustafa YILMAZ  
**Uyruk** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : AYDIN / 22.11.1988  
**Telefon** : 0 554 795 50 35  
**E-mail** : darkmoon\_my@hotmail.com  
**Yabancı Dil** : İngilizce

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji AbD Moleküler Biyoloji ve Genetik Opsiyonu	2015

### İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2015-2017	ADÜ Tıp Fakültesi Hastahanesi Hematoloji Laboratuvarı	Tekniker