

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**PROSTAT KANSERİ HÜCRE MODELİNDE IL-6 VE TNF- $\alpha$ 'NIN  
KLK4 GENİNİN REGÜLASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

**SERHAD ONAT**

**DOKTORA TEZİ**

**Jüri Üyeleri :** Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)  
Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU (Eş Danışman)  
Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ  
Prof. Dr. Aylin ER  
Prof. Dr. Özgür VATAN  
Doç. Dr. Esra TOKAY

**BALIKESİR, HAZİRAN-2024**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Serhad ONAT** tarafından hazırlanan “**PROSTAT KANSERİ HÜCRE MODELİNDE IL-6 VE TNF- $\alpha$ ’NIN KLK4 GENİNİN REGÜLASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 3 Haziran 2024 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

**Danışman**

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR  
Balıkesir Üniversitesi

**Eş Danışman**

Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU  
Balıkesir Üniversitesi

**Üye**

Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ  
Ege Üniversitesi

**Üye**

Prof. Dr. Aylin ER  
Balıkesir Üniversitesi

**Üye**

Prof. Dr. Özgür VATAN  
Bursa Uludağ Üniversitesi

**Üye**

Doç. Dr. Esra TOKAY  
Balıkesir Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Dilek TÜRKER

.....

## **ETİK BEYAN**

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**PROSTAT KANSERİ HÜCRE MODELİNDE IL-6 VE TNF- $\alpha$ 'NIN KLK4 GENİNİN REGÜLASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

**Serhad ONAT**

(imza)

## ÖZET

**PROSTAT KANSERİ HÜCRE MODELİNDE IL-6 VE TNF-A'NIN KLK4  
GENİNİN REGÜLASYONU ÜZERİNE ETKİSİ  
DOKTORA TEZİ  
SERHAD ONAT  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)  
(EŞ DANIŞMAN: DOÇ.DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)  
BALIKESİR, HAZİRAN - 2024**

Prostat kanseri dünya genelinde yüksek sıklıkla görünen bir kanser türü olarak yıllar boyu tanı ve tedavisi için birçok araştırma yapılmaktadır. Kanser gelişmesinde ve farklılaşmasında birçok sitokin görev almaktadır. Farklı kanser türlerinde olduğu gibi prostat kanserinde de proinflatuar sitokinlerde olan IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinleri hücre çoğalması, farklılaşması, apoptozu gibi farklı biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer almaktadır. Serin proteaz ailesinin bir üyesi olan KLK4 geninin prostat kanserinde aşırı ifadesi olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Bu doğrultuda KLK4 geninin belirlenen sitokinlerle ilişkisi ortaya koyan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında, prostat kanserinde, inflamatuvar sitokinler olan IL-6 ve TNF- $\alpha$  ile KLK-4 geninin regülasyonu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Yapılan tez çalışması sonucunda IL-6 ve TNF- $\alpha$  farklı dozlarda androjen bağımlı ve bağımsız hücre hatlarında hücre canlılığına olan etkisi MTT testiyle belirlenmiştir. Ardından IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin KLK4 genini regülasyonuna olan etkisi mRNA ve protein düzeylerinde Real Time PCR ve Western Blot çalışmalarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda IL-6'nın KLK4 geninin ifadesini teşvik ettiğini ancak TNF- $\alpha$ 'nın gen ifadesini baskıladığı belirlenmiştir. KLK4 geninin transkripsiyonel aktivitesini belirlemek için farklı promotor parçalarının IL-6 ve TNF- $\alpha$  varlığında transkripsiyonel aktiviteye olan etkileri araştırılmış ve EMSA deneyleri ile LNCaP hücrelerinde IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin transkripsiyonel aktivitesini SMAD-3 ve NF $\kappa$ B yolları üzerinden düzenlediği gösterilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Prostat kanseri, KLK4, IL-6, TNF- $\alpha$ , gen regülasyonu

Bilim Kod / Kodları : 20320, 20326, 20606, 20610

Sayfa Sayısı : 100

## **ABSTRACT**

**THE EFFECT OF IL-6 AND TNF- $\alpha$  ON THE REGULATION OF THE KLK4  
GENE IN PROSTATE CANCER CELL MODELS  
PH.D THESIS  
SERHAD ONAT  
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY  
(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR )  
(CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU )  
BALIKESİR, JUNE - 2024**

Prostate cancer is a highly prevalent type of cancer worldwide, and numerous studies have been conducted over the years to improve its diagnosis and treatment. Various cytokines play significant roles in the development and differentiation of cancer. In prostate cancer, similar to other types of cancer, pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- $\alpha$  are involved in regulating different biological processes, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis. It has been established that the KLK4 gene, a member of the serine protease family, is overexpressed in prostate cancer. However, no studies have been found that explore the relationship between the KLK4 gene and the specified cytokines. This thesis aims to investigate the effect of the inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  on the regulation of the KLK4 gene in prostate cancer. As a result of this thesis study, the effect of different doses of IL-6 and TNF- $\alpha$  on cell viability in androgen-dependent and independent cell lines was determined using the MTT assay. Subsequently, the effect of IL-6 and TNF- $\alpha$  cytokines on the regulation of the KLK4 gene was assessed at the mRNA and protein levels through Real-Time PCR and Western Blot analyses. The obtained data indicated that IL-6 promotes the expression of the KLK4 gene, while TNF- $\alpha$  suppresses its expression. To determine the transcriptional activity of the KLK4 gene, the effects of different promoter fragments on transcriptional activity in the presence of IL-6 and TNF- $\alpha$  were investigated. EMSA experiments demonstrated that IL-6 and TNF- $\alpha$  regulate transcriptional activity through the SMAD-3 and NF $\kappa$ B pathways in LNCaP cells.

**KEYWORDS:** Prostate cancer, KLK4, IL-6, TNF- $\alpha$ , gene regulation.

Science Code / Codes : 20320, 20326, 20606, 20610

Page Number :100

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Prostat Kanseri .....	1
1.2 Prostat Kanseri Genetiği .....	3
1.3 Prostat Kanseri ve İnflamasyon .....	6
1.4 İnflamatuvar Sitokinleri .....	7
1.4.1 Tümör Nekroz Faktör (TNF- $\alpha$ ) .....	9
1.4.2 İnterlökin-6 (IL-6).....	10
1.5 Kallikrein (KLK) Gen Ailesi .....	11
1.5.1 KLK'lar ve Kanseri .....	13
1.5.2 Kallikrein 4 (KLK4).....	17
<b>2. TEZİN AMACI VE KAPSAMI</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>24</b>
3.1 Materyaller .....	24
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasalların Listesi.....	24
3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Cihazlarının Listesi .....	26
3.1.3 Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Bakteri Soyları .....	27
3.1.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Vektörler.....	27
3.1.5 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Soyları.....	28
3.2 Yöntemler .....	28
3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin, Ortamın Temizliği ve Sterilizasyonu .....	28
3.2.2 Bakteri Çalışmaları ile İlgili Teknikler .....	29
3.2.2.1 Sıvı ve Katı Besiyerinin Hazırlanması .....	29
3.2.2.2 Kompetent Hücre Hazırlanması .....	29
3.2.2.3 Transformasyonu.....	30
3.2.2.4 Gliserol Stok Hazırlanması .....	30
3.2.2.5 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu.....	30
3.2.3 DNA ile İlgili Teknikler.....	31
3.2.3.1 DNA Miktar Tayini .....	31
3.2.3.2 Primer Tasarımı .....	31
3.2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	31
3.2.3.4 Agaroz Jel Elektroforezi.....	32
3.2.3.5 Agaroz Jelden DNA'nın Saflaştırılması.....	33
3.2.4 Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler .....	33
3.2.4.1 Hücre Kültürü Serumunun Hazırlanması .....	33
3.2.4.2 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması .....	33
3.2.4.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	33
3.2.4.4 Hücre Soyunun Başlatılması, Pasajlanması ve Dondurulması.....	34

3.2.4.5 Hücre Canlılığının Belirlenmesi ve Hücre Sayımı.....	35
3.2.4.6 Sitokin Deneylerinin Kurulması.....	36
3.2.4.7 Yolak İnhibisyon Deneylerinin Kurulması .....	37
3.2.5 Transfeksiyon Çalışmaları ile İlgili Teknikler .....	38
3.2.5.1 Geçici Transfeksiyon (Kalsiyum-Fosfat) .....	38
3.2.6 Sitotoksosite Deneyi .....	39
3.2.7 Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi.....	40
3.2.8 RNA ile İlgili Teknikler .....	40
3.2.8.1 RNA İzolasyonu .....	40
3.2.8.2 RNA Miktar Tayini .....	41
3.2.8.3 Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....	41
3.2.8.4 Reverse Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu ile cDNA Sentezi .....	41
3.2.8.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile cDNA Kalite Kontrolü .....	41
3.2.8.6 Real-Time PCR .....	42
3.2.9 Protein ile İlgili Teknikler.....	43
3.2.9.1 Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi .....	43
3.2.9.2 Hüresel Proteinlerin Ekstraksiyonu .....	44
3.2.9.3 Proteinlerin Kantitatif Belirlenmesi .....	45
3.2.9.4 SDS-PAGE.....	45
3.2.9.5 SDS Jeldeki Proteinlerin Membrana Blotlanması.....	47
3.2.9.6 İmmüno blotlama ve Membran Görüntüleme .....	47
3.2.9.7 Siklohegzimid Uygulaması ile Translasyonun Durdurulması.....	48
3.2.10 DNA-Protein Etkileşim Deneylerin Kullanılan Metotlar .....	48
3.2.10.1 EMSA (Elektroforetik Hareketlilik Kayma Testi) Yöntemi .....	48
3.2.10.2 İnsan Prostat Kanseri Hüresinden (LNCaP) Nüklear Ekstraktların Hazırlanması .....	48
3.2.10.3 Oligonükleotitlerin İşaretlenmesi .....	49
3.2.10.4 Oligoların çift zincirli hale getirilmesi .....	50
3.2.10.5 Bağlanma Deneyinin Hazırlanması ve Jelde Yürütülmesi.....	50
3.2.10.6 Protein Örneklerinin Naylon Membrana Transfer Edilmesi .....	51
3.2.11 istatistiksel Analiz.....	51
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>52</b>
4.1 Hücre Yoğunluğunun Belirlenmesi .....	52
4.2 PC3 ve LNCaP hücrelerinde KLK-4 Geninin Regülasyonunun Belirlenmesinde Kullanılacak Olan TNF- $\alpha$ ve IL-6 Sitokinlerinin Hücre Canlılığına Etkisi.....	53
4.3 Primer Tasarımı .....	57
4.4 PC3 Hücrelerinde IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin KLK4 geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin mRNA seviyesinde Belirlenmesi.....	59
4.5 LNCaP Hücrelerinde IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin KLK4 geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin mRNA seviyesinde Belirlenmesi.....	62
4.6 KLK4 Geninin LNCaP Hücrelerinde IL-6 ve TNF- $\alpha$ Uygulamasının Protein Seviyesinde Doğrulanması.....	64
4.7 LNCaP Hücrelerinde Siklohegzimid Uygulaması ile Translasyonun Durdurulması .....	66
4.8 Farklı Yolak inhibitörlerinde KLK4 Geninin İfadesinin Belirlenmesi.....	68
4.9 IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinleri ve Yolak İnhibitörlerinin KLK4 Promotor Parçalarına Transkripsiyonel Etkisinin Belirlenmesi.....	71

4.10 IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinleri ve Yolak İnhibitörlerinin KLK4 Geninin 1100 bç'lik Promotor Parçası için Transkripsiyonel Etkisinin Belirlenmesi.....	75
4.11 IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinleri Uygulanmış LNCaP nükleer Ekstraktlarında STAT-3 ve NF $\kappa$ B Transkripsiyon Faktörlerinin Aktifliğinin EMSA ile Belirlenmesi .....	77
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>80</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>84</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>90</b>
EK A: Kullanılan Markerler .....	91
EK B: KLK4 Geni Transkript Varyant 1 .....	93
EK B: KLK4 Geninin 4 Farklı Promotör Parçasının Forward ve Reverse Dizileri .....	94
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>98</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: 2022 verilerine göre, Prostat kanserinin yaşa göre 100.000 kişide bir görülme insidansı, [1].....	1
Şekil 1.2: Prostat kanseri gelişim aşamaları (Shen & Abate-Shen, 2010) .....	4
Şekil 1.3: Androjen duyarlı/dirençli prostat kanseri gelişimi [23].....	5
Şekil 1.4: Prostat kanserinin ilerlemesini/gerilemesini etkileyen faktörlerin şematik gösterimi [34].....	7
Şekil 1.5: Tümör mikroçevresindeki başlıca inflamatuvar hücreler [38] .....	8
Şekil 1.6: Prostat kanserinde IL-6 sinyal yollarının şematik gösterimi [50].....	11
Şekil 1.7: A ;KLK'lar kanser hücrelerinin tümör mikroçevresi ile etkileşimini düzenler, B ; KLK'lar tarafından ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesi [64].....	14
Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamın yapılan çalışmaların iş akış diyagramı .....	23
Şekil 3.1: pMETLuc-kontrol ve pSEAP2-kontrol vektörlerinin şematik gösterimi .....	27
Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan hücre hatları .....	28
Şekil 3.3: Thoma lamı şematik gösterimi .....	36
Şekil 3.4: MTT testinde gerçekleşen kimyasal değişim.....	39
Şekil 3.5: Bradford yöntemi BSA standart eğrisi.....	45
Şekil 4.1: PC3 hücrelerinin %10 FCS'li ortamdaki MTT analizleri.....	52
Şekil 4.2: PC3 hücrelerinin % 3 FCS'li ortamdaki MTT analizleri.....	53
Şekil 4.3: PC3 Hücre Hattında TNF- $\alpha$ Sitokinine ait MTT Analizi, OD Değerleri (p<0,05(*),p<0,01(**),p<0,0001(***)) .....	54
Şekil 4.4: PC3 Hücre Hattında TNF- $\alpha$ Sitokinine ait MTT Analizi, Yüzde Canlılık (p<0,05(*), p<0,01(**), p<0,0001(***)) .....	54
Şekil 4.5: PC3 Hücre Hattında IL-6 Sitokinine ait MTT Analizi, OD Değerleri (p<0,05(*), p<0,01(**), p<0,0001(***)) .....	55
Şekil 4.6: PC3 Hücre Hattında IL-6 Sitokinine ait MTT Analizi, Yüzde Canlılık (p<0,05(*), p<0,01(**), p<0,0001(***)) .....	55
Şekil 4.7: LNCaP Hücre Hattında IL-6 Sitokinine ait MTT Analizi (p<0,05(*), p<0,01(**), p<0,0001(***)) .....	56
Şekil 4.8: LNCaP Hücre Hattında TNF- $\alpha$ Sitokinine ait MTT Analizi (p<0,05(*),p<0,01(**),p<0,0001(***)) .....	57
Şekil 4.9: LNCaP hücrelerinde KLK4 genine yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (marker(M), pozitif kontrol(P), negatif kontrol(N), Ekspresyon primeri).....	1-5 59
Şekil 4.10:PC3 hücrelerinde KLK4 genine yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (marker(M), pozitif kontrol(P), negatif kontrol(N), Ekspresyon Primerleri F2-R1) .....	2: 59
Şekil 4.11:PC3 hücrelerinde KLK4 genine yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (marker (M), pozitif kontrol (P), negatif kontrol (N), A: IL-6 10 ng/mL, B: IL-6 20 ng/mL, C: TNF- $\alpha$ 10 ng/mL, D:TNF- $\alpha$ 20 ng/mL).....	60
Şekil 4.12:TNF- $\alpha$ sitokini uygulanmış PC3 hücrelerinde KLK4 geninin ekspresyonunun mRNA seviyesinde belirlenmesi (p<0,05(*), p<0,01(**), p<0,0001(***)) .....	61
Şekil 4.13:IL-6 sitokini uygulanmış PC3 hücrelerinde KLK4 geninin ekspresyonunun mRNA seviyesinde belirlenmesi.....	61

<b>Şekil 4.14:</b> LnCAP hücrelerinde KLK4 genine yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: marker, P: pozitif kontrol, N: negatif kontrol, A 1-6 kuyular IL-6 uygulanmış sırası ile K,1sa,3sa,6sa,24sa,48sa,B1-6 kuyular TNF- $\alpha$ uygulanmış sırası ile K,1sa,3sa,6sa,24sa,48sa) .....	62
<b>Şekil 4.15:</b> IL-6 sitokini uygulanmış LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin ekspresyonunun mRNA seviyesinde belirlenmesi (p<0,05(*), p<0,01(**), p<0,0001(***)) .....	63
<b>Şekil 4.16:</b> TNF- $\alpha$ sitokini uygulanmış LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin ekspresyonunun mRNA seviyesinde belirlenmesi (p<0,05(*), p<0,01(**), p<0,0001(***)) .....	64
<b>Şekil 4.17:</b> LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin TNF- $\alpha$ sitokini uygulanmış protein bantları.....	65
<b>Şekil 4.18:</b> LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin TNF- $\alpha$ sitokini uygulanmış protein seviyeleri .....	65
<b>Şekil 4.19:</b> LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin IL-6 sitokini uygulanmış protein bantları.....	66
<b>Şekil 4.20:</b> LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin IL-6 sitokini uygulanmış protein düzeyinin belirlenmesi .....	66
<b>Şekil 4.21</b> Siklohegzimid uygulaması (6. Saat) protein bantları.....	67
<b>Şekil 4.22.</b> Siklohegzimid uygulaması (6. Saat) protein seviyesinin belirlenmesi .....	67
<b>Şekil 4.23</b> Siklohegzimid uygulaması (24. Saat) protein bantları.....	68
<b>Şekil 4.24</b> Siklohegzimid uygulaması (24. Saat) protein seviyesinin belirlenmesi .....	68
<b>Şekil 4.25:</b> LNCaP hücrelerinde KLK4 geninin IL-6 sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri mRNA seviyesinde belirlenmesi .....	69
<b>Şekil 4.26:</b> LNCaP hücrelerinde KLK4 geninin IL-6 sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri protein düzeyi belirlenmesi .....	70
<b>Şekil 4.27:</b> LNCaP hücrelerinde KLK4 geninin TNF- $\alpha$ sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri mRNA seviyesinde belirlenmesi .....	70
<b>Şekil 4.28:</b> LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin TNF- $\alpha$ sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri protein bantları.....	71
<b>Şekil 4.29:</b> LNCaP hücrelerinde KLK4 geninin TNF- $\alpha$ sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri protein seviyesinde belirlenmesi .....	71
<b>Şekil 4.30:</b> KLK4 promotör parçalarının şematik gösterimi 4)-447/+657 , 3)-103/+657, 2)+267/+657, 1) +555/+657 .....	72
<b>Şekil 4.31:</b> Promotor parçalarının restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü. (M=marker, 4)-447/+657 , 3)-103/+657, 2)+267/+657, 1) +555/+657). .....	72
<b>Şekil 4.32:</b> pMetLuc-Kontrol ve pMetLuc-Reporter ektörlerinin transfeksiyon etkinliği .....	73
<b>Şekil 4.33:</b> KLK4 geninin promotör parçalarının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri .....	73
<b>Şekil 4.34:</b> KLK4 promotör parçalarının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve IL-6 sitokin'in transkripsiyonel aktivitelere etkisi. ....	74
<b>Şekil 4.35:</b> KLK4 promotör parçalarının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve TNF- $\alpha$ sitokin'in transkripsiyonel aktivitelere etkisi. ....	74
<b>Şekil 4.36:</b> pMetLuc-Kontrol ve pMetLuc-Reporter ektörlerinin transfeksiyon etkinliği (1104bç promotör parçası) .....	75
<b>Şekil 4.37:</b> 1104bç'lilik KLK4 promotör parçasının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve IL-6 sitokin'in transkripsiyonel aktivitelere etkisi.....	76

<b>Şekil 4.38:</b> 1104bç'lilik KLK4 promotor parçasının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktivite ve TNF- $\alpha$ sitokin'in transkripsiyonel aktivitelere etkisi.....	76
<b>Şekil 4.39:</b> TNF- $\alpha$ sitokini uygulanmış KLK4 EMSA görüntüsü. ....	78
<b>Şekil 4.40:</b> IL-6 sitokini uygulanmış KLK4 probunun EMSA görüntüsü. ....	79
<b>Şekil A.1:</b> Protein marker.....	91
<b>Şekil A.2:</b> DNA Marker (1 kb) .....	92
<b>Şekil A.3:</b> DNA Marker (100bp) .....	86

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> Kanserde rol oynayan temel inflamatuvar sitokinler [38].....	9
<b>Tablo 3.1:</b> Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların listesi.....	24
<b>Tablo 3.2:</b> Deneysel çalışmalarda kullanılan laboratuvar cihazlarının listesi .....	26
<b>Tablo 3.3:</b> PCR döngü koşulları .....	32
<b>Tablo 3.4:</b> Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler .....	38
<b>Tablo 3.5:</b> Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözelti bileşenleri.....	39
<b>Tablo 3.6:</b> KLK4 ve H $\beta$ -2-M geni ekspresyon primerleri.....	42
<b>Tablo 3.7:</b> KLK4 ve H $\beta$ -2-M geni ekspresyon primerlerinin PCR bileşenleri .....	42
<b>Tablo 3.8:</b> Real-time PCR döngü şartları .....	43
<b>Tablo 3.9:</b> Western blot analizinde kullanılan çözeltiler .....	43
<b>Tablo 3.10:</b> SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları.....	46
<b>Tablo 3.11:</b> İşaretleme reaksiyonu içeriği .....	49
<b>Tablo 3.12:</b> %6'lık Jel İçeriği .....	50
<b>Tablo 3.13:</b> Bağlanma reaksiyonu İçeriği.....	50
<b>Tablo 4.1:</b> KLK4 geninin ekspresyonu için kullanılan primerler.....	57

## SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ

<b>A</b>	: Absorbans
<b>AI</b>	: Yapay zeka
<b>AR</b>	: Androjen reseptörü
<b>BPH</b>	: Benign Prostat Hiperplazisi
<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin
<b>EMSA</b>	: Electrophoretic mobility shift assay
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DRM</b>	: Dijital Rektal Muayene
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DEPC</b>	: Dietil Pirokarbonat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit
<b>Et-Br</b>	: Etidyum Bromür
<b>EMT</b>	: Epitelyal-mezanşimal geçiş
<b>FCS</b>	: Fetal Calf Serum
<b>IL-6</b>	: İntelökin altı
<b>IL-10</b>	: İntelökin on
<b>JAK</b>	: Janus kinases
<b>Kb</b>	: Kilobaz
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>KDPK</b>	: Kastrasyon dirençli prostat kanseri
<b>M</b>	: Marker
<b>Mg</b>	: Miligram
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>MAPK</b>	: Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>MMP</b>	: Matris metaloproteinazlar
<b>MRI</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
<b>MRG</b>	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>Ng</b>	: Nanogram
<b>OD</b>	: Optik Dansite
<b>PAR</b>	: Proteazla aktive olan reseptör yolağı
<b>PBS</b>	: Phosphate-buffered saline
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PCa</b>	: Prostat Kanseri
<b>PSMA-PET</b>	: Prostat spesifik membran antijeni pozitron emisyon tomografisi
<b>RPM</b>	: Rotation per minute
<b>sa</b>	: Saat
<b>sn</b>	: Saniye
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>SNP</b>	: Tek nükleotid polimorfizmleri
<b>STAT</b>	: Signal transducer and activator of transcription proteins
<b>TGFβ1</b>	: Transforme edici büyüme faktör-beta 1
<b>TNF-α</b>	: Tümör Nekroz Faktörü-α
<b>TNFR-1</b>	: Tümör Nekroz Faktörü-α Reseptör 1
<b>TNFR-2</b>	: Tümör Nekroz Faktörü-α Reseptör 2

**TME** : Tümör mikroçevresindeki  
**TE** : Tripsin Edta  
**UTR** : Translasyona uğramayan bölge  
**uPA** : rokinaz tipi plazminojen aktivatör yolağı

## ÖNSÖZ

Öncelikle akademik gelişim sürecimde bana rehberlik eden, destek ve teşvikleriyle yol gösteren kıymetli danışmanım sayın Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a en derin teşekkürlerimi sunmak isterim. Vermiş olduğu tüm maddi ve manevi desteği, uzmanlığı ve değerli görüşleri, bu tezin tamamlanmasında büyük rol oynamıştır. Ayrıca, tez süresince, önerileri ve destekleri için eş danışmanım sayın Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU'a içtenlikle teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca beni destekleyen YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar Doktora Programına ve TÜBİTAK BİDEB 2211/A Genel Yurtiçi Doktora Burs programlarına sonsuz şükranlarımı sunarım.

Değerli fikirleri ve yapıcı eleştirileri ile tezime sonsuz katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ ve sayın Prof. Dr. Aylin ER hocalarıma teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca her konuda desteklerini esirgemeyen bilgilerini benimle paylaşan Doç. Dr. Esra TOKAY, Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU' na, uzun yıllar boyunca laboratuvarında beraber çalıştığımız Dr. Fatma POYRAZLI, Uzm. Burcu EFE DAŞKAN, Dr. Kübra PASPAL, ve beraber çalıştığımız tüm ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Arkadaşlığıyla daima yanımda olan ve bilime verdiği özenle her zaman örnek aldığım sevgili dostum Dr. Mesut ACAR'a canı gönülden teşekkür ederim.

Lisanüstü eğitim sürecimin en başından itibaren vermiş olduğu sarsılmaz desteği ve anlayışı için kıymetli eşim Selda ONAT'a ve bu süreç boyunca ailemize yeni katılan biricik çocuklarımıza sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Balıkesir, 2024**

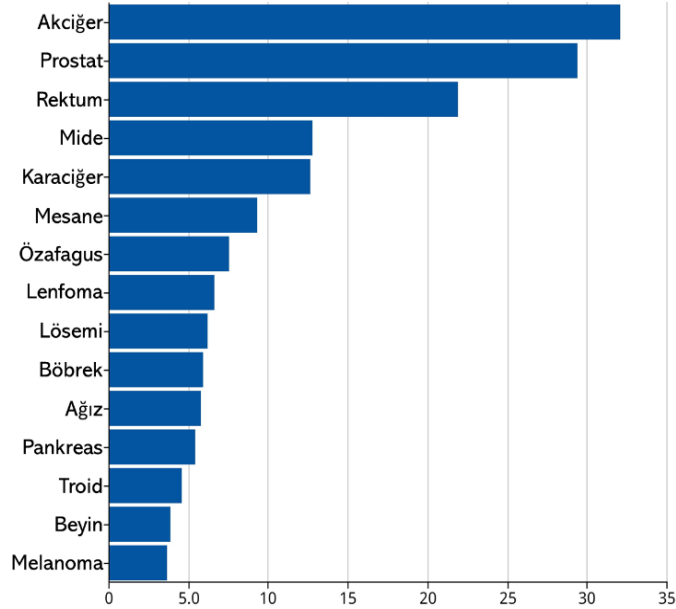
**Serhad ONAT**

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Prostat Kanseri

Prostat Kanseri Dünya Sağlık Örgütü'nün 2022 yılı verilerine göre erkekler arasında en yaygın görülen ikinci kanser türüdür [1]. Aynı zamanda kanserle ilişkili ölümlerinde başlıca nedenlerinden biridir. İleri yaştaki hastalarda belirlenmesine oranla, yaşamları boyunca neredeyse her sekiz erkekten birini etkiler [2]. Ortalama olarak her yıl 190.000 yeni prostat kanseri vakası ortaya çıkmakta ve dünya genelinde yaklaşık 80.000 ölüm gerçekleşmektedir [3]. Küresel olarak, prostat kanserinin, hızla artan nüfus ve 65 yaş ve üstü erkeklerin büyük nüfusu nedeniyle 2030 yılına kadar yaklaşık 1.7 milyon yeni vakaya ve 499.000 ölüme ulaşması tahmin edilmektedir [4].

Prostat kanseri, dünya genelinde farklı coğrafi bölgelerde ve etnik gruplar arasında değişiklik gösterir. Siyahi erkekler dünya çapında prostat kanserinin en yüksek insidans oranlarına sahiptir. Siyah Amerikalı erkeklerdeki insidans oranları, Amerika'daki beyaz erkeklerinkinden yaklaşık %60 daha yüksektir. Prostat kanseri insidans oranları, prostat kanseri farkındalığının ve prostat spesifik antijen (PSA) testinin yaygın bir tarama uygulaması olduğu gelişmiş ülkelerde en yüksek düzeydedir [5].



**Şekil 1.1:** 2022 verilerine göre, Prostat kanserinin yaşa göre 100.000 kişide bir görülme insidansı, [1]



Prostat kanseri (PCa) için yaş, ırk, coğrafi bölge ve genetik etki gibi birçok risk faktörleri tanımlanmıştır. Erkek üreme sisteminin bir parçası olan prostat bezi hücre sayısının kontrolsüz bir şekilde artmasıyla meydana gelen kötü huylu tümöral bir yapı olan PCa'nın belirtileri ve semptomları genellikle benign prostat hiperplazisi (BPH) belirtileri ile benzerlik göstermektedir. Bu belirtilere idrar akış bozunumu, rahatsız edici idrar yapma, idrarın kan veya meni ile karışması ve kronik bel, pelvik veya kalça ağrısıdır [5].

1941 yılında Charles Brenton Huggins, prostat kanseri hastalarının tedavisinde önemli bir ilerleme kaydetmiştir. Androjen hormonunu kan dolaşımından uzaklaştırma üzerine yaptığı çalışmalarla, prostat kanseri ile hormon tedavisi arasındaki ilişkiyi sistematik olarak incelemiştir. Bu yenilikçi çalışmaları sonucunda Huggins, Tıp ve Fizyoloji alanında Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür [6].

Prostat kanserinin tanısında ve tedavisinde en ciddi ilerlemeler 1970'li yılların ortalarından itibaren sağlanmıştır. Prostat spesifik antijen (PSA) seminal koagulumda bulunan bir serin proteazdır ve ilk olarak adli tıp alanında kullanılmaya başlanmıştır. PSA ve prostat hastalıkları arasındaki ilişkinin keşfedilmesiyle beraber yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. İnsan serumunda PSA pürifikasyonu 1979'da Wang ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [7]. İleriki yıllarda Stamey ve arkadaşları prostat kanseri olan hastaların serumlarında yüksek PSA değerlerini göstermişlerdir [8, 9].

Günümüzde prostat kanseri tanısı için birkaç farklı test ve tedavi parametreleri takip edilmekle birlikte, geleneksel olarak bir dijital rektal muayene (DRM) ile teşhis edilmektedir. Bununla birlikte, prostat spesifik antijen (PSA) testi, prostat kanseri taraması için altın standart bir yöntemdir.

Doku Kallikrein ailesine ait olan KLK3 geni tarafından kodlanan PSA, 33 kDa moleküler ağırlığında ve 240 aminoasit uzunluğunda, prostata özgü bir glikoproteindir [10]. PSA'nın ifadesi, androjenler tarafından pozitif yönde düzenlenir. Dolaşımla bulunan androjen seviyeleriyle serum PSA seviyeleri arasında belirgin bir korelasyon olduğu belirlenmiştir [11, 12]. Prostat bezinin epitelyal hücreleri tarafından salgılanan PSA genellikle menide ve kan dolaşımında bulunur. PSA seviyesi 4 ng/mL ile 10 ng/mL arasında olan hastaların yaklaşık dörtte birinde prostat kanseri olma olasılığı vardır. PSA 10 ng/mL'den fazla ise, prostat kanseri olma olasılığı %50'nin üzerindedir. PSA, prostat bezine özgüdür ve prostat kanserine özgü değildir; bu nedenle, prostat spesifik antijen seviyeleri tek başına kanser teşhisi için yeterli olmayıp, gerekli patolojik testlerle de desteklenmelidir [13].

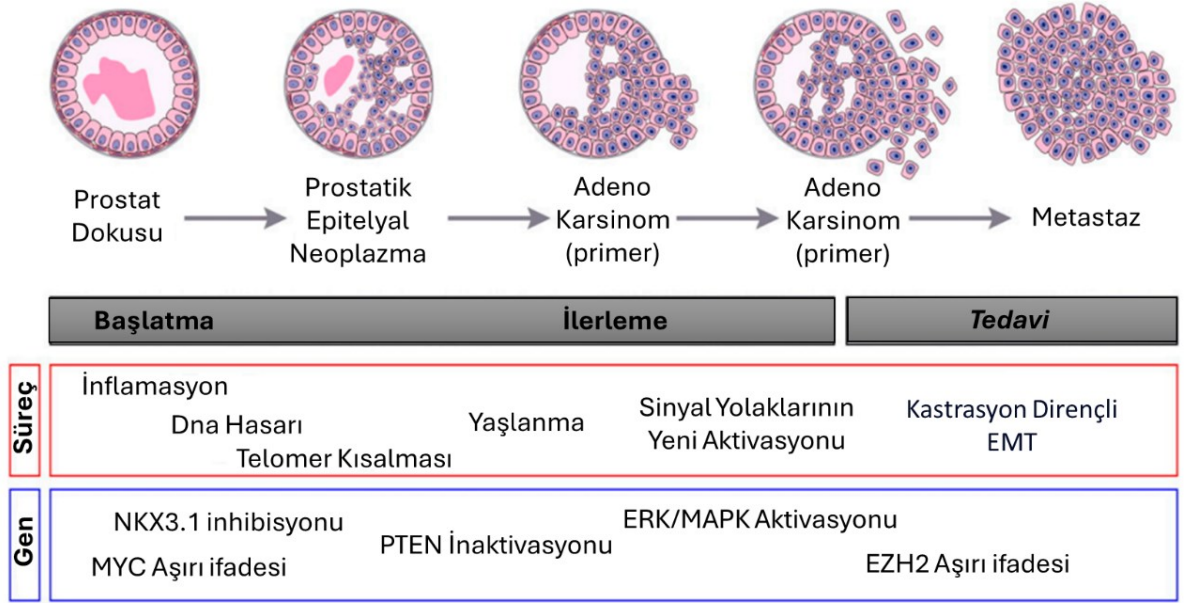
Ancak, son zamanlarda yapay zeka (AI) ve makine öğrenimi algoritmaları ilerlemiş, prostat kanseri için yeni sınıflandırmalara yol açmıştır. Son yıllarda, yeni moleküler belirteçlerin keşfi ve gelişmiş görüntüleme tekniklerinin, örneğin multiparametrik manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve prostat spesifik membran antijeni pozitron emisyon tomografisi (PSMA-PET) taramalarının kullanıma sunulması, prostat kanseri taraması, teşhisi ve tedavisinde daha bireyselleştirilmiş bir yaklaşıma geçişi sağlamıştır [14, 15].

Yapılan yeni tedavi uygulamaları ve keşfedilen yeni geliştiricilerle prostat kanserinin evresi ve prostat kanserine bağlı ölüm oranları azalmıştır. Ancak yaklaşık yarım asırdır yapılan bu çalışmalar prostat kanserinin etkinliğini yitirmesi açısından yetersiz kalmıştır. Yaşanan bu süreç prostat kanserinin tanı ve tedavisinde daha iyi ve kesin çözümler oluşturabilmek için moleküler tabanlı araştırmalara daha fazla yer verilmesinin gereğini vurgulamıştır.

## **1.2 Prostat Kanseri Genetiği**

Genetik ilişki prostat kanseri için temel risk faktörüdür. Ailesinde prostat kanseri tanısı konmuş erkekler, prostat kanseri öyküsü olmayanlara göre kanser geliştirme riski açısından %50 oranında daha yüksek risk altındadır [16]. Kanseri, mutasyonlar gibi DNA diziliminde tekli ya da çoklu genetik değişikliklere yol açabilen durumlar sonucunda meydana gelebilir. Farklı mutasyon tipleri (nokta mutasyonlar, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), somatik mutasyonlar) prostat hücrelerinin kanserli hale gelmesine neden olabilir. Bu genellikle kontrolsüz hücre bölünmesine yol açar ve genlerdeki mutasyonlar nesilden nesile aktarılabilir [17].

Yapılan araştırmalar prostat kanserinde belirli gen mutasyonlarının farklı lokuslarda bulduklarını göstermiş ve bu genetik havuzda bu mutasyonlara sahip hastaların kanser riskinin arttığını rapor etmiştir. Bu erkeklerin yaklaşık %5.5'inde, BRCA1, BRCA2 ve ATM gibi DNA onarım genlerinde birçok mutasyon belirlenmiştir [18]. Prostat kanseri için biyobelirteç olarak BRCA genleri, HOX genleri, ATM ve MSR1 genleri de önerilmiştir [19].



**Şekil 1.2:** Prostat kanseri gelişim aşamaları (Shen & Abate-Shen, 2010)

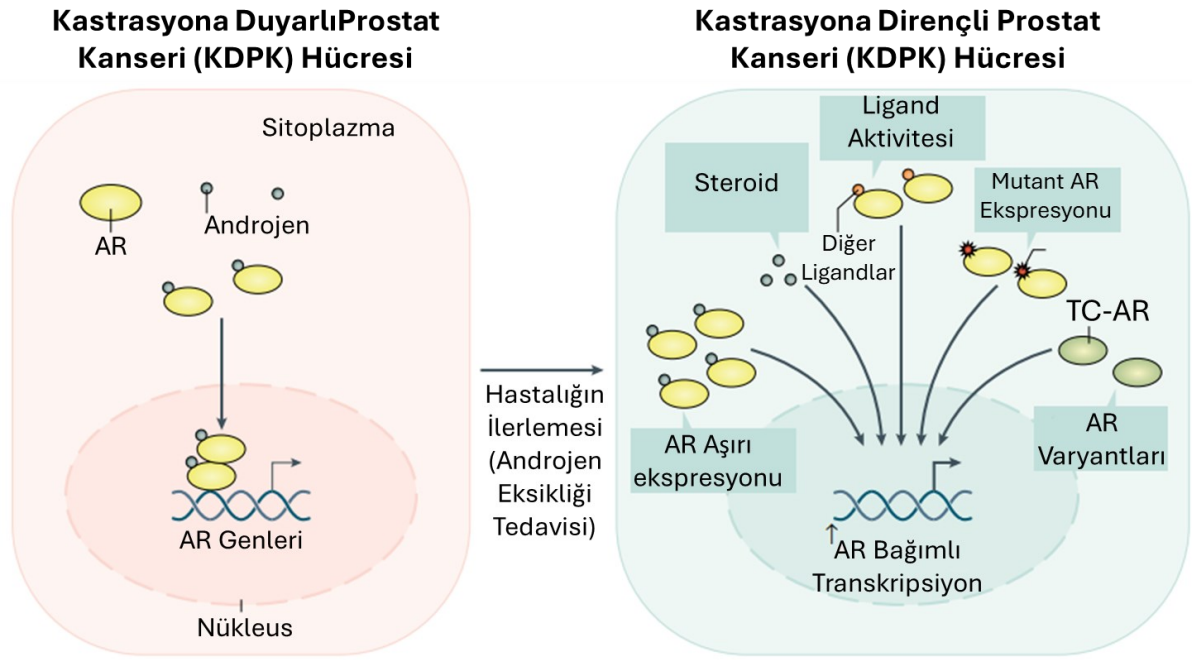
Androjen reseptörü (AR), prostat kanserinde en çok araştırılan ve tedavi amaçlı hedeflenen onkogenlerden biridir. Androjenler, prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasında temel düzenleyiciler olarak görev yapar. Androjenler ve androjen reseptörü yapıları, prostat dokusunun ve prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunda kritik rol oynar.

Ayrıca, kas ve yağ dokusu gelişiminde, cinsiyetle ilişkili hücresel farklılaşmada, prostatın normal gelişimi ve fizyolojik işlevlerinin yerine getirilmesinde, prostat karsinogenezinde ve androjen-bağımsız kanser türünün gelişiminde de önemli roller üstlenirler [20, 21].

AR genellikle hücre içi homeostazı koruyan genlerin ve normal prostat fonksiyonu için önemli olan proteazların (örneğin, PSA'yı kodlayan KLK3 gibi) ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev yapmaktadırlar. Hücrelerin proliferasyonunu stimüle etmekte ya da apoptozu inhibe etmektedirler. Bu nedenle prostat kanseri hücrelerinin hayatta kalabilmeleri için androjenik stimülasyonun belirli seviyelerde bulunması gerekmektedir [22].

Prostat kanseri hücrelerinin hormon tedavisine duyarlı halden, dirençli prostat kanserine (Kastrasyon Dirençli Prostat Kanseri, KDPK) ilerlemesi genellikle uygulanan tedavi sonucu ile ilişkili olabilir. KDPK 'da kanser ilerlemesi sırasında görülen anormal hücresel AR sinyal

değişiklikleri, AR gen amplifikasyonundan, AR aşırı ifadesinden veya mutasyonlu AR'ın sürekli aktive eden nokta mutasyonlarından kaynaklanır [23].



**Şekil 1.3:** Androjen duyarlı/dirençli prostat kanseri gelişimi [23]

Prostat kanserinin ilerlemesinde gen regülasyon basamaklarında meydana gelebilen düzensizlikler tümör oluşumunu sağlayan en önemli olaylardan biri olabilir. P53 ve RB1 gibi hücre döngüsü kontrollerini düzenleyen genler hormona dirençli prostat kanserinde mutasyona uğramışlardır. Lokalize hastalıklarda meydana gelebilen mutasyonlar P53 için %8 ve RB1 için yalnızca %1 sıklıkta değişir, ancak metastatik prostat kanserli vakalarda sırasıyla %27 ve %5 oranında hormon duyarlı ve %50 ve %21 oranında kastrasyona dirençli prostat kanserlerinde görülmektedir. Bu oranlar da P53 ve RB1 genlerinin fonksiyon kayıplarının prostat kanserinin metastatik ilerlemesinde rolü olduğunu göstermektedir [24, 25].

P53 ve PTEN tümör baskılayıcı genlerinin prostat kanseri hücrelerinin invazyonunda mevcut bir etkisi olduğu gösterilmiştir. İlgili genlerin bulunduğu kromozom 17p ve 10q'nun kaybı sıklıkla görülmekle birlikte bu genlerin işlevsel olarak inaktif olabilmeleri için diğer alellerin de kaybolması gerekir [26].

Fare modellerinde yapılan çalışmalarda, RB1 kaybının prostat kanserinin kastrasyona dirençli hale geçişi sağlamak için yeterli olduğu rapor edilmiştir. Hücre ve fare modellerinde

RB1 ve P53 genlerinin farklı kombinasyonlardaki kayıpları, sürekli olarak androjen yoksunluk tedavisi altında adenokarsinoma ile nöroendokrin özelliklere geçişi ve metastazi teşvik ettiğini ortaya koymuştur [27-29].

Prostat kanserinde en sık değişime uğrayan kromozomlar, azalan sıralama ile 8, 13, 7, 10, 16, 6 ve 17'dir. Prostat kanseri hücrelerinin büyük bir kısmında, özellikle androjen bağımsız hücrelerde, BCL2 proteininin aşırı ekspresyonu gözlemlenmiştir. BCL2, karsinogenez olmayan prostat hücre hatlarında eksprese edilmezken, intraepitelyal neoplazmadan başlayarak epitelyumda aşırı bir şekilde ifade edilir [30].

### **1.3 Prostat Kanseri ve İnflamasyon**

İnflamasyon, kanserin önde gelen nedenlerinden biridir ve yaklaşık 150 yıl önce Rudolph Virchow tarafından kanserin bir nedeni olarak ortaya atılmıştır. İnflamasyon ilişkili kanser, kanser hücreleri ve lökosit alt tipleri tarafından üretilen sitokinlerin oluşturduğu bir mikroçevre ile ortaya çıkmaktadır. Sitokinler, reseptörleri aracılığıyla etki eden ve proliferasyon, inflamasyon, bağışıklık gözetimi ve kanserin ilerlemesinde temel bir rol oynayan küçük protein ligandlardır. Temel olarak, hücrelerin konumsal ve zamansal olarak hareketi sitokinler tarafından düzenlenir [31].

Enfeksiyonlar, değişmiş metabolizma, inflamatuvar hastalıklar veya diğer çevresel faktörlerden kaynaklanan kronik inflamasyon, çeşitli kanser türlerinin gelişiminde önemli bir katkı sağlayabilir. Aslında, tüm kanserlerin yaklaşık %20'si bir tür inflamasyonla bağlantılıdır. Genetik, epidemiyolojik ve moleküler patolojik çalışmalardan elde edilen kanıtlar, inflamasyonun prostat kanserinin çeşitli aşamalarında ve tümör progresyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu aşamalar arasında başlatma, teşvik etme, malign dönüşüm, invazyon ve metastaz bulunur. Prostatik inflamasyonun etiolojisini ve çeşitli sinyal yollarının tümör büyümesini teşvik etmedeki rollerini anlamaya yönelik detaylı temel ve klinik araştırmalar, bu karmaşık süreci anlamak için kritik öneme sahiptir. Elde edilen bilgiler, inflamatuvar mediatörlerin moleküler hedeflenmesi ve immün terapiye dayalı yaklaşımlar gibi yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde faydalı olacaktır [32].

Normal hücrelerin ifadelerini ve çevrelerine verdikleri tepkiyi düzenleyerek homeostazlarını korumasının aksine, kanser hücreleri aynı homeostatik hücreleri ele geçirerek, hızlı bir şekilde çoğalmayı, göçü ve metastazi destekleyen bir çevresel ortam oluştururlar. Epidemiyolojik alanda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre hormonlar,





mekanizmalarını anlamak, ilgili kanser karşıtı tedavilerin geliştirilmesini kolaylaştıracaktır [40, 41].

**Tablo 1.1:** Kanserde rol oynayan temel inflamatuvar sitokinler [38]

İnflamatuvar Sitokinler	Kaynağı	Reseptörleri	Kanserdeki Anahtar Rolü
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Makrofajlar, T lenfositleri, NK hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, eozinofiller ve nöronlar	TNF- $\alpha$ R-1 TNF- $\alpha$ R-2	-Tümör hücrelerinin apoptozisini teşvik ederek antitümör etkiler sağlar -Tümör damarlarını etkileyerek tümör büyümesini engeller
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Tümör hücreleri, kemik matrisi	TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RII	-Tümör oluşumunun erken aşamalarında apoptozis indüksiyonu ve immün hücre modülasyonu yoluyla kanseri baskılar -Tümör ilerlemesi için proinflamatuvar sinyaller sağlar
<b>IL-1</b>	Tümör hücreleri, makrofajlar, düzenleyici B hücreleri ve yardımcı T hücreleri	IL-1R	Dokuda bulunan endotel hücreleri tarafından VEGF gibi anjiyojenik faktörlerin üretimini teşvik ederek tümör ilerlemesini teşvik eder
<b>IL-6</b>	Tümör hücreleri, T hücreleri, B hücreleri, monositler, fibroblastlar, keratinositler, endotel hücreleri, adipositler	IL-6R	Tümör hücresi proliferasyonunu, hayatta kalmasını, anjiyogenez'i ve kemoterapi direncini indükleyerek tümör ilerlemesini teşvik eder
<b>IL-10</b>	Tümör hücreleri, lökositler	IL-10R	Sitotoksik T hücrelerinin infiltrasyonunu ve sitotoksik aktivitesini teşvik ederek antitümör etkinlikler sağlar
<b>IFN-I</b>	Tümör hücreleri, makrofajlar, düzenleyici B (Breg) hücreleri	IFNAR1 IFNAR2	İmmün kaçışı, anjiyogenez'i teşvik ederek ve apoptozu baskılayarak sonraki aşamada kanserin ilerlemesini kolaylaştırır

#### 1.4.1 Tümör Nekroz Faktör (TNF- $\alpha$ )

Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF alfa), makrofajlar ve monositler tarafından akut inflamasyon sırasında üretilen bir inflamatuvar sitokindir. Bu protein, hücrelerde nekroz veya apoptoz gibi süreçleri tetikleyen çeşitli sinyal yollarından sorumludur. Ayrıca TNF- $\alpha$  enfeksiyonlara ve kansere karşı bağışıklık direncinin sağlanmasında önemli bir rol oynar. TNF alfa, etkilerini genellikle bir trimer şeklinde, hücre zarı reseptörlerinden 55 kDa'lık TNFR-1 veya 75 kDa'lık TNFR-2'ye bağlanarak gösterir. Bu iki reseptör de TNF reseptör süper ailesi olarak bilinen bir gruba dahildir [42].



Bir proinflatuar sitokin olarak, TNF- $\alpha$ 'nın aşırı ifadesi prostat, over, karaciğer ve meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde tanımlanmıştır. TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ R-1 ve TNF- $\alpha$ R-2 reseptörlerine bağlanarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve anjiyogenezini teşvik eder ve tümör hücrelerinin epitelyal-mezanşimal transportunu indüklediği belirlenmiştir [43].

TNF- $\alpha$ , konsantrasyonuna bağlı olarak kanser oluşum süreçlerinde zıt görevlerde rol alabilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda TNF- $\alpha$ 'nın antitümör etkisi, farelerde sarkom modelinde gözlemlenirken, düşük düzeylerde TNF- $\alpha$ , protümörojenik bir fenotipe neden olmuştur [44]. Farklı yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın TGF- $\beta$  sinyallerini arttırdığı ve TGF- $\beta$ 'ya bağlı EMT'yi teşvik ettiği raporlanmıştır [45].

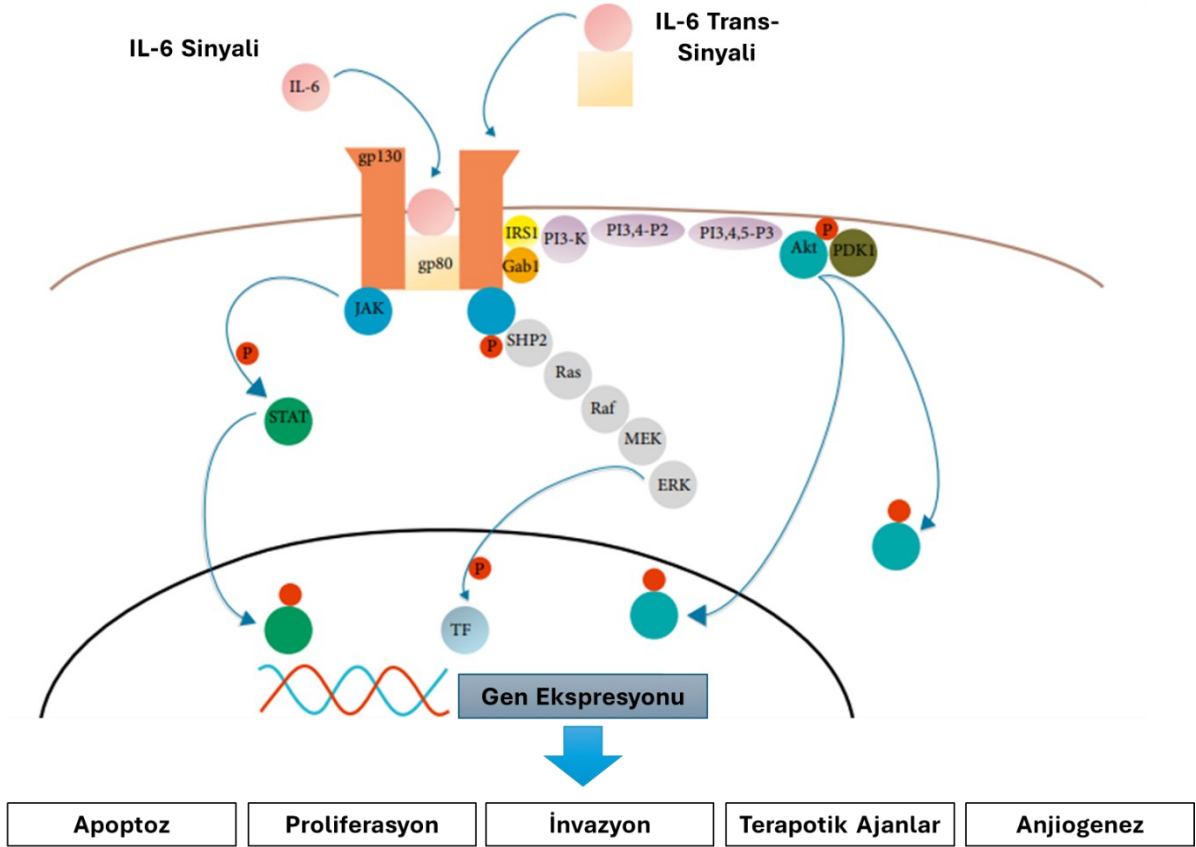
#### **1.4.2 İnterlökin-6 (IL-6)**

Interleukin (IL)-6, protümorijenik sitokinlerden oluşan bir ailenin üyesidir ve bu ailede IL-11, IL-27, IL-31, onkostatin M (OSM), lösemi inhibitör faktörü (LIF), kardiyotrofik-1 (CT-1) silyer nörotrofik faktör (CNTF) ve kardiyotrofik benzeri sitokin (CLC) bulunur. Bu sitokinlerin tümör büyümesi ve metastazın düzenlenmesindeki rolleri iyi bir şekilde karakterize edilmiştir.

IL-6, fibroblastlar, B hücreleri, T hücreleri, monositler, keratinositler, endotel hücreleri, adipositler, mezanşimal hücreler, ve tümör hücreleri gibi çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir. IL-6, IL-6 reseptörü (IL-6R) ile etkileşime girerek, STAT3'ü aktive eder ve siklin D1, D2 ve B1 ile c-Myc'in ekspresyonunu artırırken, sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü p21'in ekspresyonunu azaltır. Bu süreç, tümör hücrelerinin hücre döngüsüne girişini hızlandırır [46].

IL-6'nın reseptörüne bağlanması, üç ana sinyal yolunu aktive eder (Şekil 1.6): Janus tirozin kinaz ailesi (JAK)-sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) yolu, ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz 1 ve 2 (ERK1/2)-mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3-K) yolu. Klasik IL-6 sinyallemede, IL-6'nın IL-6 reseptörüne bağlanması üzerine JAK, transkripsiyon faktörleri ailesi olan STAT faktörlerini fosforile eder ve aktive eder. Bu, STAT proteinlerinin dimerleşmesini ve ardından nükleer lokalizasyon sinyalinin açığa çıkmasını sağlar. STAT proteini daha sonra hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatmak üzere çekirdeğe taşınır [47].

IL-6'nın prostat kanseri biyolojisine dahil olduğunu gösteren ilk bulgu, tedavi edilmemiş metastatik veya kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK) olan hastalarda IL-6 serum seviyelerinin, sağlıklı hastalar veya lokalize hastalığı olan hastalara kıyasla yükselmiş olduğunu gözlemlemekle ortaya çıkmıştır [48, 49]. Bu klinik veriler topluca, IL-6'nın prostat kanseri patogenezinde potansiyel bir rolü olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 1.6: Prostat kanserinde IL-6 sinyal yollarının şemantik gösterimi [50]

### 1.5 Kallikrein (KLK) Gen Ailesi

Kallikrein-ilişkili peptidazlar (KLK'lar), hücre büyümesinin düzenlenmesinde ve farklılaşmasında, anjiyogenezde, insan semen sıvılaşmasında, diş minesini oluşumu gibi birçok farklı inflamasyonda ifade edilirler [51-53].

Her bir serin proteazı kodlayan toplam 15 geni içeren Kallikreinler yapısal olarak benzerliklerine rağmen farklı dokulardaki ekspresyon seviyeleriyle birbirleriyle oldukça farklılık göstermektedirler. KLK'lar, çeşitli türlerde evrimsel olarak korunmuştur ve diş gelişimi, cilt dökülmesi, seminal sıvının sıvılaşması, nöral plastisite, böbrek fonksiyonu ve

inflatuar yanıtlar gibi birçok fizyolojik fonksiyonda rol almaktadırlar. KLK'lar ayrıca, cilt bozuklukları ve kanser gibi diğer patolojik süreçleri de düzenler [54, 55].

KLK'lar, insan kromozomunun 19q13.3-13.4 pozisyonunun uzun kolunda yer alan ve yaklaşık 265 kb'yi kapsayan, proteaz kodlayan genlerin insan genomundaki en büyük kümesini oluşturan toplamda 15 gen (KLK1-15) içerir [56] [57]. KLK genleri arasındaki dizi benzerliği, bu ailenin iki alt gruba ayrılmasını sağlar; ilk tanımlanan klasik KLK genleri (KLK1, 2 ve 3) KLK1 ile %65.8 (KLK2) ve %61.5 (KLK3) dizi benzerliği gösterirken, yeni tanımlanan KLK'lar ise (KLK4-15) KLK1 ile yaklaşık %34.9-%46.2 oranında benzerlik gösterirler [58].

Tüm KLK genleri, yapısal olarak oldukça korunmuş 5 ekson tarafından oluşturulmuştur ve her bir genin uzunluğu 4.3 ile 10.5 kb arasında değişir. İlk ekson her zaman başlatma kodonunu ve kısa bir 5'-UTR (Translasyona uğramayan bölge) içerirken, durdurma kodonu, poli-A kuyruğu ve 3'-UTR ise ekson 5'te bulunur. Kodlanan eksonların aksine, KLK'nin kodlamayan bölgeleri daha değişkendir ve bu da gen uzunluğundaki farklılıklara (4.3-10.5 kb) yol açar. İntron dizileri de oldukça değişkendir, bu da düzenleyici mekanizmalarındaki farklılıklarını açıklayabilir [58, 59].

KLK genlerinin ekspresyonu hormonlar, DNA metilasyonu ve mikroRNA' lar tarafından düzenlenmektedir. KLK gen ve protein ekspresyonu, kanser prognozu ile önemli ölçüde ilişkilidir, bu da onların kanser tanı ve tedavisinde biyomarker potansiyellerini ve onkogenezdaki fonksiyonel rollerini göstermektedir. En yaygın örnek, prostat kanseri hastalarında KLK3 geninin yüksek serum seviyelerinin, hastalığın varlığını göstermek için bir biyomarker olarak kullanılmasıdır. Bu biyomarkerin rolü ve diğer KLK'ların klinik biyomarker olarak kullanımı geniş çapta araştırılmaktadır [60, 61].

Protein translasyonundan sonra KLK'lar pre-proenzim olarak sentezlenirler. N- terminalde bulunan sinyal dizisi salgılanmadan önce çıkartılır. Pro-peptidlerin uzaklaştırılması enzim aktivitesi için zorunlu ve elzemdir. Bu kesilmeler proteolitik dönüşüm olarak isimlendirilir ve tüm KLK'lar tarafından yapılabilmektedir. Bazen de KLK'lar kendilerini otokatalitik olarak kesebilirler. Proteolitik aktivite geri dönüşümsüzdür ve posttranslasyonel mekanizmalarla sıkı bir şekilde regüle edilmektedir. Kontrol dışına çıkan proteolitik aktiviteleri farklı hastalıklarda gözlenmektedir [62].

### 1.5.1 KLK'lar ve Kanser

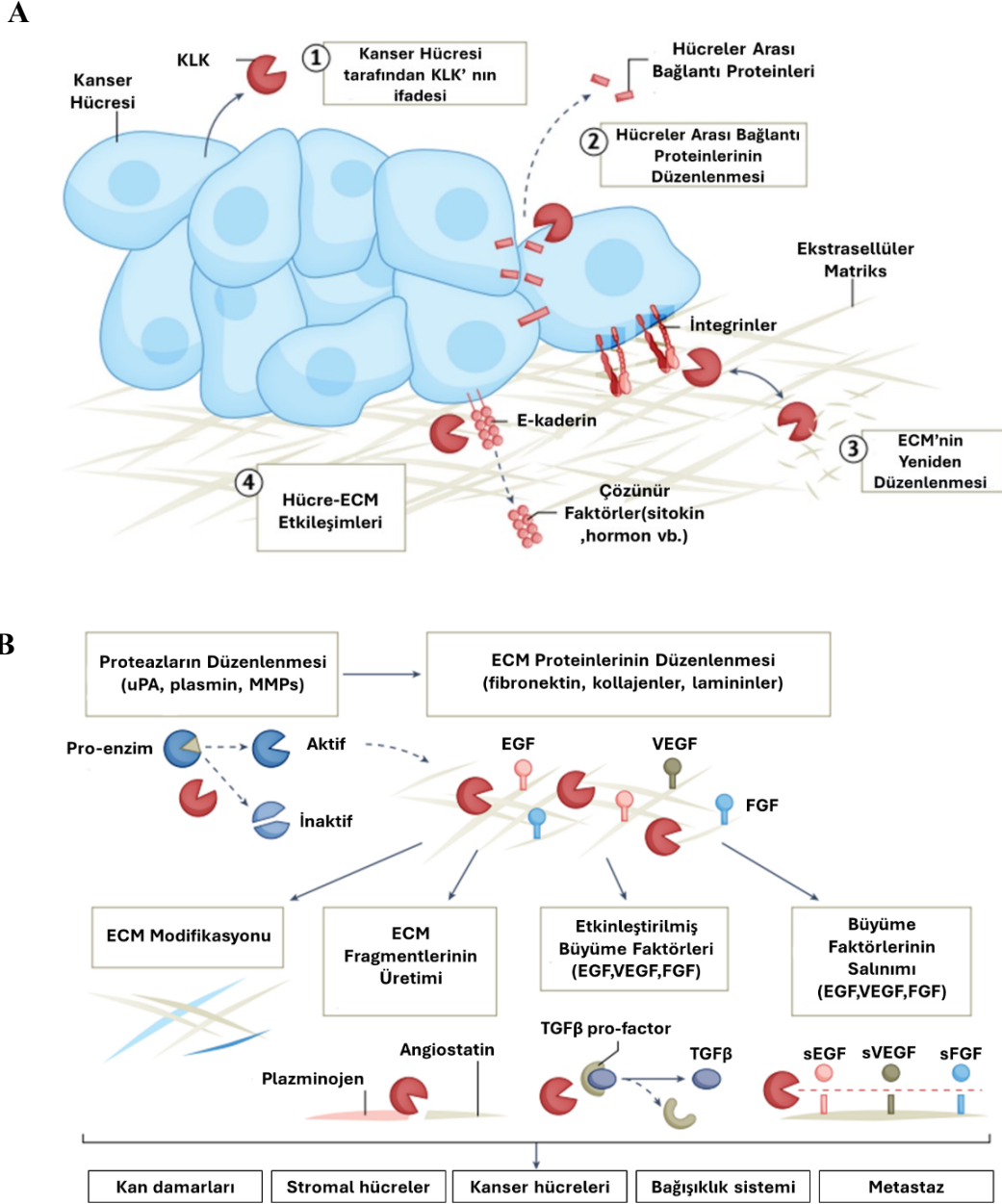
Kanser çok basamaklı bir hastalıktır ve bazı dönüm noktaları vardır. Kanserdeki önemli basamaklar şunlardır: Hücre büyüme sinyallerinin çoğalması, büyüme engelleyici sinyallerin azalması, hücre ölümüne direnç, sürekli replike olabilmesi, anjiogenezi indüklemesi, doku yayılımı ve metastazı aktive etmesi, enerji metabolizmasını yeniden programlaması, bağışıklık sistemden kaçabilmeleridir [63].

Kanser sırasında KLK'lar tümörün gelişimini hem baskılayarak hem de teşvik ederek iki şekilde de düzenleyebilirler. Birçok çalışmada KLK'ların, tümör baskılayıcısı olarak görev aldığı gösterilmiştir. Diğer yandan KLK'lar anjiyogenez, invazyon ve metastazı düzenleyen mekanizmalar üzerinden kötü huylu fenotipe direkt olarak katkıda bulunabilecekleri gibi dolaylı olarak hücre dışı matris (ECM) bileşenleri ve sinyal iletim yolağındaki aktivasyon basamaklarını düzenleyerek de kötü prognozda görev almış olurlar [59].

KLK'lar farklı sinyal yolakları ile de etkileşim halindedirler. Ürokinaz tipi plazminojen aktivatör yolağı (uPA), proteazla aktive olan reseptör yolağı (PAR) ve matris metaloproteinazlar (MMP) ile kapsamlı bir moleküler ağ oluşturmaktadırlar. Bu nedenlerle KLK'lar kanser hücrelerinin hayatta kalmaları ve çoğalmaları için birçok farklı biyolojik özellik kazanmalarına izin veren kanser biyobelirteçleridir.

KLK'lar, ekstrasellüler matriksin çapraz bağlamalarını ve doku sertliğini değiştirerek ECM'yi yeniden düzenlerler. Bu da, metastazı kolaylaştırmak için birincil tümör bölgesine kanserle ilişkili fibroblastların, bağışıklık hücrelerinin ve endotelial hücrelerin toplanmasını teşvik edebilir. Kanserde ECM'nin yeniden düzenlenmesi, KLK'ların proteoglikanlar, glikoproteinler, kollajenler ve ECM'ye bağlı faktörler gibi ECM proteinlerini inhibe etme yeteneğinden kaynaklanır; bu da hücre adezyonunda ve sinyalleşmede değişikliklere yol açar [64].

KLK'lar, integrinler ve kaderinler gibi çeşitli hücre yüzey reseptörlerini değiştirerek neoplastik hücrelerin ECM ile hücre sel iletişimini modüle ederler. KLK4–KLK7'nin birlikte eksprese edilmesi, fibronektin ve vitronektine *in vitro* olarak over kanseri hücre adezyonunu azaltmıştır, bu durum ECM bağlanma proteinleri  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  ve  $\alpha \beta 3$  integrinlerin ve mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyalleşmesinin azalmış ifadesine bağlıdır, bu da KLK'nin hücre sel adezyonu düzenlemedeki rolünü göstermektedir. KLK'lar ayrıca, E-kaderin inhibisyonu ile membrana bağlı matriks metaloproteinazları düzenleyerek dolaylı olarak E-kaderin ifadesini azaltabilir [65, 66].



**Şekil 1.7:** A ;KLK'lar kanser hücrelerinin tümör mikroçevresi ile etkileşimini düzenler, B ; KLK'lar tarafından ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesi [64]

Prostat kanseri tanı ve teşhisinde PSA'nın klinik doğruluğunu artırmak amacıyla araştırmacılar, farklı ekspresyon seviyeleri nedeniyle, KLK ailesinin birkaç üyesini (KLK2, KLK4, KLK5, KLK11, KLK14 ve KLK15) prostat kanserinin teşhisinde biyobelirteç olarak değerlendirilmesini umut verici olarak değerlendirmişlerdir. Özellikle KLK2'nin, prostat kanserinin erken teşhisi ve prognozu alanlarında önemli bilgiler sağladığı belirtilmiştir [67].

KLK4 ve KLK15 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri, prostat kanseri doku biyopsilerinde iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) doku biyopsilerine kıyasla her iki genin de aşırı regülasyonunu ortaya koymuştur. Aslında, KLK4 mRNA ve alternatif KLK15 transkriptlerinin ekspresyonu, malign ve benign prostat lezyonlarını ayırt etmek için bağımsız biyobelirteçler olarak kullanılabilirdiği bildirilmiştir [68, 69].

Benzer şekilde, kanser hastalarından alınan prostat iğne biyopsileri, BPH hastalarından alınan biyopsilere kıyasla anlamlı derecede daha düşük KLK5 mRNA ifadesi ve yüksek seviyede KLK11 mRNA ifadesi göstermiştir, bu da onların prostat kanserinin farklı teşhisi ve prognozu için bağımsız biyobelirteçler olarak kullanılabilirdiğini düşündürmektedir [70, 71].

Over kanserlerinde dokularda ve hücre hatlarında KLK ailesinin büyük çoğunluğu (KLK2-KLK11, KLK13-KLK15) anormal bir şekilde eksprese edilir. Over kanserli hastaların serumlarından salgılanan ve tespit edilen KLK seviyeleri, sağlıklı hastaları mevcut serum KLK seviyelerinden önemli ölçüde farklıdır [72]. Özellikle KLK4 ve KLK5 mRNA'larının over kanserinde aşırı eksprese olduğu gösterilmiş ve her ikisi de kötü prognozu işaret etmektedir [73].

Yapılan diğer bir çalışmada KLK4 ekspresyonu, paclitaksel bazlı tedaviye direnç için bir belirteç olarak da görev alabilir. KLK4 ve KLK5 genlerine benzer şekilde, KLK10 ve KLK15, over kanseri için olumsuz prognoz göstergeleri olarak işlev görebilirken, KLK8, KLK9 ve KLK14 hastalığın olumlu prognostik belirteçleri olarak pozitif yönde anlam gösterebilmektedir [74, 75].

Rahim ağzı kanserinde KLK7 ve KLK8 genlerinin ekspresyonu, hem mRNA hem de protein seviyelerinde, primer skuamöz servikal kanser hücrelerinde ve servikal tümör hücre hatlarında yukarı yönlü düzenlenmiştir. Başka bir çalışmada servikal kanserde KLK7 geninin protein miktarlarındaki farklılıkların, kanser prognozunun farklı evrelerinin karakterizasyonu için potansiyel bir biyomarker olarak kullanılabilirdiğini ifade edilmiştir [76].

Kolon kanserinde birçok KLK geninin aşırı ifade edildiği ve çoğunun bu malignitede prognostik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin, düşük KLK10 ve/veya KLK7 mRNA ekspresyonu, uzun süreli hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım ile anlamlı derecede ilişkilidir, bu da her iki genin de kolorektal kanser için olumsuz prognostik belirteçler olarak kullanılabilirdiğini göstermektedir. Kolon kanseri dokularından alınan

örneklerde KLK5, KLK6, KLK7, KLK13 ve KLK14 genlerinin protein seviyeleri, hastaların genel sağkalımı ile anlamlı derecede ilişkili olduğu, ancak bunlardan KLK5, KLK7 ve KLK14 genlerinin evreleme ve derecelendirme gibi sabit prognostik değerlere katkıda bulunabilmektedir [77, 78].

Mide kanserinde yapılan çalışmalarda KLK13 geninin mRNA ekspresyonunun, hastaların daha uzun hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım oranları ile anlamlı olarak ilişkili olduğu belirlenmiş ve olumlu prognostik bir sonuç elde edilmesini sağlamaktadır [79]. Aşırı ifade edilmiş KLK6 ve KLK10 transkripsiyon seviyeleri, mide kanserinde iki olumsuz prognostik gösterge oluşturur ve sadece yüksek KLK6 ekspresyonu gastrik kanser hastalarının daha düşük sağkalım oranı ile ilişkilendirilmiştir [80].

Ayrıca, gastrik kanser hücrelerinde KLK6 geninin ifadesinin azalması, hücrelerin invazivliğinin azalmasına yol açarken, hücrelerde dışarıdan aşırı ekspresyonu, E-kaderin promotorunun aktivitesini azaltarak metastatik potansiyellerini arttırmıştır. Ayrıca, KLK6'nın gen susturma teknolojileri kullanılarak yeni bir terapötik hedef olduğu ileri sürülmüştür [80].

KLK10 ile ilgili olarak, ekspresyonunun malign tümörlerde ve hücre hatlarında normal dokulara kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Huang ve arkadaşları, gastrik kanser progresyonu sırasında KLK10 mRNA ekspresyonunun kaybının veya azalmasının farklılaşma seviyesi ile ilişkili olduğunu ve KLK10 inaktivasyonunun CpG adasının metilasyon yoluyla gastrik tümörlerin kötü prognozuna katkıda bulunabileceğini öne sürmüştür [81].

Meme kanserinde birçok farklı KLK geni ifade olmaktadır. Bunlar arasında KLK4, KLK5, KLK7, KLK10, KLK12 ve KLK14, meme kanseri hastaları için olumsuz prognostik göstergeler oluştururken, KLK3, KLK9, KLK13 ve KLK15, meme kanserinde iyi klinik sonuçları öngörmektedir [82].

Kantitatif gerçek zamanlı PCR kullanılarak yapılan KLK5 mRNA ekspresyon analizi, KLK5 transkripsiyonunun yukarı regülasyonunun, erken evre hastalıkta bile meme kanseri hastalarında kötü prognozu öngördüğünü göstermiştir [83, 84]. Ayrıca, mRNA ekspresyon analizi, benign meme lezyonlarına kıyasla meme kanseri doku örneklerinde KLK5'in aşırı regülasyonunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, KLK5 mRNA, malign ve benign meme tümörlerinin ayırımında bağımsız bir biyomarker olarak hizmet edebilir [85].

Meme kanseri ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada KLK14 geninin mRNA'sının aşırı ekspresyonunun, sağlıklı sağkalım için bağımsız bir prognostik gösterge olduğu bulunmuştur. KLK14 ve KLK4 mRNA pozitif ifadesi, yüksek tümör derecesi ve boyutuyla ilişkilidir [86]. KLK14'ün mRNA verilerine uygun olarak, malign meme tümörlerinde histopatolojik olarak boyaması, hastalığın agresif fenotipleri ile ilişkilidir [87].

Meme kanseri üzerinde kapsamlı bir şekilde araştırılan KLK10 geni tümör başlangıç aşamasında ifadesini kaybetmektedir. Bu veriler sonucunda KLK10 meme kanserinde potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olarak belirlenmiştir [72].

Akciğer kanserinde yapılan çalışmalar KLK'ların tanısal veya prognostik biyomarkerlar olarak kullanılabilceğini önermektedir. KLK8 ekspresyonunun, tümör hücre invazivitesini baskılayarak küçük hücreli olmayan akciğer karsinomasında olumlu bir klinik sonuç sağladığı gösterilmiştir [88]. Nathalie ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada yüksek KLK6 ifadesinin küçük hücreli olmayan akciğer karsinomasında bağımsız bir negatif prognostik faktör oluşturduğunu göstermiştir [89]. Kanser mikroçevresine komşu malign olmayan akciğer dokularına kıyasla, KLK5 ve KLK10, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomasının bir alt tipi olan skuamöz hücreli akciğer karsinomunda fazla eksprese edilirken, KLK7'nin akciğer adenokarsinomunda aşağı yönlü ifade etliği belirlenmiştir [90, 91].

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanısı konan hastalarının serumlarında KLK5, KLK7, KLK8, KLK10 ve KLK12 genlerinin ifadeleri, normal bireylerin serumlarına göre daha düşük iken, KLK11, KLK13 ve KLK14 genlerinin seviyeleri küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının serumlarında daha yüksek oranda bulunmuştur. Özellikle, KLK11 ve KLK12'nin hastalık evresi ile ilişkili olduğu görülmektedir [92].

Akciğer adenokarsinomunda KLK13 geninin mRNA ve protein düzeyinde aşırı ekspresyonu belirlenmesi, pozitif nodal durum oluşumu ve hastaların daha düşük genel sağkalım olasılıkları ile ilişkilendirilirken, KLK14 geninin protein ekspresyonu seviyesi tümör boyutu ile korelasyon durumunda olduğu belirlenmiştir [93].

### **1.5.2 Kallikrein 4 (KLK4)**

KLK4 geni, insan doku kallikrein ailesinin bir üyesidir ve literatürde ARM1, EMSP, PSTS, AI2A1, EMSP1, KLK-L1 ve PRSS17 gibi isimlerle de anılmaktadır. KLK4, protein seviyesinde diğer kallikrein benzeri peptidaz ailesi üyeleriyle %25 (KLK12), %29 (KLK10), %31 (KLK9), %34 (KLK1, 2, 3), %35 (KLK8, 13), %36 (KLK6), %37 (KLK15), %40



(KLK14) ve %43 (KLK7), %45 (KLK5) oranlarında dizisel homoloji paylaşır. KLK1, KLK2 ve KLK3'ün aksine, KLK4, enzimlerin substrat özgüllüğünde önemli olduğu düşünülen ve 3. ekzonda kodlanan 11 amino asitlik "kallikrein döngüsü"ne sahip değildir.

İnsan dokularında yapılan çalışmalar, KLK4 mRNA ifadesinin prostat dokusunda arttığını göstermiştir. Bununla birlikte, daha duyarlı RT-PCR deneyleri, meme, yumurtalık, endometrium, tükürük bezi, akciğer, adrenal bez, kolon, soluk borusu, omurilik, testis, beyin, böbrek, tiroid ve deri gibi dokularda da düşük-orta düzeylerde KLK4 mRNA ifadesi olduğunu ortaya koymuştur [94].

Bir diğer KLK ailesi üyesi olan KLK4 geni, kolon tümörlerinde anormal şekilde ifade edilmiştir. Özellikle, KLK4, HT-29 kolorektal adenokarsinom hücrelerinde PAR1 sinyallemesini indükleyebilir ve dolayısıyla ERK1/2 aktivasyonunu teşvik ederek kolorektal adenokarsinom hücrelerine daha agresif bir fenotip kazandırabilir [95].

Diğer tüm KLK'lar dış salgı proteinleri olup ekstraselüler fonksiyonlara sahipken, KLK4 esas olarak çekirdekte bulunur, bu da onun diğer KLK ailesi üyelerinden farklı bir işlevi olduğunu gösterir [96]. KLK4 ifadesi prostatta yüksek düzeyde bulunur ve androjenler tarafından düzenlenir [97]. Prostat kanseri dokularında ve hücre hatlarında, KLK4 yüksek düzeyde ifade edilir ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve prostat kanserinin kemik metastazında önemli bir rol oynar. KLK4 ayrıca meme kanserinde, over kanserinde ve endometriyal karsinomda yüksek düzeyde ifade edilir ve birkaç kanserin potansiyel bir belirteci olarak kabul edilir [98].

KLK4, prostat dokusu başta olmak üzere hormonlar tarafından düzenlenir. KLK4, çeşitli hormon bağımlı kanserler için potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilir. Özellikle prostat kanserinde KLK4'ün prostat karsinom dokularında normal dokulara kıyasla önemli ölçüde aşırı ifade edildiğini gösterilmiştir. KLK4'ün çeşitli izoformlarda ifade edildiği bilinmektedir. Tam uzunlukta protein 254 amino asit uzunluğundadır, ancak sık ifade edilen izoformu daha kısa olarak 205 amino asit oluşur ve daha iyi bir prostat tümör biyobelirteci olma potansiyeline sahiptir [99].

Kallikrein ailesinin önemli ölçüde farklılaşmış ilk üyesi olan KLK4 geninde sinyal peptidini kodlaması beklenen ekzon mevcut değildir ve bu durum kodlanan proteinin işlevini olası bir şekilde etkiler. KLK4 geninin ekspresyonu prostat kanseri hücre hatlarında birden fazla hormon tarafından düzenlenmektedir ve prostat kanserinin androjen bağımsız fazında

deregüle olur. Bu bulgular, KLK4'ün kallikrein ailesinin benzersiz bir üyesi olduğunu ve prostat kanserinin ilerlemesinde rol oynayabileceğini göstermektedir [100].

KLK4'ün prostat kaynaklı stromal hücrelerde kanserle ilişkili fibroblast özelliklerini indüklediğini, epitelden mezenkimal geçiş (EMT) benzeri özellikler oluşturduğunu ve matriks metalloproteinaz-1'i (MMP-1) aktive ettiğini bildirilmiştir. Bu etkiler bir araya gelerek tümör büyümesini ve metastazı etkileyebilmektedir [101].

KLK4, PAR1'i aktive edebilir ve *in vitro* prostatik miyofibroblast hücrelerinde IL-6 protein ekspresyonunu artırabilir, bu da KLK4'ün parakrin bir düzenleme mekanizması olabileceğini düşündürmektedir [102]. Ayrıca, prostat kanseri kemik metastaz lezyonlarında KLK4 ve PAR2'nin birlikte lokalizasyonu gözlemlenmiştir, bu da KLK aracılı PAR bağımlı etkilerin metastatik bölgelerde de meydana gelebileceğini göstermektedir [103].

Transforme edici büyüme faktör-beta 1 (TGF $\beta$ 1) prostat kanseri ve kemik osteoblast benzeri hücrelerin ortak kültür modelinde KLK4'ün yukarı regülasyonunu aracılık eder. Bu veriler prostat kanseri kemik metastazlarında gözlemlenen yüksek KLK4 seviyelerinin olası bir mekanizmasını göstermektedir [104].

Yapılan diğer bir çalışmada KLK4'ün prostat hücrelerinin hayatta kalmasını düzenlemek için AR ve mTOR sinyalleşmesini modüle ettiği bildirilmiştir ve KLK4'ün baskılanması, prostat kanseri hücrelerini *in vitro* olarak apoptoz indükleyici ajanlara duyarlı hale getirmiştir. Bu sonuçlar KLK4'ün susturulmasının önemli terapötik etkililik sağlayabileceğini göstermektedir [105].

2022 yılında yapılan bir çalışmaya göre böbrek kromofob tümör örneklerinde ve hücre hatlarında KLK4 ekspresyonunun yukarı regüle edildiğini belirtilmiştir. Ayrıca KLK4'ün inhibe edilmesinin kromofob hücre proliferasyonunda ve koloni oluşumunda yavaşlamaya yol açmıştır. Yine aynı çalışmada KLK4 geninin inhibisyonun hücrelerinin göçünü, istilasını ve epitelyal-mezenkimal geçişini (EMT) inhibe ettiği raporlanmıştır. AKT ve ERK yollarının fosforilasyonu, KLK4 geninin susturması ile artmış olduğu gösterilmiştir [106].

Ağız kanseri hücrelerinde miR-378-3p/5p'nin kallikrein ile ilişkili peptidaz 4'ü (KLK4) hedefleyebileceğini doğrulanmış ve KLK4'ün aşırı ekspresyonunun miR-378'in aşırı ekspresyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [107].

Yapılan diğer bir çalışmada hasta gruplarında hem primer prostat kanseri hem de kemik metastazı ile karşılaştırıldığında iyi huylu prostat hiperplazisinde hem KLK4T2 hem de KLK4'ün anlamlı derecede daha yüksek ekspresyonunu bildirilmiştir [108].

## 2. TEZİN AMACI VE KAPSAMI

Gerçekleştirilen literatür taraması sonucunda KLK4 geninin prostat kanserinin gelişiminde birçok farklı süreçlerde etkin bir rol oynadığını belirlenmiştir. Aynı zamanda inflamatuvar sitokinlerden olan IL-6 ve TNF- $\alpha$ , prostat kanseri hücrelerinde çeşitli sinyal yollarını etkileyerek hücre çoğalması, hücre farklılaşması, apoptoz ve lipid metabolizması dahil olmak üzere geniş bir biyolojik sürecin düzenlenmesini modüle edebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

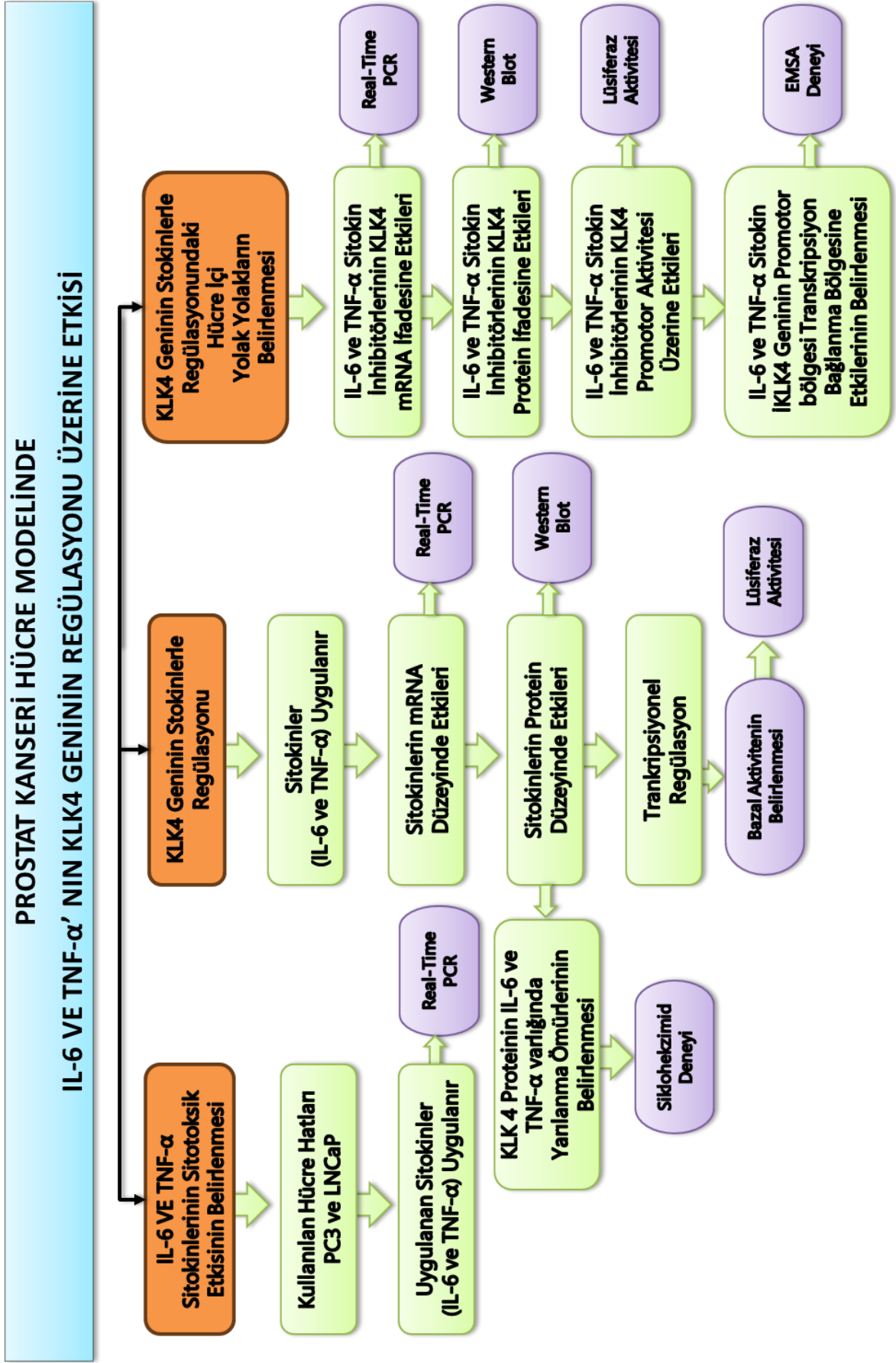
Bu tez çalışması kapsamında, prostat kanseri hücre hatlarında, inflamatuvar sitokinlerden olan IL-6 ve TNF- $\alpha$  ile KLK-4 geninin regülasyonunun aydınlatılması hedeflenmiştir. Tez kapsamın mRNA, protein ve promotor düzeylerinde gerekli deneysel çalışmalar yapılarak belirlenen sitokinlerin KLK4 geninin regülasyonu üzerindeki rolleri araştırılmıştır.

Ayrıca, IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokin varlığında KLK4 geninin hangi hücre içi yollar üzerinden regüle edildiğini belirlemek için mRNA, protein ve promotor düzeyinde Real Time PCR, Westen Blot analizleri yapılmıştır. IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokin varlığında farklı promotör parçalarının transfeksiyon çalışmaları yapılarak en aktif promotör parçasının yolak inhibitör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Olası transfeksiyon bağlanma bölgelerinin belirlenmesi için EMSA (Elektro Mobility Shift Assay) deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Tez planı kapsamında yapılan çalışmalar Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu doğrultuda

- ✓ IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin prostat kanser modeli olan PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında proliferatif etkisinin MTT testi ile belirlenmesi.
- ✓ IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin KLK4 geninin mRNA seviyelerindeki doz ve zamana bağlı değişikliklerini belirlemek için qRT-PCR analizlerinin gerçekleştirilmesi
- ✓ IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin KLK4 geninin protein seviyelerindeki doz ve zamana bağlı değişikliklerini belirlemek için western blot analizlerinin gerçekleştirilmesi.  
IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin varlığında, KLK4 geninin 4 farklı promotör bölgesinin transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi için kalsiyum fosfat transfeksiyonu yöntemi ile analizlerin gerçekleştirilmesi.
- ✓ IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokin varlığında, en fazla aktivite gösteren promotör parçasının inhibitör uygulaması ile salınan sistem lüsiferaz ve SEAP ölçümleriyle etkinliğinin belirlenmesi

- ✓ IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokin varlığında KLK4 geninin protein yarı ömrünün belirlenmesi western blot analizi ile sikloheksimid deneylerinin yapılması.
- ✓ En aktif promotör parçasının IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokin varlığında transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin analizlerinin yapılabilmesi ve tam bağlanma bölgelerinin belirlenmesi için EMSA (Elektro Mobility Shift Assay) deneyleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamındaki çalışmaların iş akış diyagramı

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Materyaller

##### 3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasalların Listesi

Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar Tablo 3.1 verilmiştir. Kullanılan tüm malzemeler moleküler biyoloji alanında yapılan çalışmalara uygun saflıkta temin edilmiştir.

**Tablo 3.1:** Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların listesi

	Malzeme-Kimyasal Adı	Markası
Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	LB Agar Besiyeri	Pronadisa
	LB Broth Besiyeri	Pronadisa
	Ampisilin ve Kanamisin Antibiyotikleri	Sigma
	Gliserol ve CaCl <sub>2</sub>	Sigma
	Petri Kutuları (Steril)	IsoLab
	50 mL ve 15 mL Falkonlar (Steril)	IsoLab
	GeneJET Plasmid Miniprep™ Kit	Thermo
DNA Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	5 U/μL- Taq DNA Polimeraz Enzimi	Thermo
	10X Taq Tamponu (+KCl)	Thermo
	10 mM dNTP karışımı	Thermo
	25 mM-MgCl <sub>2</sub>	Thermo
	Etidyum Bromür, Agaroz	Sigma
	6X Numune Yükleme Boyası-1 kb DNA Marker,	Thermo
	Tris Base, Borik Asit	Sigma
	GeneJET Gel Extraction™ Kit	Thermo
	Restriksiyon Kesim Enzimleri	Thermo NEB
	T4-DNA Ligaz Enzimleri ve Tamponları	Thermo NEB
	5 U/μL- Taq DNA Polimeraz Enzimi	Thermo
	10X Taq Tamponu (+KCl)	Thermo
	10 mM dNTP karışımı	Thermo
	25 mM-MgCl <sub>2</sub>	Thermo
	Etidyum Bromür, Agaroz	Sigma
1 kb DNA Ladder, 6X Yükleme Boyası	Thermo	
Protein Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	G-250-Coomassie Brilliant Blue	Sigma
	R-250-Coomassie Brilliant Blue	Sigma
	Proteaz İnhibitör Tabletleri	Roche
	Fosforik asit, Etanol, Metanol	Merck
	Akrilamid/Bisakrilamid (37.5/1)	Sigma
	Amonyum Persülfat)	Merck
	Tetrametiletildiamin	Sigma
	4X Laemli Örnek Tamponu	BioRad
	β-merkaptoetanol	Merck

Protein Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	Tris, EDTA, Glisin, NaCl EGTA, SDS	Sigma
	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo
	PVDF Membranı	Millipore
	Yağsız Süt Tozu	Santa Cruz
	Tween®-20	Sigma
	KLK4 Mouse Monoklonal Antikor	Santa Cruz
	β-aktin Mouse mAb	Cell Signaling
	m-IgGκ BP-HRP (Sekonder Antikor)	Santa Cruz
Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	Pierce™ ECL	Thermo Scientific
	Dulbecco's Modified Eagles Medium	Gibco, EuroClone
	FCS-Fetal Calf Serum	Gibco
	EDTA (Etilendiaminetetraasetik Asit)	Sigma
	L-Glutamin, Tripsin	Sigma
	RPMI-1640	Sigma
	PBS (Phosphate Buffered Salin)	VWR Life Science
	Pastör Pipeti (3 mL, Steril)	IsoLab
	Serolojik Pipetler (10 mL ve 25 mL, Steril)	Sarstedt
	Flasklar (25 cm <sup>2</sup> ve 75 cm <sup>2</sup> , Steril)	Sarstedt
	Steril Filtreler (0,22 µm ve 0,45 µm)	Sartorius
	DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma
	Tripan Mavisi	Sigma
	Ependorflar	IsoLab
	BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
	Penisilin-Streptomisin Solüsyon (100X)	Gibco
	Antibiyotik-Antimikotik Solüsyon (100X)	Gibco
	Hücre Kültürü Plaka (96, 24, 12, 6 Kuyucuklu)	Sarstedt
Sitokin ve İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	MTT	Sigma
	HCl, İzopropanol	Sigma
	TNF-α-Tümör Nekroz Faktör	PeptoTech
	IL-6 (İnterlökin)	PeptoTech
	PD169316-p38 MAP kinaz inhibitörü	Sigma
	SP600125-JNK inhibitörü	Santa Cruz
	PD98059-MEK1 inhibitörü	Cell Signaling
Wortmannin-PI3K inhibitörü	Cell Signaling	
Transfeksiyon Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	HEPES	Sigma
	NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub>	Sigma
	X-tremeGENETM HP DNA Transfect. Reagent	Roche
	Ready-To-Glow™ Dual Sec. Reporter Ass.	Takara Clontech
	Lusiferaz ve SEAP Substratları	Takara Clontech
RNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	384 Kuyucuklu Plaka	Corning
	DEPC (Dietil Pirokarbonat)	Sigma
	GeneJET RNA Purification TM Kit	Thermo Scientific
	MOPS (3-(N-morpholino) propansülfonik asit)	Merck
	β-merkaptotanol, Formaldehit	Merck
	İnsülin Enjektörü (Steril)	Bd Micro-Fine
	Etanol	Merck
NaAc (Sodyum Asetat), EDTA	Sigma	
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Sigma	



**Tablo 3.1** (devamı)

RNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	Agaroz, Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma
	Oligo(dT)	Thermo
	dNTP Karışım	Thermo
	RiboLock RNaz İnhibitörü	Thermo
	RevertAid Reverse Transkriptaz Enzimi	Thermo
	Reverse Transkriptaz Tamponu (5X)	Thermo
	RealQ Plus 2X Master Mix Green	Ampliqon
	96 Kuyucuklu Plaka (Beyaz) Light-Cyclers 480	Roche Life Science
	96 Kuyucuklu Plaka Jelatini	Thermo

### 3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Cihazlarının Listesi

Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar Tablo 3.2 verilmiştir. Kullanılan tüm cihazların kalibrasyon ve kontrolleri gerekli prosedürlere uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.2:** Deneysel çalışmalarda kullanılan Laboratuvar cihazlarının listesi

Cihaz Adı	Marka/Modeli
Laminar Air Flow	Telstar Bio II
CO <sub>2</sub> 'li İnkübatör	Nuaire
-80 °C Dondurucu	Thermo
Ultrasonik Su Banyosu	PlusLab
pH Metre	Hanna
Su Banyosu	Elektromag
Buzdolabı, Mikrodalga Fırın	Arçelik
Isıtıcı Blok	FALC
Isıtıcı Manyetik Özellikli Karıştırıcı	Velp Scientifica
Terazi	Sartorius
Otoklav Cihazı	Hirayama
Buz Makinesi	Hoshizaki
Çalkalamalı Etüv	WTB
Çalkalamalı İnkübatör (Isı Ayarlı)	GFL
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Otomatik Pipetler	Thermo
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Hanil Science
Döner Hareketli Çalkalayıcı	Thermo
Yatay Karıştırıcı	GFL
Ultra Distile Su Cihazı	Human Cor.
Ultra Viyole Görüntüleyici Sistem	Vilber L.
Görüntüleme Sistemi	BioSpectrum
Mikro Santrifüj	Thermo
Elektrikli Pipet Aleti	IsoLaboratory
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell P.

**Tablo 3.2** (devamı)

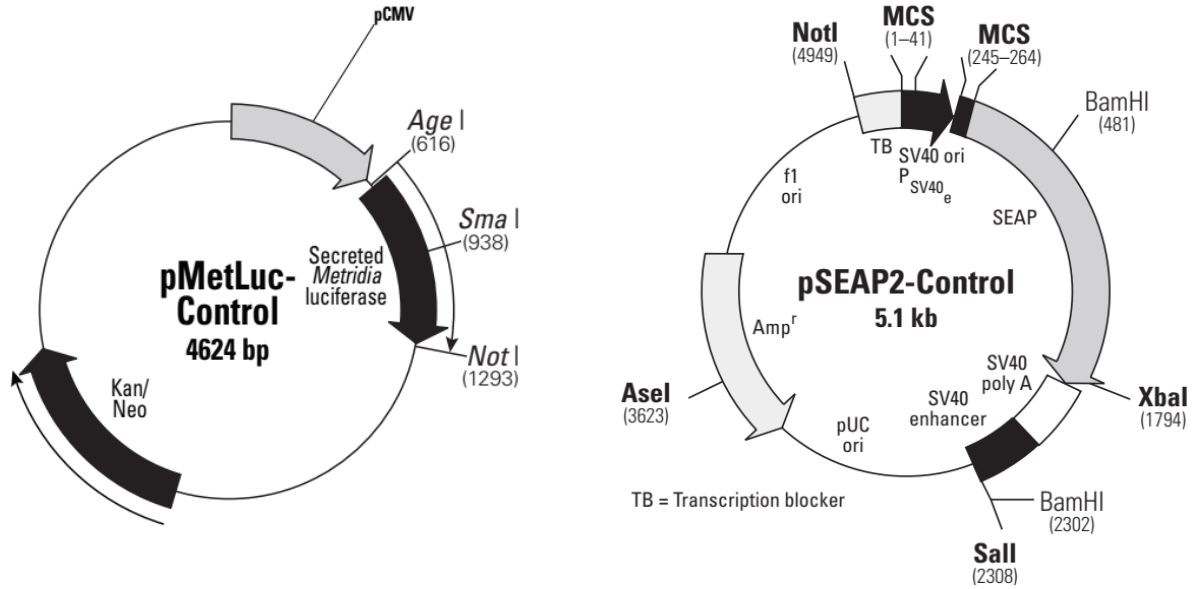
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex
PCR Cihazı	Techne Progene
Real Time PCR Cihazı-Cycler 480)	Roche Life Science
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo
µDrop™ Plate, Spektro	Multiskango, Thermo
Luminometre	Thermo
SDS PAGE Aparatları	BioRad
Flow Sitometri	Guava

### 3.1.3 Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Bakteri Soyları

Transformasyon sonrasında stokların oluşturulması amacıyla çeşitli *E. coli* JM109 soyu hücreler kullanıldı.

### 3.1.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Vektörler

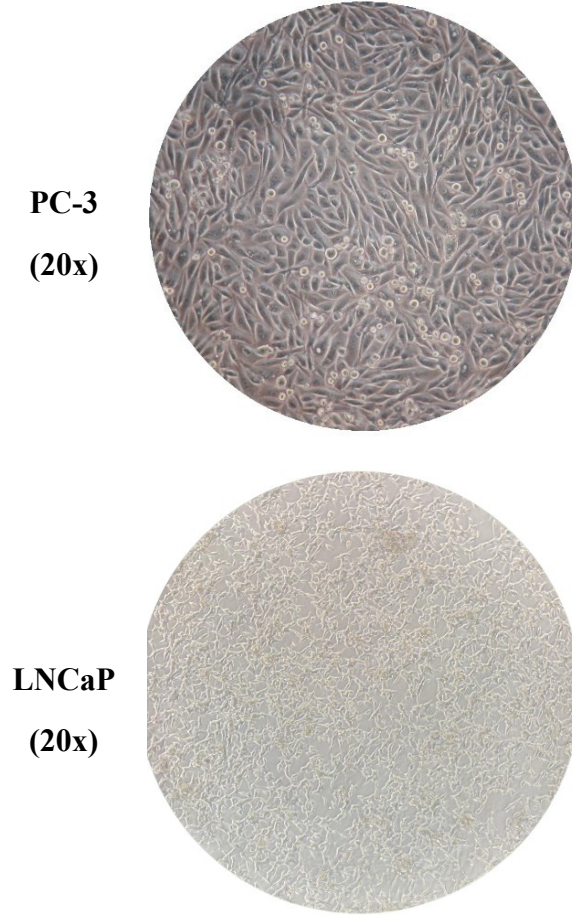
Transfeksiyonun verimliliğini belirlemek amacıyla pMETLuc-kontrol (Clontech) vektörü pozitif kontrol olarak, pSEAP2-kontrol (Clontech) vektörü ise normalizasyon amaçlı kullanılmıştır (Şekil 3.1). Yapılan transfeksiyon çalışmasında belirlemek için negatif kontrol olarak (boş) pMETLuc-reporter vektörü kullanıldı.



**Şekil 3.1:** pMETLuc-kontrol ve pSEAP2-kontrol vektörlerinin şematik gösterimi

### 3.1.5 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Soyları

Yapılan çalışmalarda prostat kanseri hücre hatları olan androjen bağımsız PC-3 (ATCC no: CRL-1435) ve androjen bağımlı LNCaP (ATCC no: CRL-1740) hücre soyları kullanıldı.



Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan hücre hatları

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin, Ortamın Temizliği ve Sterilizasyonu

Deneysel sırasında kullanılan poliüretan malzemeler, 121°C'de 20 dakika boyunca steril edilir. Bu işlem ependorf tüpleri, pipet uçları ve diğer malzemeler için geçerlidir. Aynı protokolle solüsyonlar da steril edilir. Ancak yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmayan solüsyonlar için 0.22 µm'lik filtre kullanılarak sterilizasyon yapılır. Hücre kültürü laboratuvarı her hafta periyodik olarak virkon ve etil alkol ile düzenli olarak dezenfekte edilir. Rutin periyotlarda, hem hücre kültür laboratuvarı hem de kültür kabininin içi kullanıma başlanmadan önce en az 15 dakika boyunca UV lambası açılarak sterilizasyon

sağlanır. RNA tabanlı deneysel çalışmalarda ise olası RNAaz aktivitesinden kaçınmak amacıyla %0.1'lik DEPC'li steril su kullanılır.

### **3.2.2 Bakteri Çalışmaları ile İlgili Teknikler**

#### **3.2.2.1 Sıvı ve Katı Besiyerinin Hazırlanması**

Katı besiyeri için Luria Broth agar, sıvı besiyeri için ise Luria Broth kullanıldı. Firmaların geliştirdiği protokoller uygun olarak belirlenen miktarlarda hem sıvı hemde katı besiyeri için hesaplamalar yapıldı. Katı besiyeri distile suda çözüldürüldü ve 121 °C'de 20 dk. boyunca otoklavlanarak sterilizasyon protokolü uygulanmış oldu. Otoklavdan alındıktan sonra yaklaşık 50-55 °C'ye kadar soğuması beklendi. Daha sonra bek alevi eşliğinde besiyerindeki son konsantrasyonu 100 µg/mL ampicilin veya 30 µg/mL kanamisin olacak şekilde besiyerlerine ilave edilerek karıştırıldı. Elde edilen agar karışımı petri kaplarına döküldü ve serin bir ortamda katılaşması için beklendi. Herhangi bir su buharı oluşmaması için gerekli süre tamamlandıktan sonra petrilerin etrafı parafilm ile sarılarak ters çevrildi ve ışık almayacak bir şekilde +4 °C'de muhafaza edildi. Sıvı besiyeri olarak kullanılan L. Broth firmanın belirlediği oranlarda son hacim 1L olacak şekilde su içerisinde çözüldü. Katı besiyerinde olduğu gibi 20 dk. boyunca 121 °C'de otoklavlanarak sterilizasyonu yapıldı ve +4 °C'de stoklandı. Benzer şekilde katı besiyerinde olduğu gibi LB sıvı besiyerinde de son konsantrasyonu 100 µg/mL ampicilin veya 30 µg/mL kanamisin olacak şekilde antibiyotik ilave edildi.

#### **3.2.2.2 Kompetent Hücre Hazırlanması**

Trasformasyon deneylerinde kullanılmak üzere kompetent yapılacak *E. coli* (JM109) hücreler -80 °C'deki gliserol stoğundan alınarak LB agar içeren steril petrilere sabit tek koloni olacak şekilde ekimi yapıldı. Ardından 37 °C'de bir gece inkübasyonu bırakıldı. Son hacim 20 mL olacak şekilde LB sıvı besiyerine tek koloniden ekim yapıldı. Ekimden sonra çalkalamalı etüvde bir gece 37 °C'deki inkübasyona bırakıldı. Toplam hacminin yaklaşık 3 katı büyüklüğünde olan steril erlene konulan 100 mL LB besiyerine önceden hazırlanan ön kültürden 15 mL ekilerek tekrar 37 °C'deki çalkalamalı etüv kullanılarak inkübasyona bırakıldı. Belirli aralıklarla spektrofotometre yardımıyla absorbans ölçümleri alınarak OD<sub>600</sub> değeri 0.5-0.6 oluncaya kadar inkübasyon süreci takip edildi.

İstenilen OD<sub>600</sub> değeri elde edilince süspansiyon bek alevi altında 50 mL'lik steril falkon tüplere aktarıldı. Falkon tüpler 3.000 rpm'de +4 °C'de 5 dk. boyunca santrifüj edildi ve

santrifüj sonrası üstteki sıvı uzaklaştırıldı. Falkon tüte kalan pellete bakteri süspansiyonu başlangıçta elimizde olan hacmin yarısı kadar 0.1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi eklendi ve hafifçe pellet çözüldü. Daha sonra falkonda bulunan hücre süspansiyonu yaklaşık 25 dk. boyunca buzda bekletildikten sonra 5 dk +4°C'de 3.000 rpm'de. santrifüj yapıldı ve santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellete ilk başlangıç hacminin toplamda 1/10'u kadar 0.1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi ilave edilerek hafifçe çözülmesi sağlandı. Devamında buz üzerinde 1-4 saat kadar inkübasyona bırakıldı. Daha sonra %40'lık soğuk gliserol ilave edilerek karıştırıldı. Elde edilen elüatlar etiketlenerek daha önceden buz üzerinde soğutulmuş, 1.5 mL'lik ependorflara 200'er µL son hacim olacak şekilde paylaştırıldı ve ardından -80 °C'de stoklandı [109].

### **3.2.2.3 Transformasyonu**

-80 °C'de stoklanan kompetent hücrelerin gliserol stokları ön hazırlık için buz üzerine konarak çözünmesi için 5-10 dk. bekletildi. 1.5 mL'lik ependorf tüp içerisine 200 µL kompetent hücre ve üzerine transforme edilmek istenen plazmitten 1-5 µL eklendi. Bu karışım yaklaşık 40 dk. buz üzerinde bekletildi. İnkübasyon sonunda hızlı bir şekilde gerekli transformasyonun gerçekleşebilmesi için ependorf tüp 2 dk boyunca 42°C'deki su banyosunda bekletilerek ısı şoku uygulandı. Ardından hiç vakit kaybetmeden ısı şoku uygulanan tüp 2 dk. buz üzerinde bekletildi. Daha sonra tüpe 37 °C'de önceden ısıtılmış LB besiyerinden 800 µL eklendi ve hücreler. 37 °C'deki çalkalamalı etüvde 90 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda elde edilen kültürün 100 µL'si, içerisinde aktarılan plazmitin dirençli olduğu antibiyotik bulunan LB agarlı petrilere yayıldı. Geriye kalan transformasyon kültürü 5 dk. boyunca 4.000 rpm'de santrifüj edilerek 100 µL LB besiyerinde çözüldü ve diğer petrilere yayıldı. Daha sonra hücrelerin büyümesi için 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı.

### **3.2.2.4 Gliserol Stok Hazırlanması**

Transformasyon sonrasında seçimi yapılan kolonilerden antibiyotikli 20 mL LB besiyerine ekim yapıldı. Bir gece 37°C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edilen kültür eşit hacimde tüplere dağıtılarak %30'luk steril gliserol eklendi ve -80 °C'de stoklandı.

### **3.2.2.5 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu**

-80 °C'deki gliserol stoktan LB agara tek koloni ekimi yapılarak bir gece 37 °C'de inkübasyonu gerçekleştirildi. Ön kültür için tek koloniden 20 mL LB besiyerine ekim

yapılarak bir gece 37 °C'deki çalkalamalı etüv kullanılarak inkübe edildi. Ön kültürün 1/1000'i alınarak seçici antibiyotigi içeren 100 mL LB medyuma ekildi ve bir gece (16 sa.) 37°C'deki çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan son kültürden plazmit izolasyonu Midi-NucleoBond Xtra™ kitinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. İzole edilen plazmit DNA spektrofotometre ile miktarı belirlendikten sonra -20 °C'de saklandı.

### 3.2.3 DNA ile İlgili Teknikler

#### 3.2.3.1 DNA Miktar Tayini

Spektrofotometrede 260-280 nm dalga boylarındaki absorbans sonuçları izole edilen DNA'nın miktarını ve saflığını belirler. Gerekli ölçümlerin yapılabilmesi için DNA örneklerinden 2 µL ve elde edilen sonucun değerlendirilebilmesi için kör olarak ise 2 µL distiel su kullanılır. Örnekler ve kör µDrop™ plakaya konulur ve ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri hesaplanarak DNA miktarı ve saflığı belirlendi. Bu veriler şu formüller kullanılarak hesaplandı.

$DNA\ miktarı\ (ng/\mu L) = A_{260} \times 50\ ng/\mu L \times (10\ mm/0,49\ mm)$
$Saflık = A_{260} / A_{280}$

#### 3.2.3.2 Primer Tasarımı

www.restrictionmapper.org, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ve www.idtdna.com internet adreslerinden yararlanılarak primer tasarımı gerçekleştirildi. Tasarlanan primerlerin Tm sıcaklıklarının birbirine yakın değerlerde olması, tasarlanan primerlerin saç tokası formu oluşturmamasına ve nükleotitlerin dengeli dağılımına dikkat edildi. Primerlerin yanlış eşleşme olasılığını önlemek için, insan KLK4 geni ile en yüksek benzerliği gösterdiği belirlenen DNA sekanslarına BLAST yapıldı.

#### 3.2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonu için 50 µL'lik bir hacim kullanıldı. Kalıp DNA olarak yaklaşık 200 ng nükleik asit ve her bir primer için 2 µM son konsantrasyonda önceden gene özgü olarak tasarlanmış primerler kullanıldı. Reaksiyon karışımına içeriğinde 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, %1 (v/v) Triton X-100 ve pH 9 olan 1X Tampon (Thermo), 200 mM dNTP ve 2,5 birim Taq DNA polimeraz (Thermo) eklendi. Farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında, 1 mM, 2 mM ve 4 mM olacak şekilde her bir PCR reaksiyonu için kurularak optimize edildi.

Reaksiyon karışımına 10X Taq polimeraz tamponundan 5 µL ve 5 U/µL Taq polimeraz enziminden 0.5 µL eklendi. PCR sonuçları agaroz jel üzerinde görselleştirildi. PCR döngü koşulları Tablo 3.3'te belirtildiği şekilde uygulandı.

**Tablo 3.3:**PCR döngü koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94°C	60 sn.
2	30	94°C	60 sn.
		55°C	60 sn.
		72°C	60 sn.
3	1	72°C	10 dk.

### 3.2.3.4 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA'yı jelde görselleştirmek için %1'lik bir agaroz jel hazırlandı. Bunun için 1 gram agaroz, 0.5X TBE tamponunda eritilip tamamen homojen hale getirildi ve sonrasında 50°C'ye kadar soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür ilave edilerek çeker ocak içerisinde karıştırıldı. Hazırlanan solüsyon jel tankına döküldü ve polimerleşmesi beklenildi. Elektroforez tankı, 0.5X TBE tamponu ile dolduruldu. İlk olarak 1 kb DNA marker ilk kuyucuğa yüklendikten sonra, örnekler 6X yükleme boyası ile karıştırılarak kuyulara yüklendi. 40 dakika boyunca 90 volt akımda elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, UV görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı. Çoğaltılan DNA bantları, UV görüntüleme cihazı üzerinde dikkatlice jelden kesilerek geri alındı. Geri kazanılan DNA, DNA jel ekstraksiyon kiti (Thermo) kullanılarak bir miktar agaroz jelde tekrar yürütülerek kontrol edildi.

**Tablo 3.4:** DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Çözelti	Hazırlanışı
5X TBE Tamponu	445 mM Tris Base-Borik asit ve 10 mM EDTA içeren (pH 8,3) çözelti hazırlanarak 54 g Tris Baz, 27,5 g Borik asit ~900 mL dH <sub>2</sub> O'da çözüldü ve üzerine 20 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) eklendi. pH 8,3'e ayarlanıp son hacim 1 L'ye tamamlandı. Otoklavlanıp kullanıma hazır hale getirildi.
Et-Br Stok Çözelti	Son konsantrasyon 10 mg/mL olarak hazırlanarak ve ışık almayan bir yerde +4 °C'de saklandı.
1 kb DNA Marker	1 µL (DNA ladder) : 1 µL (Yükleme boyası) : 4 µL (dH <sub>2</sub> O) oranına dikkat edilerek hazırlandı.

### **3.2.3.5 AgaroZ Jelden DNA'nın Saflaştırılması**

Agaroz jelden geri kazanılmak istenilen DNA bantları etrafından yakın bir alandan kesim yapılarak bantlar jelden çıkarıldı. Jelden DNA'nın geri kazanılması GeneJET Gel Extraction™ kitinin önerdiği protokole göre gerçekleştirildi. Agaroz jel parçalarının miktarları hesaplanarak -20 °C'de stoklandı.

### **3.2.4 Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler**

#### **3.2.4.1 Hücre Kültürü Serumunun Hazırlanması**

Hücre kültüründe kullanılacak olan fetal sığır serumu ticari olarak temin edildi. Temin işlemleri soğuk zincire uyarak yapıldı ve -20°C'de saklandı. Ticari olarak temin edilen stok serum, ilk kullanımdan önce buzdolabında +4°C'de bir gece bekletilerek buzlarının üzülmesi sağlanarak homojen bir hale getirildi. Daha sonra 56 °C'de 60 dakika ısı ile inaktive edilerek kullanıma hazır hale getirildi. Laminar flow kabin içerisinde 50 mL'lik steril falkonlara alikotlanıp ağızları parafilmlenerek -20 °C'de muhafaza edildi.

#### **3.2.4.2 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması**

Hücre kültürü çalışmalarında besiyeri ortamı olarak LNCaP hücreleri için RPMI-1640 MEDIUM ve PC3 hücreleri için ise DMEM Dulbecco's Modified Eagles Medium kullanıldı. Her iki besiyeride ticari olarak temin edilip +4°C'de stoklandı. DMEM bileşiminde L-Glutamin yoksa, kullanım öncesinde, L-Glutamin (200 mM steril stoğundan) %1 olacak şekilde (son konsantrasyonu ~ 2mM) eklendi. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre hatları için son hacime oranla %10 FCS ilave edildi. Besiyerlerinde antibiyotik kullanılacağı durumlarda 100X'lik penisilin-streptomisin solüsyonundan son konsantrasyonu 1X olacak şekilde ilave edildi.

#### **3.2.4.3 Hücre Kültüründe Kullanılan zeltilerin Hazırlanması**

Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılacak olan zeltiler PBS (1X) (Phosphate Buffered Salin) zeltisi ticari olarak tablet şeklinde tedarik edilerek, üzerinde yazan protokole uygun bir şekilde (bir tablet 100 mL dH<sub>2</sub>O'da üzülerek) hazırlandı. zelti hazırlandıktan sonra otoklavlararak steril edildi ve +4°C'de stoklandı. Hücreleri flasklardan kaldırmak için Tripsin-EDTA (TE) zeltisi kullanıldı. 1X PBS içinde %0.25 (w/v) tripsin ve 0.53 mM EDTA içeren zelti hazırlanarak 0.22 μm'lik membran filtreden geçirilerek steril edildi ve 50 mL'lik falkonlara aikotlanarak -20 °C'de stoklandı. Son olarak hücre



sayımında kullanılmak üzere Tripan Mavisi hazırlandı. 1X PBS içinde %0.4 (w/v) tripan mavisi çözeltisi olacak şekilde 0.4 g tripan mavisi 80 mL PBS'de çözülerek manyetik ısıtıcıda yavaş yavaş kaynatıldı. Kaynatma işlemi sonunda oda sıcaklığında soğuması beklenip PBS ile son hacmi 100 mL'ye tamamlandı. 2 mL'lik ependorflara alikotlanarak oda sıcaklığında saklandı.

#### **3.2.4.4 Hücre Soyunun Başlatılması, Pasajlanması ve Dondurulması**

Hücre kültürü çalışmalarının tamamı laminar flow kabinde gerçekleştirildi ve yapılacak olan deney başlamadan önce tüm kabin ve ekipmanlar %70'lik alkol ile steril edilerek kullanıldı. Kullanılacak olan besiyerleri, tripsin-edta ve PBS ve diğer çözeltiler 37 °C'deki su banyosunda kullanıma hazır hale getirildi.

Stok olarak -80 °C'de saklanan hücrelerden çalışılacak hücre hattı belirlenip dondurulmuş halde stoktan alınarak 37 °C'deki su banyosunda yaklaşık 2 dk. bekletilerek hızlı dengeli bir şekilde erimesi sağlandı. Eriyip hale gelen hücreler 15 mL'lik steril falkonlara alınarak üzerlerine yaklaşık 5-6 mL %10'luk FCS'li besiyeri eklendi. Hızlı bir şekilde vakit kaybetmeden falkon içerisinde bulunan hücre süspansiyonu 1.000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi. Daha sonra kabine alınan örneklerden süpernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan hücre pelleti 1-2 mL %10'luk FCS'li besiyeri süspanse edildi. Çözünemeyen hücre hatları için otomatik pipetler ile çözünmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu kültür çalışmaları için özel olarak üretilmiş steril ve tek kullanımlık 10 cm çapındaki petri kaplarına aktarıldı ve %10'luk FCS'li besiyeri eklenerek petri kabı son hacmine 10 mL'ye tamamlandı. Petri kapları üzerine gerekli etiketlemeler yapılarak hücrelerin büyüüp çoğalması için 37 °C'deki %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı.

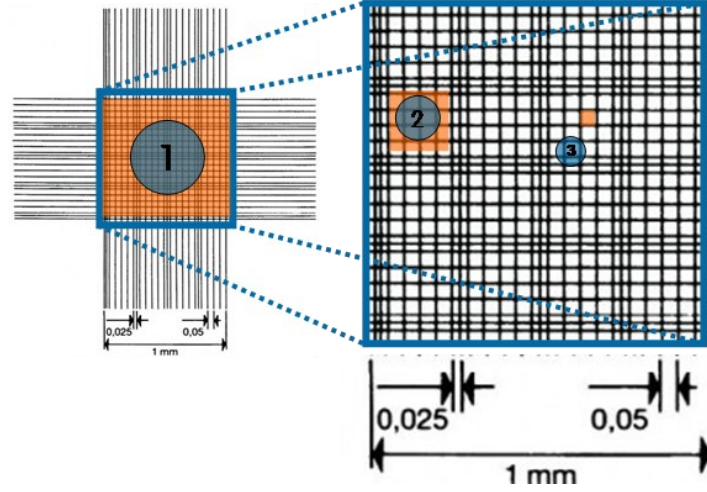
Hücreler düzenli aralıklarda inverted mikroskopta incelenerek ve petri kapları tabanını %80-95 oranında kapladığında pasajlama işlemine başlandı. İlk olarak petri kapları içindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandı (LNCaP hücreleri hariç). Ortamdan uzaklaştırılan PBS'ten sonra hücreleri tuttukları petri kabının yüzeyden ayırmak amacıyla petrilere 2'şer mL Tripsin-EDTA (TE) eklenerek petrilere inkübatöre kaldırıldı. Yaklaşık 5 dk. tripsinizasyonla hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmaya çalışıldı. Belirlenen süre sonunda petri kaplarına 4 mL hacimde %10'luk FCS'li besiyeri eklenerek tripsinin inaktif hale gelmesi sağlandı. Elde edilen hücre süspansiyonu steril 15 mL'lik falkona aktarılarak 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Falkonlardaki

süpernatant uzaklaştırılarak, geriye kalan hücre pelleti %10'luk FCS'li besiyeri ile çözüldü. Elde edilen süspansiyon 2 yada 3 petri kabına eşit olarak paylaştırıldı ve %10'luk FCS'li besiyeri ile son hacim 10 mL olacak şekilde tamamlandı. Petriler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'deki inkübatöre kaldırıldı.

Olası hücre kayıpları sonucunda stok sorunu yaşanmaması için tekrar kullanabilme amacıyla hücre soyları gerekli prosedürlere uymak koşuluyla dondurularak saklandı. Yukarıda anlatılan hücrelerin pasajlanması protokolüne uygun olarak sağlıklı bir şekilde proliferasyon yapan hücreler petri kabının yüzeyini %80-95 oranında kaplayan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı. Devamında hücreler 2 kez 1X PBS kullanarak yıkandı ve ortamdan uzaklaştırılan PBS'tans sonra TE eklenerek yüzeyden hücreler tutundukları yüzeyden kaldırıldı. %10'luk FCS'li besiyeri eklenmesiyle tripsin inaktivasyonu sağlandıktan sonra hücre süspansiyonu 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üste kalan süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet, 1 mL %10 (v/v) DMSO içeren FCS ile süspansiyon haline getirilerek önceden etiketlenmiş cryovial tüplere konuldu ve -80 °C'de dondurularak stoklandı.

#### **3.2.4.5 Hücre Canlılığının Belirlenmesi ve Hücre Sayımı**

Hücre kültürü tabanlı yapılan çalışmalar için canlı hücre sayısı belirlendi. Bu amaç doğrultusunda doğru bir sayım gerçekleştirebilmek için tripan mavisi ve Thoma lamı (bk. Şekil 3.3) kullanıldı. Hücre pasaj protokolüne uygun olarak Bölüm 3.2.4.4'de belirtildiği şekilde hazırlanan hücre pelleti, 5-10 mL %10'luk FCS'li besiyeri ile homojen bir şekilde çözünerek süspansiyon haline getirdi. Bu hücre süspansiyonunun 50 µL'si ependorf tüpe konuldu ve üzerine eşit hacimde (1'e1) tripan mavisi eklendi. Bu süspansiyon iyice karıştırılarak boya-hücre etkileşimi artırıldı. 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra az bir miktar pipetaj yapılarak homojenliği tekrar sağlanan hücre süspansiyonundan 10 µL alınıp Thoma lamına aktarıldı ve inverted mikroskop altında gerekli hücre sayımı gerçekleştirildi. Mikroskop altında sayım yapılırken tripan boyasını içine alan mavi hücreler ölü, boyayı içine almayan parlak beyaz hücreler ise canlı kabul edildi. Thoma lamının belirlenen alanındaki hücreler sayılarak mL'deki toplam hücre sayısı belirlendi. Toplam hücre sayısının hesaplanmasında "Canlı hücre sayısı (mL'deki) = Alandaki canlı hücre sayısı x 2 x 10<sup>4</sup>" formülü kullanıldı [110].



**Şekil 3.3:** Thoma lamı şematik gösterimi

#### 3.2.4.6 Sitokin Deneylerinin Kurulması

Flask güvenilir kabine alındıktan sonra kapağı açılıp kullanılan besiyeri petri kabından uzaklaştırıldı. Petrideki hücreler 5mL PBS il 2 kere yıkandıktan sonra ortamda hiç PBS kalmaması sağlanmış oldu. Hücreleri tutundukları yüzeyden kayıp yaşamadan kaldırmak amacıyla 2 mL tripsin-EDTA petriye eklendi. 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 5 dk. inkübasyona bırakıldı. Daha sonra etüvden çıkarılan hücre kültürü, petri kabındaki tripsinin reaksiyonunu bitirmek amacıyla petriye uygulanan tripsin-EDTA oranının 2 katı olacak şekilde 4 mL besiyeri eklendi. Petrinin içinde 6 mL olan hücre süspansiyonu 15mL hacmindeki steril falkona alınarak, hücreler 1000rpm de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra, 10 mL %10 FCS içeren medyumda homojen bir şekilde çözülen hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için belirlenen protokole uygun olarak, 10 µL hücre süspansiyonu elde bulunan miktarla aynı hacimde tripan mavisi ile (1:1 seyreltme oranında) 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu sürecin ardından ölü ve canlı hücreler belirlenmiş ve gerekli sayım yapılmıştır.

Belirlenen değerler doğrultusunda, %10 FCS içeren besiyeri kullanılarak 6'lı well plakalarına 250-300 bin hücre alınmıştır. Hücrelerin yüzeye yapışması için 2 gece beklenmiş ve daha sonra mikroskopta yapıştıkları doğrulanmıştır. Yüzeye sağlam bir şekilde yapışan hücrelerin besiyeri, %0.1 BSA içeren RPMI ile değiştirilmiştir. 1 saatlik bir inkübasyonun ardından, TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinleri uygulanmış ve son konsantrasyonları 20 ng/mL olarak ayarlanmıştır.

### 3.2.4.7 Yolak İnhibisyon Deneylerinin Kurulması

Flask güvenli bir kabine alındıktan sonra kapağı açılarak kullanılan besiyeri petri kabından uzaklaştırıldı. Petrideki hücreler, 5 mL PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra ortamda hiç PBS kalmadığından emin olundu. Hücreleri tutundukları yüzeyden kaldırmak amacıyla 2 mL tripsin-EDTA petriye eklendi ve 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra etüvden çıkarılan hücre kültürü, tripsin tepkimesini sonlandırmak için petriye uygulanan tripsin-EDTA oranının 2 katı olacak şekilde 4 mL besiyeri ile işlem gördü. Petrinin içindeki 6 mL olan hücre süspansiyonu, 15 mL hacmindeki steril falkona alınarak, hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj basamağı tamamlandıktan sonra, 10 mL %10 FCS içeren medyunda homojen bir şekilde çözüldü. Ölü veya canlı hücreleri birbirinden ayırt etmek için belirlenen protokole uygun olarak, 10 µL hücre süspansiyonu tripan mavisi ile eşit hacimde olacak şekilde (1:1 seyreltme oranında) 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlem sonunda ölü ve canlı hücreler belirlenerek gerekli sayım yapıldı.

Hesaplanan değer sonucunda %10 FCS içeren besiyeri kullanılarak 6'lı well plakalara 250-300 bin hücre olacak şekilde alıktlandı. 48 saat boyunca hücrelerin petri yüzeyine yapışması beklenirken, sonrasında hücrelerin petri kabının yüzeyine tutunduğu veya tutunmadığı mikroskopta görüntülenerek kontrol edildi. Yüzeye yapışan hücrelerin besiyeri %0.1 BSA içeren DMEM ile değiştirildi. 1 saatlik inkübasyon süresinden sonra son konsantrasyonu 20 ng/ml olacak şekilde TNF-α ve IL-6 sitokinleri uygulandı. Petri tabanına tutunan hücrelerin besiyeri %0.1 BSA içeren DMEM ile değiştirildi ve ardından 45 dakika sonra inhibitörler PD98059 (MEK), SP600125 (JNK), NF-κB, PD169 (20µM), WORTMANNIN (2 µM) eklenip 1 saatlik inkübasyondan sonra son konsantrasyonu 20 ng/ml olacak şekilde TNF-α ve IL-6 sitokinleri uygulandı.

**Tablo 3.5:** İnhibitör Listesi

<b>İnhibitörler</b>	<b>Son Konsantrasyon</b>
PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü)	5 µM
SP600125 (JNK inhibitörü)	20 µM
PD98059 (MEK inhibitörü)	10 µM
Wortmannin (PI3K inhibitörü)	1 µM
Nfkb İnhibitörü	20 µM

### 3.2.5 Transfeksiyon Çalışmaları ile İlgili Teknikler

#### 3.2.5.1 Geçici Transfeksiyon (Kalsiyum-Fosfat)

Çalışmalarında kullanılacak olan hücre hattı birkaç kez pasaj yapılarak büyütüldü ve mL' sindeki canlı hücre sayısı belirlendikten sonra 96'lık well platalere 30 bin hücre olacak şekilde paylaştırılıp bir gece inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyona başlamadan önce kullanılacak olan tüm çözeltiler (bk. Tablo 3.5) oda sıcaklığına bekletilip herhangi bir çökme olup olmadığı kontrol edildi. 96'lık plaka için son hacim 200 µL olan çözelti A (31,5 µL, 2,5 M CaCl<sub>2</sub> ve ~10 µg DNA) ve Çözelti B (2X HeBS) belirlenen oranda ependorf tüplerde hazırlandı. Farklı plakalar için gereken çözelti A ve B bileşenleri Tablo 3.5'te verilmiştir. Çözelti A dikkatli bir şekilde pastör yardımıyla hava kabarcığı oluşturulan çözelti B'ye belirli periyotlarda damla damla eklendi. Bu transfeksiyon ortamı presipitasyonun oluşması için oda sıcaklığında 30-60 dk. inkübe edildi.

Uygulanan protokolün devamında DNA:Kalsiyum fosfat presipitasyon kompleksi nazikçe karıştırılarak plakalara damla damla eklendi. Plakalar ileri-geri yavaşça hareket ettirilip yapılan karışımın eşit yayılması sağlandıktan sonra 37 °C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 8-16 saat inkübe edildi. İnkübasyon basamağından sonra transfeksiyon ortamı dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Devamında hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkanarak plakalara %10 FCS içeren besiyeri eklendi. Plakalar 37 °C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırıldı ve transfeksiyonun 72. saatine kadar inkübasyona devam edildi.

**Tablo 3.4:** Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
2,5 M CaCl <sub>2</sub>	36,75 g CaCl <sub>2</sub> (MW: 147,01) 100 mL dH <sub>2</sub> O'da çözüldü. Çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve ependorf tüplere paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.
2X HEPES-Buffered Saline (2X HeBS) - 50 mM HEPES - 280 mM NaCl - 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,05-7,12)	1,19 g HEPES (MW:238,3), 1,63 g NaCl (MW:58,44) ve 0,02 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (MW:141,96) ~90 mL dH <sub>2</sub> O'da çözüldü. pH 7,05'e ayarlanıp hacim 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve ependorf tüplere paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.

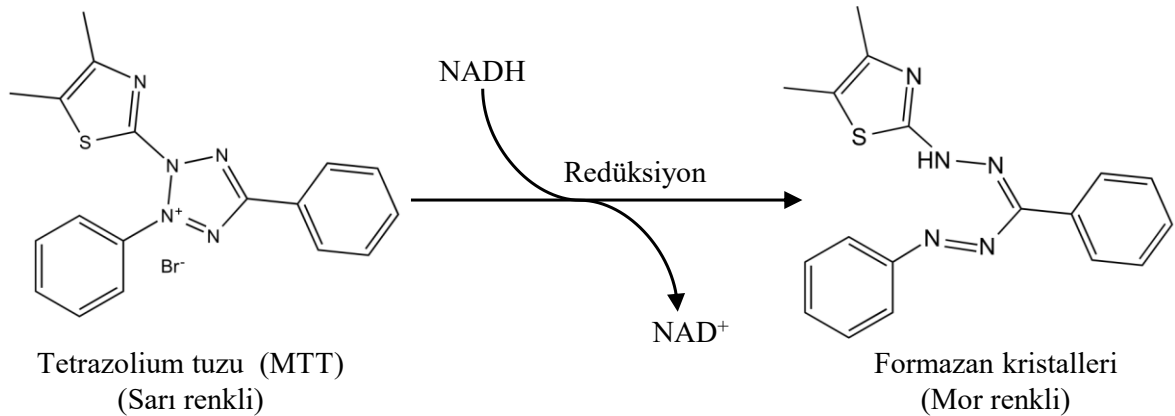
**Tablo 3.5:** Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözelti bileşenleri

Flask / Plate	Çözelti A			Çözelti B	Kültür Hacmi
	DNA	2,5 M CaCl <sub>2</sub>	dH <sub>2</sub> O ile		
96-well	~ 0,1 µg	0,45 µL	4,5 µL	4,5 µL	200 µL
24-well	~ 0,5 µg (0,3-0,7 µg)	2,25 µL	22,5 µL	22,5 µL	500 µL
12-well	~ 1 µg (0,5-1,2 µg)	4,5 µL	45 µL	45 µL	1 mL
6-well	~ 2 µg (1-3 µg)	9 µL	90 µL	90 µL	2 mL

### 3.2.6 Sitotoksite Deneyi

MTT yöntemi, canlı hücrelerin proliferasyonunu, canlılığını ve sitotoksitesini ölçmek için kullanılan kabul görmüş genel bir yöntemdir. Bu yöntem, tetrazolium tuzu olan MTT'nin canlı hücrelerde formazan kristallerine dönüşmesi prensibine dayanır.

Deneyde, 96 kuyucuklu plakalara paylaştırılan hücrelere önceden belirlenen 24, 48 ve 72 saatlerin sonunda, her bir kuyucuğa 20 µL MTT uygulanmıştır. Daha sonra, kuyucuklar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren bir ortamda 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda, kuyucuklardaki ortam alınmış ve her bir kuyucuğa 200 µL izopropanol (0.004 M HCl) eklenerek kristaller çözülmüştür. Son olarak, UV spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüş ve elde edilen veriler GraphPad programında grafiklendirilip analiz edilmiştir. Tüm deney adımları altı tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.4:** MTT testinde gerçekleşen kimyasal değişim

### 3.2.7 Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmada Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter Assay kiti kullanılarak KLK4 genine ait promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesi belirlendi. Bu amaçla promotor parçalarının klonlandığı pMetLuc-reporter vektörü ve pSEAP2-kontrol vektörü hücrelere birlikte transfeksiyonu yapıldı. Aynı zamanda transfeksiyonun etkinliğini saptamak için pMetLuc-kontrol ve pMetLuc-reporter vektörleri hücrelere pSEAP2-kontrol vektörüyle birlikte transfekte edildi. Transfeksiyonun 48. Ve 72. saatlerinde hücrelerden alınan besiyeri numunelerinden lusiferaz ve SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) aktivitesi ölçüldü. Lusiferaz aktivitesinin hesaplanması için 10X substrat solüsyonu, 1X olacak şekilde seyreltilti. Daha sonra 384 kuyucuklu plakaya besiyeri örneğinden 9 µL koyulup üzerine 1 µL 1X substrat/reaksiyon tamponu ilave edildi. Sonuçlar hızlı bir şekilde luminometre cihazında ölçüldü. SEAP aktivitesini belirlemek için 5X dilisyon tamponu dH<sub>2</sub>O ile 1X'e seyreltilti. Hücre besiyeri örneklerinden 5'er µL 384 kuyucuklu plakaya konuldu ve numunelerin üzerine 15 µL 1X dilisyon tamponu ilave edildi. Daha sonra plaka alüminyum folyoya dikkatli bir şekilde sarılıp 65 °C'deki su banyosunda 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra plakanın oda sıcaklığına indirilebilmesi için 2-3 dakika buz üzerinde bekletildi. Deneyin devamında her bir kuyuya SEAP substrat solüsyonundan 20'şer µL ilave edilerek numuneler oda sıcaklığında yarım saat inkübe edildi. Devamında luminometre cihazında ölçüm alındı. Lusiferaz ve SEAP aktivitesi ölçüm sonuçları değerlendirilirken her bir örneğin lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine bölünerek relative lusiferaz aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında analiz edildi.

### 3.2.8 RNA ile İlgili Teknikler

RNA çalışmalarında kullanılan ortam ve malzemelerin tamamı hacimce %0.1 DEPC'li su ile silinerek ortamdaki RNaz'ların inaktive olması için sağlanmaya çalışıldı. RNA çalışmalarında kullanılan tamponlar %0.1'lik DEPC'li su ile hazırlandı.

#### 3.2.8.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için dondurucuda saklanan örnekler, buz üzerinde nazikçe çözüldü. Ticari olarak temin edilen Thermo Scientific GeneJET™ RNA izolasyon kiti kullanılarak kontrol ve deney gruplarına ait pelletlerden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA örnekleri etiketlendi ve uzun süreli saklama için -80°C'deki dondurucuda muhafaza edildi.

### 3.2.8.2 RNA Miktar Tayini

Protokole göre izole edilen RNA'nın miktarı ve saflığı spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbans ölçümü ile hesaplandı. Bu amaçla RNA örneklerinden ve kör olarak distile sudan 2'şer  $\mu\text{L}$   $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$  plakaya konularak tüm örnekler için tek seferde ölçüm alındı. Ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri kullanılarak RNA miktarı ve saflığı belirlendi. Bu veriler aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$*\text{RNA miktarı} = 40 \mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/mL RNA}*$$

### 3.2.8.3 Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Reverse Transkripsiyon PCR metodunda iki aşamalı olarak yapıldı. İlk aşamada RNA'dan cDNA sentezi, Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonuyla gerçekleştirildi. İkinci aşamada ise Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) sentezlenen cDNA ve gene özgü primerler kullanılarak ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu yapıldı.

### 3.2.8.4 Reverse Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu ile cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'ların miktarı belirlenip kalite kontrolü yapıldıktan sonra Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonuyla her bir örnekten 1  $\mu\text{g}$  kalıp RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. RT reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve yapılan işlemler Tablo 3.14'de gösterilmiştir. Hazırlanan cDNA'lar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de (uzun dönemli  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de) muhafaza edildi.

İlk adımda, her bir reaksiyon için son hacim 12.5  $\mu\text{L}$  olacak şekilde şu malzemeler kullanıldı: 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  RNA şablonu, 1  $\mu\text{L}$  oligo(dT) primer ve dH<sub>2</sub>O. Bu karışım,  $70^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, her bir örneğin hazırlanması için 4  $\mu\text{L}$  tampon RT (1X), 2  $\mu\text{L}$  dNTP, 1  $\mu\text{L}$  ReversTranskriptaz ve 0.5  $\mu\text{L}$  Ribolock inhibitörü içeren bir karışım hazırlandı ve her bir tüpe 7.5  $\mu\text{L}$  paylaştırıldı. Ardından, örnekler  $42^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca ve  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar daha sonra kullanılmak üzere  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de stoklandı.

### 3.2.8.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile cDNA Kalite Kontrolü

Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile sentezlenen cDNA'ların ve gene ait ekspresyon primerlerinin kullanılarak gerçekleştirilen bir PCR yapıldı. Çalışmada Tablo 3.8'de verilen KLK4 genine özgü ekspresyon primerleri ve normalizasyon amaçlı kullanılan insan beta-2-mikroglobulin (H $\beta$ -2-M) geni ekspresyon primerleri kullanılarak  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 45 saniye,



55°C'de 45 saniye, 72°C'de 45 saniye ve toplam 30 döngülük bir PCR yapıldı. PCR'da kullanılan bileşenler Tablo 3.9'de verilmiştir. Son basamak olarak PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi.

**Tablo 3.6:** KLK4 ve H $\beta$ -2-M geni ekspresyon primerleri

Primer Adı	Nükleotit Dizisi	%GC	T <sub>m</sub>	Ürün
KLK4 ileri	5'-CACTGGTCATGGAAAACGAATT-3'	41	63 °C	212 bç
KLK4 geri	5'-ATGAGGTCGTTAGCGAGCAAG-3'	44		
H $\beta$ -2-M ileri	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC	55	60 °C	315 bç
H $\beta$ -2-M geri	CATGTCTCGATCCCACTTAACT	45,5		

**Tablo 3.7:** KLK4 ve H $\beta$ -2-M geni ekspresyon primerlerinin PCR bileşenleri

	KLK4 primeri	H $\beta$ -2-M primeri
<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>	<b>Miktar</b>
cDNA	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
dNTP karışım (10 mM)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
Taq tamponu (10X)	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
İleri primer*	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Geri primer*	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	38,5 $\mu$ L	38,5 $\mu$ L
Taq polimeraz (5 U/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
<b>Toplam</b>	<b>50 <math>\mu</math>L</b>	<b>50 <math>\mu</math>L</b>

### 3.2.8.6 Real-Time PCR

Her bir deney seti için üç tekrarlı olarak Real Time PCR analizi gerçekleştirildi. Real-time PCR döngü koşulları Tablo 3.12'de belirtilmiştir. Her bir reaksiyon için toplam hacim 12.5  $\mu$ L olarak hazırlandı ve içeriği şu şekildedir: 6.25  $\mu$ L SYBR® Green PCR Master Mix, 1  $\mu$ L cDNA, 0.5  $\mu$ L her biri için forward ve reverse primerler (10 pmol/ $\mu$ L), ve 4.25  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. Real Time PCR sonuçları Livak metoduna göre analiz edildi. KLK4 geni için yapılan üç tekrarın Ct değerlerinin ortalaması alındı. Aynı şekilde, H $\beta$ 2 kontrol geni için yapılan üç tekrarın Ct değerlerinin ortalaması alındı. H $\beta$ 2 kontrol geninin ortalama değeri KLK4 geninin ortalama değerinden çıkarıldı. Elde edilen farkın 2'nin üssü alındı, ardından kontrol grubuna bölünerek 1'e eşitlendi. Deneyin devamında, ilgili zaman aralığında çalışılan deney

grubu, aynı zaman aralığında çalışılan kontrol grubuna bölünmüştür. Bu işlemin sonucunda, '1' in katları şeklinde değerler elde edilmiştir ve bu veriler kullanılarak bir sütun grafiği oluşturulmuştur.

**Tablo 3.8:** Real-time PCR döngü şartları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Ön inkübasyon	1	95 °C	10 dk.
Amplifikasyon	40	95 °C	30 sn.
		55 °C	30 sn.
		72 °C	30 sn.
Erime Eğrisi	1	95 °C	5 sn.
		65 °C	1 dk.
Soğutma	1	40°C	30 sn.

### 3.2.9 Protein ile İlgili Teknikler

#### 3.2.9.1 Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi

Çalışmada genlerin protein düzeyindeki ekspresyon seviyesini belirlemek için Western blot yöntemi kullanıldı. Belirlenen yöntemle protein analizi çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve bileşimleri Tablo 3.9'da verilmektedir.

**Tablo 3.9:** Western blot analizinde kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	İçeriği ve Hazırlanışı
RIPA Tamponu	Son konsantrasyonunda; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %0,1 (w/v) sodyum deoksikolat, %0,1 (w/v) SDS ve %1 (v/v) Triton X-100 bulunan çözelti hazırlanır. Son hacmine göre proteaz inhibitörü eklendi ve 15 mL'lik falkonlara paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.
Bradford Reaktifi	0,1 g Coomassie brilliant blue (G-250), 50 mL %95'lik etil alkol içinde çözüldü ve 100 mL %85 (w/v) fosforik asit eklenerek karıştırıldı. Son hacim dH <sub>2</sub> O ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti iki kez filtre kağıdından geçirilip ışık almayan bir şişede +4°C'de saklandı.
Ayırma (Alt) Jel Tamponu	% 0,4 (w/v) SDS içeren 1,5 M Tris-base (pH 8,8): 18,17 g Tris-base (MW:121,14) ve 0,4 g SDS ~80 mL dH <sub>2</sub> O'da çözüldü. pH 8,8'e ayarlanıp hacim 100 mL tamamlandı. +4°C'de saklandı.
Yığıma (Üst) Jel Tamponu	% 0,4 (w/v) SDS içeren 0,5 M Tris-base (pH 6,8): 6 g Tris-base (MW:121,14) ve 0,4 g SDS ~80 mL dH <sub>2</sub> O'da çözüldü. pH 6,8'e ayarlanıp hacim 100 mL tamamlandı. +4°C'de saklandı.
Yürütme Stok Tamponu (10X)	0,25 M Tris-base ve 1,92 M glisin içeren çözelti (pH 8,3): 30,3 g Tris-base (MW:121,14) ve 144,4 g glisin (MW:75,07) ~700 mL dH <sub>2</sub> O'da çözüldü. pH 8,3'e ayarlanıp son hacmi 1 L'ye tamamlandı.

**Tablo 3.10** (devamı)

%10 (w/v) SDS Çözeltisi	10 g SDS (Sodyum dodesil sülfat) dH <sub>2</sub> O'da çözülerek son hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
Yürütme Tamponu (1X)	100 mL 10X yürütme stok tamponu ve 10 mL %10 (w/v) SDS çözeltisi karıştırılıp hacim 1 L'ye tamamlandı. Son konsantrasyon: 25 mM Tris-base, 92 mM glisin ve %0,1 SDS (w/v) (pH 8,3).
Transfer Tamponu	100 mL 10X yürütme stok tamponu, 200 mL metanol ile karıştırılıp son hacim dH <sub>2</sub> O ile 1 L'ye tamamlandı. Çözeltiye 500 µL %10 (w/v) SDS eklendi ve -20 °C'de soğutulularak kullanıldı.
10X Stok TBS (Tris-Buffered Saline)	0,2 M Tris-base ve 1,5 M NaCl içeren çözelti (pH 7,5): 24,22 g Tris-base (MW:121,14) ve 87,66 g NaCl (MW:58,44) ~ 700 mL dH <sub>2</sub> O'da çözüldü. pH 7,5'e ayarlanıp son hacim 1 L'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.
1X TBST Çözeltisi	1X TBS'de %0,1 (v/v) Tween-20 içeren çözelti: 100 mL 10X stok TBS ile 1 mL Tween-20 karıştırdı ve son hacim dH <sub>2</sub> O ile 1 L'ye olacak şekilde hazırlandı.
Bloklama Tamponu	%5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X TBST: 50 mL 1X TBST çözeltisi içinde 2,5 g yağsız süt tozu çözünerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı.
Jel Boyasının Çözeltisi	0,1 g R-250Coomassie brilliant blue, 50 mL metanolde çözüldü ve 10 mL asetik asit eklenerek karıştırıldı. Son hacmi dH <sub>2</sub> O ile 100 mL'ye tamamlandı.
Jelden Boya Giderici Çözelti	Hacimce; %5 metanol, %7,5 asetik asit ve %87,5 dH <sub>2</sub> O ile hazırlandı.
Ponceau Boyası	0,1 g ponceau-S, 100 mL % 5 (v/v) asetik asit çözeltisinde çözüldü.

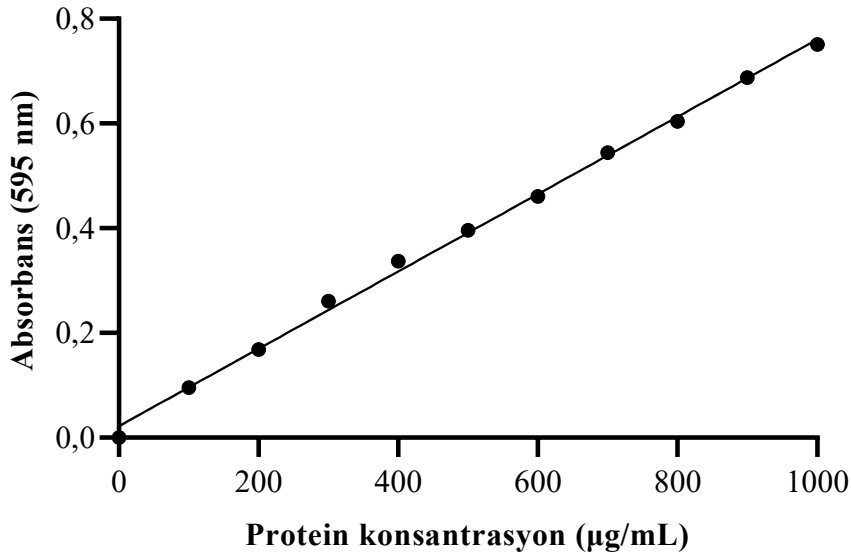
### 3.2.9.2 Hücresel Proteinlerin Ekstraksiyonu

-80 °C'de muhafaza edilen hücre pelletleri protein ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılmak üzere buz üzerine alınarak çözünmesi ve homojen hale gelmesi sağlandı. Sıcaklık değişimlerinden kaynaklı protein kaybını engellemek için tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Başlamadan önce Tablo 3.9'a göre hazırlanan RIPA tamponu +4 °C'de bekletilerek eritildi. Kullanılacak hücre sayısına göre farklı miktarlarda kullanılan RIPA tamponu, ependorf tüpteki pellet üzerine eklendi.

Devamında hücreler pipet yardımıyla süspanse edildi. Örnekler ultrasonik su banyosunda +4 °C'de, 90 sn. sonikasyon yapılarak lizise devam edildi. Hücre süspansiyonu buz üzerinde 15 dk inkübe edildikten sonra 13.500 rpm'de (+4 °C'de) 10 dk santrifüjlendi. Sonrasında süpernatant, soğutulmuş ependorf tüpe dikkatlice aktarıldı ve örnekteki protein miktarı belirlenerek örnekler -80 °C'de saklandı.

### 3.2.9.3 Proteinlerin Kantitatif Belirlenmesi

Bradford yöntemi kullanılarak örneklerdeki protein miktarı kantitatif olarak belirlendi. Bradford reaktifinin hazırlanması için, 100 mg (0.1 g) Commasie blue, %95'lik fosforik asit 50 mL, %95'lik etanol 100 mL ile karıştırılarak saf su ile bir litre hacme tamamlandı. Bradford Standart eğrisinin doğru olarak hesaplanması için stok BSA hazırlanması için, 0.1 g BSA saf suda 100 mL çözüldü. Numunelerin ölçümü için, 96'lık kuyulu plakaya önce 3  $\mu$ L örnek kondu ve üzerine 2  $\mu$ L saf su ilave edildi. Daha sonra, 250  $\mu$ L reaktif eklenerek karıştırıldı ve 10 dakika boyunca karanlık bir ortamda bekletildi. 595 nm dalga boyunda spektrometrede ölçüm alındı ve standart eğri grafiğine göre hesaplama yapıldı. 1  $\mu$ L'deki protein konsantrasyonu tespiti için nanogram cinsinden hesaplanarak belirlendi.



Şekil 3.5: Bradford yöntemi BSA standart eğrisi

### 3.2.9.4 SDS-PAGE

Yapılan deneysel çalışmalarda hücrelerden elde edilen protein örneklerini molekül büyüklüklerine göre ayırmak için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid, Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) kullanıldı. Öncelikle jel elektroforezinde kullanılacak olan çözeltiler Tablo 3.15'te verilen çözeltiler hazırlandı ve çalışmada kullanılacak tüm malzemeler distile su ile yıkanıp %70'lik etanol ile temizlendi.

SDS-PAGE deneyinde farklı konsantrasyonlara sahip iki farklı jel sıralı ile cam levhalar arasına döküldü. İlk olarak %10'luk ayırma jeli (alt jel) hazırlanarak cam aparatın üst

kısmına 2 cm boşluk kalana kadar döküldü. Özellikle hava kabarcığı olmaması sağlandı. Hemen ardından jelin üst yüzeyinin lineer oluşması için distile su eklendi. Polimerizasyonun olması için 30 dk. bekletildi. Gerekli donma süresi geçtikten sonra izopropanol dikkatle döküldü ve kurutma kâğıdı geride kalan sıvılar kurutuldu. Daha sonra %4'lük yığma jeli olarak adlandırılan üst jel hazırlanarak yığma jelinin üzerine döküldü. Jelin polimerleşmesi beklenmeden cam levhaların üst kısmına gerekli hacimleri de istenilen taraklar dikkatlice takıldı.

Yığma jeli, polimerleşmesi için 30 dk. bekletildikten kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak dikkatle çıkarıldı. Cam levhalar aşırı güç uygulanmadan jel kaset sistemine yerleştirilip elektroforez tankına takıldı. Kasetlerin bulunduğu tank 1X yürütme tamponu ile dolduruldu.

**Tablo 3.10:** SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları

<b>Çözeltiler</b>	<b>%10 Ayırma Jeli</b>	<b>%4 Yığma Jeli</b>
Ayırma (Alt) Jel Tamponu	2,5 mL	-
Yığma (Üst) Jel Tamponu	-	2,5 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%40 37.5/1)	2,5 mL	625 µL
dH <sub>2</sub> O	5 mL	3,05 mL
% 10 (w/v) APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Buz üzerinde protein miktarı belirlenen örnekler jele yüklemek için hazırlandı. Bu amaçla tüm örneklerin orantısal olarak kuyucuklara yüklenmesi amacıyla en az miktarda protein bulunduran örneğin son hacim 20 µL'deki miktarı referans alınarak ve diğer örnekler de bu miktarda olacak şekilde ependorf tüplere konuldu. Tüm örnekler 90 µL ticari 4X Laemmlı örnek tamponu ve 10 µL β-merkaptotanol karıştırılıp hazırlanmış 5 µL yükleme boyasından eklendi. Örneklerin tamamı aynı hacimde olması için son hacmi 25 µL olacak şekilde yığma jel tamponu eklendi.

Tüm örnekler 95°C'de beş dakika bekletilerek proteinler denatüre edildi. Jeldeki ilk kuyuya 4-5 µL marker yüklendi. Denatüre edilen örnekler kısa bir santrifüj işleminden geçirilerek diğer kuyulara yüklendi. Elektroforez tankının içerisinde bulunan jel adedine göre 1X yürütme tamponu oranı hesaplanarak tanka ilave edildi. Örnekler ilk olarak 90 voltta yaklaşık üç saat boyunca yürütüldü.

### 3.2.9.5 SDS Jeldeki Proteinlerin Membrana Blotlanması

Yapılan deneysel çalışmada proteinlerin elektroforetik transferini gerçekleştirmek için Bio-Rad Trans Blot sistemi ve proteinlerin direk transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanılmıştır. SDS-PAGE işleminden sonra cam levhalar arasında bulunan protein içeren jel dikkatli bir şekilde çıkarılıp üst kısımda bulunan yığıma jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan ayırma jeli, protein kaybı oluşmaması için soğuk transfer tamponu alınarak burada 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Ayrıca transfer işleminde kullanılacak olan aparatlar, Whatman 3 MM transfer kağıdı ve sandviç sistemi hazırlanırken kullanılacak olan süngerler de transfer tamponunda bekletildi. Ayırma jeli ile aynı ölçülerde kesilen PVDF membran 1 dk metanolde bekletilip aktive edildi ve daha sonra önceden soğutulmuş olan transfer tamponuna alındı. Aktivasyon ve ön hazırlık işlemleri tamamlandıktan sonra transfer için gerekli olan sandviç hazırlama işlemlerine geçildi. Bu amaçla transfer kasetine (-) kutuptan başlayarak sırasıyla, sünger-kağıt-jel-membran-kağıt-sünger olacak şekilde yerleştirildi. İşlem sırasında özellikle solüsyon kaynaklı hava kabarcığı kalmaması için silindirik aparat kullanılarak sandviç katmanları üzerinden geçildi. Sandviç transfer kasetine dikkatle sıkıştırıldıktan sonra soğuk transfer tamponuyla dolu olan tanka yerleştirildi ve + 4 °C’de 1 gece (16 sa) 15 voltta transfere bırakıldı.

### 3.2.9.6 İmmünoiblota ve Membran Görüntüleme

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membran spesifik olmayan yanıtıcı bağlanmaları engellemek için ilk olarak 20 mL bloklama tamponu içinde oda sıcaklığında 90 dk boyunca horizontal çalkalayıcıda bloklandı. Daha sonra bloklama tamponu ortandan uzaklaştırıldı ve membran 5’er dakikalık sürelerle üç kez 1X TBS ile yıkandı. Membranın uygun protein büyüklüklerine uyulacak şekilde kesilerek KLK4 ve  $\beta$ -aktin proteinlerini içeren kısımları ayrı ayrı olacak şekilde bloklama tamponunda seyreltilen 1/1000 KLK4 primer antikoruna ve 1/5000  $\beta$ -aktin antikoruna +4 °C’de 1 gece hareketli çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda membran 5’er dakikalık sürelerle üç kez 1X TBS-Tween20 ile yıkandı ve 1/5000 oranında sekonder mouse  $\beta$ -aktin antikoruna 90 dk oda sıcaklığında hareketli çalkalayıcıda bırakıldı. İnkübasyon sonunda membran son olarak 5’er dakikalık sürelerle üç kez 1X TBST ile yıkandı ve görüntülemeye geçildi.

Spesifik olarak bağlanmış proteinleri görebilmek için Pierce™ marka ECL Western blot substratı kullanıldı. Üretici firmanın protokolüne uygun olarak ECL substrat ile karanlık ortamda membrana muamele edilip 1 dk inkübe edildi. Devamında membran UVP

BioSpectrum™ görüntüleme sisteminde görüntülenip fotoğraflandı. Elde edilen membran fotoğraflarındaki protein bantları, ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar GraphPad programında grafiklendirildi.

### **3.2.9.7 Siklohegzimid Uygulaması ile Translasyonun Durdurulması**

LNCaP hücre hatları sağlıklı bir şekilde büyütüldü ve mL'deki canlı hücre sayıları belirlendi. Daha sonra hücreler 6' lı plakalara 300.000 hücre/flask olacak şekilde paylaştırıldı ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinleri son konsantrasyon 20 ng/mL olacak şekilde hücrelere uygulandı. Uygulamadan 1 saat sonra son konsantrasyonu 10  $\mu$ g/mL olacak şekilde siklohegzimid uygulandı. Hücrelerden 6., 24. ve 48. saatler sonunda deney ve kontrol gruplarından hücre pelleti alınarak RIPA ile protokol uygulanarak gerekli basamaklar yapıldıktan sonra Bradford yöntemiyle protein miktarları belirlenerek western blot deneyinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

### **3.2.10 DNA-Protein Etkileşim Deneylerin Kullanılan Metotlar**

#### **3.2.10.1 EMSA (Elektroforetik Hareketlilik Kayma Testi) Yöntemi**

Protein-nükleik asit etkileşimlerini tespit etmek için kullanılan EMSA, protein-nükleik asit kompleksinin elektroforetik hareketliliğine dayanan hızlı ve hassas bir yöntemdir. Protein ile kompleks oluşturmuş DNA'nın hareketindeki değişimler incelenerek, DNA'nın ilgili protein ile etkileşimde olup olmadığı belirlenebilir [111].

#### **3.2.10.2 İnsan Prostat Kanseri Hücrelerinden (LNCaP) Nükleer Ekstraktların Hazırlanması**

Yapılan deneysel çalışmada 24 saat TNF- $\alpha$  ve IL-6 son konsantrasyon 20 ng/mL olacak şekilde uygulama yapılan deney gruplarından nükleer ekstraksiyon hazırlandı . Bu bağlamda 10 cm çapına sahip petri kaplarına ekilen LNCaP hücre hattı soğuk haldeki PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra PBS uzaklaştırıldı. Devamında petrinin yüzeyi TEN solüsyonu ile 3 mL kaplanarak buzda 5 dakika süresince bekletildi. Takip edilen süre sonunda hücreler zeminden kazıyıcı aparat yardımı ile kazınarak 2 mL'lik steril ependorflara konuldu.

Örnekler +4 °C'de 14.000 rpm'de 20 saniye boyunca santrifüj edildi. Devamında üst faz uzaklaştırıldı ve altta kalan pellet önceden soğutulmuş PBS'den 1.5 mL eklenip 5 dakika süresince yine aynı şartlar uygulanarak santrifüj edildi. Ependorftaki süpernatant uzaklaştırılarak 50  $\mu$ L Tampon A ilave edilerek hafifçe karıştırıldı ve devamında buzda 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda A tamponu ile muamele edilmiş

pellet dikkatli bir şekilde insülin iğnesi yardımıyla 5-10 kez liziz edildi. Devamın 20 saniye boyunca 14.000 rpm'de +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen pellet üzerine C tamponundan 60 µL ilave edilerek süspansiyon haline getirilerek çözündürüldü. Daha sonra numune, otuz dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. Ardından, santrifüj edilerek 5 dakika boyunca 14.000 rpm'de pellet oluşumu sağlandı. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve içerisindeki protein miktarı belirlendi. Numuneler küçük hacimlere bölündü ve -80°C'de saklandı.

### 3.2.10.3 Oligonükleotitlerin İşaretlenmesi

Oligonükleotitlerin işaretlenmesi için uç kısımlarına biyotin bağlanması amacıyla Terminal Deoksiribonükleotidil Transferaz enzimi yardımıyla belirlenen oranlarda bir reaksiyon gerçekleştirildi. Tablo 3.16'da biyotinleme reaksiyonu bileşenleri hacim olarak gösterilmiştir. Bu doğrultuda reaksiyon basamaklarına uygun olarak hazırlanan karışım 15 dakika boyunca 37°C ısı ile muamele edildi. Hemen ardından 70°C'de 10 dakika inkübe edilip TdT enziminin aktifliğini kaybetmesi sağlanarak süreç sonlandırıldı.

**Tablo 3.10:** Emsa için konsensus dizileri

Prob Adı	Dizisi	İçerdiği Bağlanma Motifi
NFκB	5'' AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC 3'' 5'' GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT 3''	Konsensus Dizi
STAT3	5'' GATCCTTCTGGGAATTCCTAGA 3'' 5'' GATCTAGGAATTCCTAGGAAGGATC 3''	Konsensus Dizi

**Tablo 3.11:** İşaretleme reaksiyonu içeriği

Bileşen	Hacim (µL)	Son konsantrasyon
5 X TdT reaksiyon tampon	10 µL	1 X
Kontrol oligo (1 µM)	5 µL	100 nM
Biotin-11-UTP (10 µM)	2.5 µL	0.5 µM
TdT(20 U/µL)	2 µL	0.8 U/µL
Saf su	30.5 µL	-
Son hacim	50 µL	-



#### 3.2.10.4 Oligoların çift zincirli hale getirilmesi

Oligonükleotidlerin çift zincirli hale gelebilmesi için (biotinli ve biyotinsiz) 95°C’de 5 dakika boyunca ısıya tabi tutuldu. İnkübasyon süresi sonunda tüpler soğumaya bırakıldı. Devamında -20 °C’de saklandı.

#### 3.2.10.5 Bağlanma Deneyinin Hazırlanması ve Jelde Yürütülmesi

Son yoğunluğu %6 olan EMSA jeli hazırlanması için Tablo 3.12’de belirtilen miktarlara uyarak jel hazırlandı. Ardından önceden hazırlanmış yürütme tamponu ile 0.5 X TBE’de 24 saat polimerleşmesi için bırakıldı. Devamında Tablo 3.13’de anlatıldığı şekilde bağlanma tepkimesi hazırlanarak +4 derecede 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Yürütme öncesinde ortamdaki amonyum persülfatı uzaklaştırmak için jel yaklaşık 60 dakika boyunca ön yürütme işlemine tabi tutuldu. Yürütme sonunda numuneler 6 X yükleme boyası ile boyandı. Daha sonra kuyucuklara 20 µL son hacim olacak şekilde yüklendi. 60 dk boyunca 100 V’da yürütüldü.

**Tablo 3.12:** %6’lık Jel içeriği

Bileşen	Son konsantrasyon
% 50’lik Gliserol	%4
% 40 Poli-Akrilamid solüsyonu	%6
TEMED	0.001
5 X TBE tamponu	0.5 X
% 10 Amonyum persülfat	% 0.1
dH2O	4404 µL
Jel hacmi	6000 µL

**Tablo 3.13:** Bağlanma reaksiyonu içeriği

<u>Bileşenler</u>	Reaksiyonlar		Son Konsantrasyon
	Serbest	Yarışma	
Ultra saf dH2O	X µL	X µL	-
KCl (1M)	-	-	50 mM
10 X Bağlanma Tamponu	2 µL	2 µL	1 X
EDTA (200 mM)	-	--	10 mM
Poly (dI•dC) (1µg/µL)	1 µL	1 µL	50 ng/µL
Biotinsiz DNA	-	2	100.000 fmol/µL
Nükleer Ekstrakt	X µL	X µL	Derişime bağlı
Biotinli DNA	1	1	20 fmol/µL
TOPLAM	20 µL	20 µL	-

### **3.2.10.6 Protein Örneklerinin Naylon Membrana Transfer Edilmesi**

Bio-Rad Trans Blot (Bio-Rad Laboratories) Transfer sistemi kullanılarak transfer işlemleri gerçekleştirildi. Jeller yürütme tankından çıkartıldı. Yürütülen jel ile aynı boyutlarda kesilen membran önceden soğutulmuş 0.5 X TBE tamponuna alındı. Aynı zamanda tüm aparatlar, transfer aparatları, kurutma kâğıtları ve süngerler önceden soğutulmuş 0.5 X TBE tamponuna alınarak soğumaları sağlandı. Devamında transfer sisteminin negatif yüzeyinden başlanarak ilk olarak sünger sonra kurutma kâğıdı, üzerine jel konularak yine membran, kurutma kâğıdı ve son olarak sünger sırası takip edilerek transfer için gerekli olan sandviç hazırlandı. Devamında hazırlanan sandviç, önceden soğutulmuş 0.5 X TBE tamponu ile doldurulmuş olan Trans Blot Bio-Rad sistemine elektrik akımına uygun olacak şekilde yerleştirildi. Tank 100 V ile +4 °C' de 60 dk boyunca yürütüldü. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran kross-link bağlanma tepkimesine tabi tutulması için streç film ile kaplandı. Sonrasında UV ortamında 15 dakika bekletildi ve bu sayede DNA'nın sistemde bulunan membrana bağlanması sağlandı. İşlem sonunda membran bloklama tamponuna konarak oda ısısında 15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Bekleme süresi tamamlandığında EMSA Kit (Thermo) LightShift® Chemiluminescent protokolüne göre ilk olarak bloklama, devamında antikorlama, en son olarak yıkama ve dengeleme basamakları gerçekleştirildi. Biotinle işaretlenmiş örnekler ECL Substrat (Thermo) sistemi kullanılarak belirlenmesi amacıyla Pierce kullanılarak UVP sistemde görüntülendi.

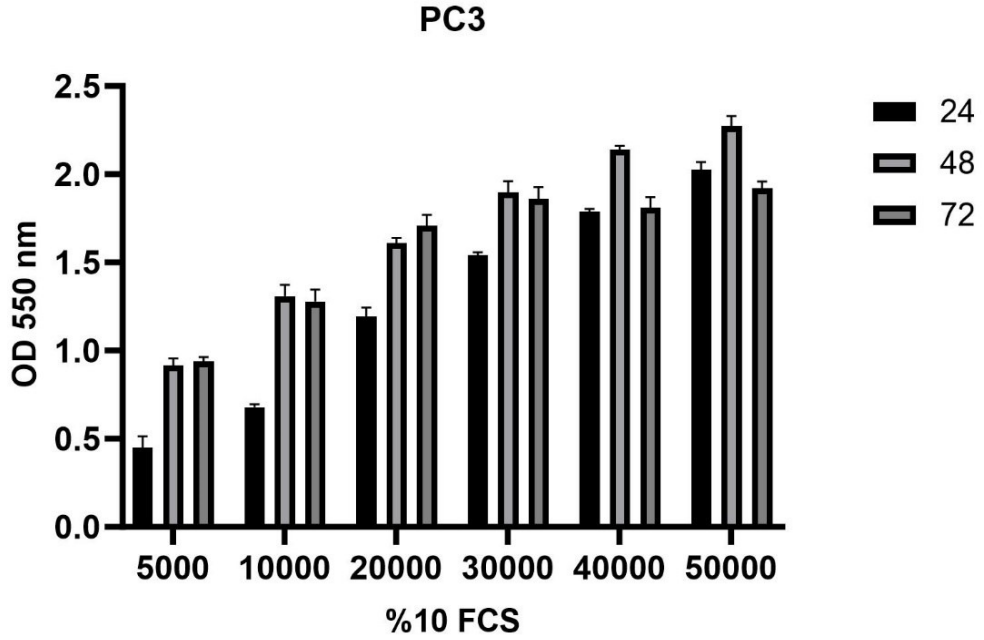
### **3.2.11 İstatistiksel Analiz**

Tekrarlı çalışılan deney verileri GraphPad versiyon 9.4.1.681 programında one-way ANOVA testiyle analiz edildi ve *p* değeri 0.05 küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Karşılaştırılan grupların *p* değeri grafik üzerinde anlam derecelerine göre (\*) işareti ile gösterildi.

## 4. BULGULAR

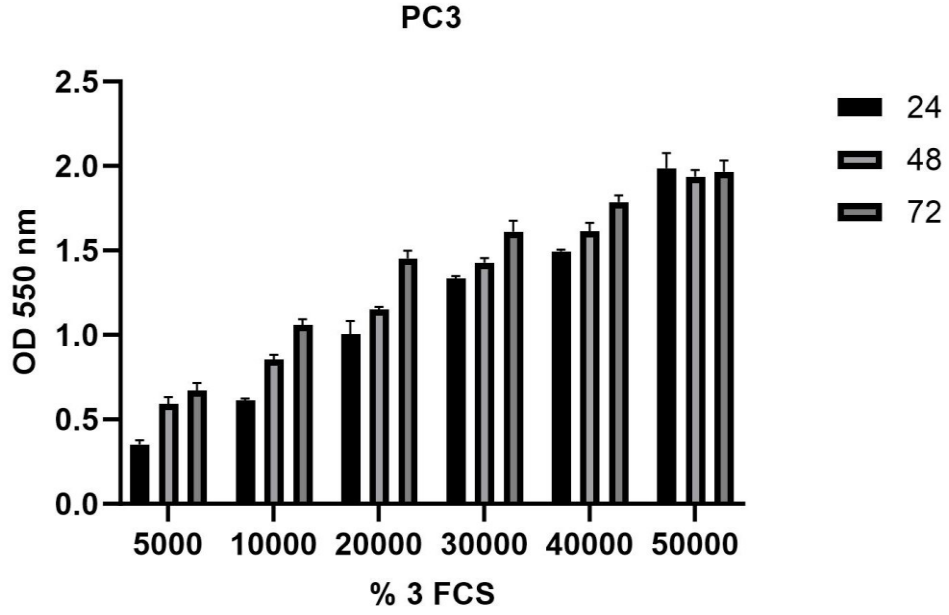
### 4.1 Hücre Yoğunluğunun Belirlenmesi

Yapacağımız tüm deneysel çalışmalarda kullanılacak olan PC3 hücrelerinin optimum hücre sayılarını belirlemek amacıyla MTT metodu kullanılarak hücrelerin canlılık oranları ölçüldü. Farklı hücre sayılarında inkübasyonu takip eden 24., 48. ve 72. saatlerde MTT boyası uygulanmış ve 4 saat inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri çözülüp 550 nm’de spektrofotometrede absorbans ölçümleri alınmıştır. Her deney grubu için en az beş tekrarlı çalışılmıştır. Sonuçlar Microsoft Excel programında değerlendirilip PC3 hücrelerinin %10’luk FCS için Şekil 4.1’de %3’lük FCS için Şekil 4.2’de gösterilen grafikler çizilmiştir.



Şekil 4.1: PC3 hücrelerinin %10 FCS’li ortamdaki MTT analizleri

%10 FCS’li ortamda inkübe edilen PC3 hücrelerinde tüm hücre sayılarında 24 ve 48 saatlik dilimlerde hücreler düzenli bir şekilde artış göstererek proliferasyon olmuştur. Ancak 72 saatlik veriler incelendiğinde özellikle 40000 ve 50000 sayı adedine sahip kuyucuklarda hücrelerin aşırı çoğalmalarına bağlı olarak yüzeyden kalkmaları ve hücre atıklarının ortamda birikmesi sebebiyle canlılıklarını kaybetmişlerdir. Bu doğrultuda çalışılacak olan deney gruplarında 30000 ve altı hücre sayısı kullanmanın hesaplanan canlı hücre yoğunluğunda daha stabil sonuçlar vereceği belirlenmiştir.



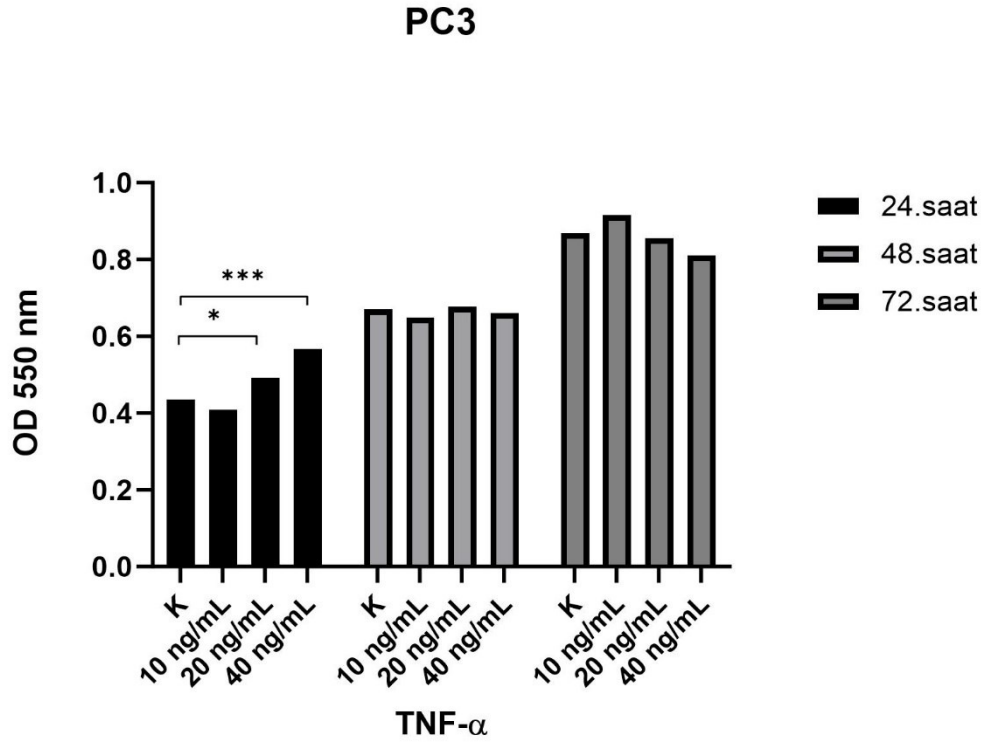
**Şekil 4.2:** PC3 hücrelerinin % 3 FCS'li ortamdaki MTT analizleri

%3 FCS'li ortamda inkübe edilen PC3 hücrelerinde ise neredeyse tüm hücre sayılarında 24, 48 ve 72 saatlik dilimlerde hücreler düzenli bir şekilde artış göstermiştir. FCS'nin yüzdesinin az olduğu inkübasyon ortamında hücreler daha yavaş bir hızda proliferasyon göstermişlerdir. %10 FCS'li ortamla karşılaştırıldığında %3 FCS'li ortamda bulunan hücrelerin OD değerlerinin daha düşük seviyeden başladığı belirlenmiştir. Bu doğrultuda planlanacak olan deneylerde hücre sayısının 20000'nin altında kullanılmasının daha uygun olacağı belirlenmiştir.

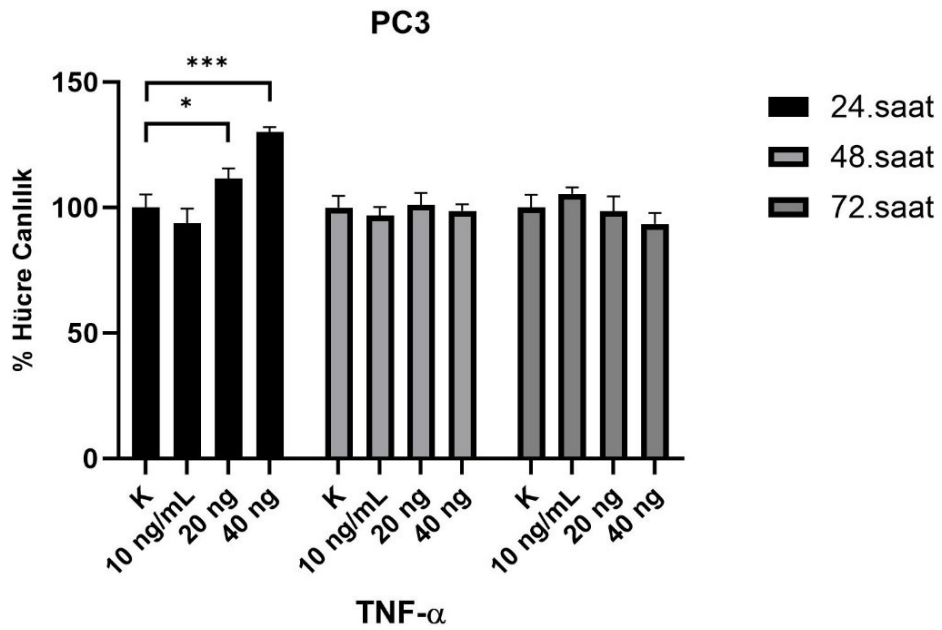
#### **4.2 PC3 ve LNCaP hücrelerinde KLK-4 Geninin Regülasyonunun Belirlenmesinde Kullanılacak Olan TNF- $\alpha$ ve IL-6 Sitokinlerinin Hücre Canlılığına Etkisi**

PC3 ve LNCaP hücre hatlarında ekspresyon yapan KLK-4 geninin regülasyonunu belirlemek için kullanılacak olan TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokinlerinin hücre canlılığı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla MTT metodu kullanılarak hücre canlılığı ölçümü yapıldı. 96 kuyucuklu plakalarda ve 24, 48 ve 72 saat aralıklarında hazırlanan deneysel çalışmada TNF- $\alpha$  ve IL-6 sitokini için son konsantrasyon 10 ng/mL, 20 ng/mL ve 40 ng/mL olarak belirlendi. Belirlenen saatlerin sonunda MTT boyası uygulandı ve 4 saat inkübasyonun ardından oluşan formazan kristalleri çözülüp 550 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümleri alınmıştır. Her deney grubu için en az beş tekrarlı çalışılmıştır. Sonuçlar Graphpad programında değerlendirilip TNF- $\alpha$  için

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'deki grafikler çizilmiştir. IL-6 sitokini uygulanmış PC3 hücreleri içinde Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 grafikleri çizilmiştir.

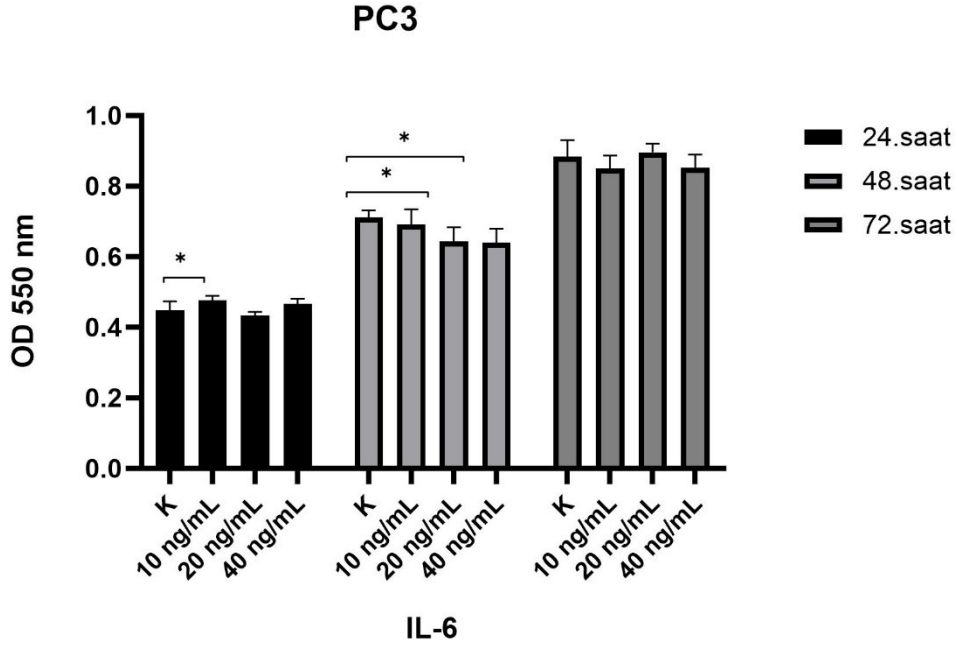


Şekil 4.3: PC3 Hücre Hattında TNF- $\alpha$  Sitokinine ait MTT Analizi, OD Değerleri ( $p<0,05$ (\*), $p<0,01$ (\*\*), $p<0,0001$ (\*\*\*)

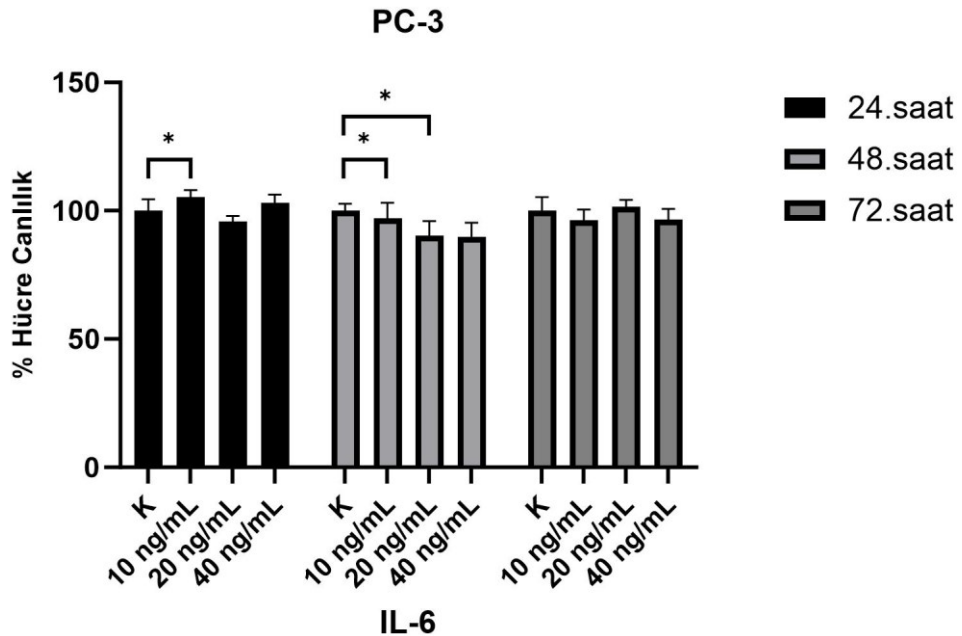


Şekil 4.4: PC3 Hücre Hattında TNF- $\alpha$  Sitokinine ait MTT Analizi, Yüzde Canlılık ( $p<0,05$ (\*),  $p<0,01$ (\*\*),  $p<0,0001$ (\*\*\*)

PC3 hücrelerine uygulanan TNF- $\alpha$  sitokini proliferasyon üzerindeki %30'luk pozitif etkisi 48 saatte 40 ng/mL olarak uygulanmış kuyucuklarda belirlenmiştir. Proliferasyon üzerine negatif etkisi de 24. ve 72. saatlerde %93 olarak belirlenmiştir.

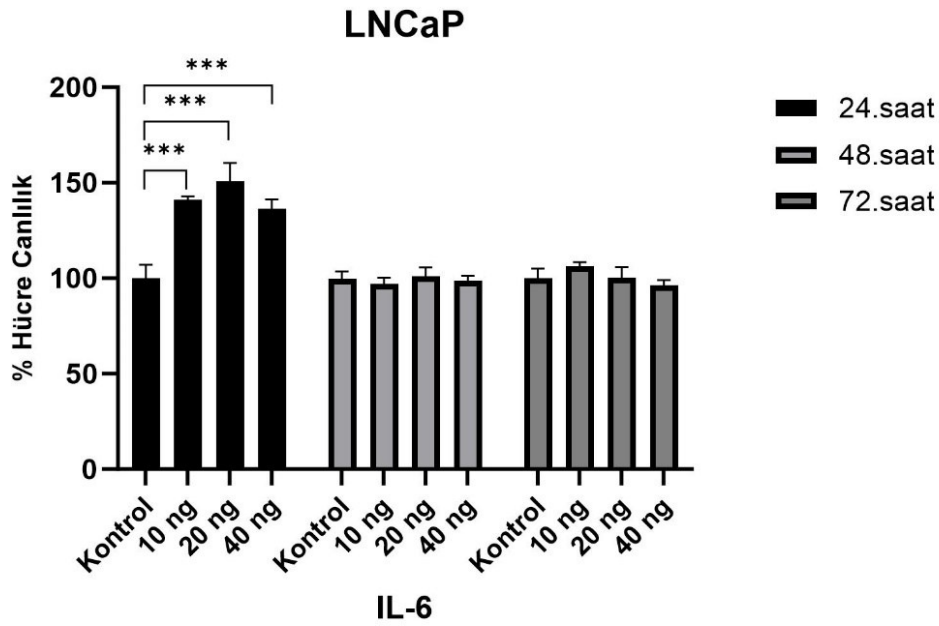


**Şekil 4.5:** PC3 Hücre Hattında IL-6 Sitokinine ait MTT Analizi, OD Değerleri ( $p < 0,05$ (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,0001$ (\*\*\*)



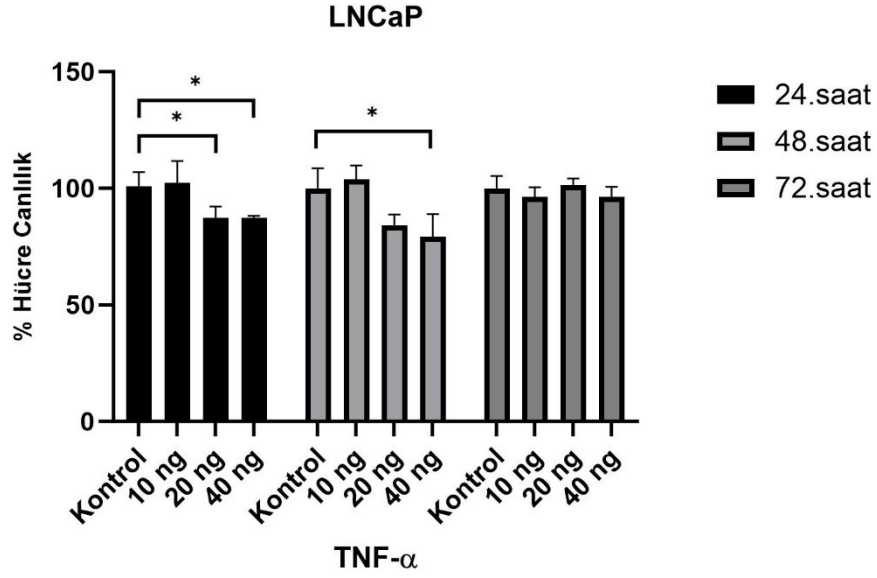
**Şekil 4.6:** PC3 Hücre Hattında IL-6 Sitokinine ait MTT Analizi, Yüzde Canlılık ( $p < 0,05$ (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,0001$ (\*\*\*)

Şekil 4.5 ve 4.6’da gösterildiği üzere IL-6 sitokini hücre proliferasyonu üzerine negatif etkisini en yüksek olarak 48 saatte 40 ng/mL olarak uygulanmış kuyucuklarda canlılık oranını %89’e düşürerek göstermiştir. Hesaplanan bu veriler doğrultusunda IL-6’nın PC3 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. LNCaP Hücre hatları kullanılarak yapılan MTT çalışmaları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 ‘de gösterilmiştir. IL-6 sitokini hücre proliferasyonu üzerine pozitif etkisini en yüksek olarak 24 saatte 10 ve 20 ng/mL olarak uygulanmış kuyucuklarda canlılık oranını %150’ye yükselerek göstermiştir.



**Şekil 4.7:** LNCaP Hücre Hattında IL-6 Sitokinine ait MTT Analizi  
( $p < 0,05$ (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,0001$ (\*\*\*)

LNCaP hücrelerine uygulanan 48. ve 72. saat IL-6 sitokini uygulanmalarında proliferasyon üzerine belirgin bir etki gözlemlenmemiştir. TNF- $\alpha$  sitokini uygulanan LNCaP hücre hatlarında ise genel olarak tüm saat ve dozlarda proliferasyon üzerine negatif bir etki görülmüştür. Proliferasyon üzerine pozitif etki sadece 10 ng/ml olan gruplarda maksimum %10’luk bir etki göstermiştir. Özellikle 24. ve 48. Saat uygulamalarında 20 ve 40 ng/ml uygulama saatlerinde %30’a varan negatif etkiler görülmektedir.



**Şekil 4.8:** LNCaP Hücre Hattında TNF-α Sitokinine ait MTT Analizi  
( $p < 0,05$ (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,0001$ (\*\*\*)

### 4.3 Primer Tasarımı

İlk olarak KLK4 genine 756 bazlık okuma bölgesi ve 254 amino asitlik nükleotit dizisi (izoform 1) gen bankasından [NCBI Referans Dizisi: NP\_002801.1] bulunmuştur. (bkz Tablo 4.1).  $T_m$  analizi, Primerlerin saç tokası, % GC oranının analizi ve NCBI Blast analizleri yapıldı.

Ayrıca hücrelerdeki KLK4 gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla KLK4 genine ait ekzon 2 ve ekzon 3 ü içeren ekspresyon primerleri tasarlandı. (bkz. Tablo 4.1).

**Tablo 4.1:** KLK4 geninin ekspresyonu için kullanılan primerler

Primer	$T_m$ (°C)	(bç)	Primer dizisi (5'→3')
Forward primer Ekspresyon 1	63	22	5'- GCGGCACTGGTCATGGAAAACG -3'
Forward primer Ekspresyon 2	64	19	5'- CTGCAGCCAAATCATAAAC -3'
Forward primer Ekspresyon 3	66	22	5'-CACTGGTCATGGAAAACGAATT-3'
Reverse primer Ekspresyon 1	64	21	5'-ATGAGGTCGTTAGCGAGCAAG-3'
Reverse primer Ekspresyon 2	68	21	5'-GCCAGAAACGAGGCAAGAGT-3'



**Şekil 4.9:** KLK4 transcript variant 1, Mrna, NM\_004917.5 dizisi üzerinde tasarlanan farklı primer dizileri

**ATGGCCACAGCAGGAAATCCCTGGGGCTGGTTCCTGGGGTACCTCATCCTTGGTGT** *Ekzon 1*

**CGCAG**GATCGCTCGTCTCTGGTAG**CTGCAGCCAAATCATAAACGGCGAGGACTGC** *Ekzon 2*

F2

AGCCCGCACTCGCAGCCCTGGCAG**GCGGCACTGGTCATGGAAAACGAATTGTTT**

F1

F3

TGCTCGGGCGTCCTGGTGCATCCGCAGTGGGTGCTGTCAGCCGCACACTGTTTCCA

GAAC**CTCCTACACCATCGGGCTGGGCCTGCACAGTCTTGAGGCCGACCAAGAGCCAG** *Ekzon 3*

**GGAGCCAGATGGTGGAGGCCAGCCTCTCCGTACGGCACCCAGAGTACAACAGACC**

**CTTGCTCGCTAACGACCTCATGCTCATCAAGTTGGACGAATCCGTGTCCGAGTCT**

R1

**GACACCATCCGGAGCATCAGCATTGCTTCGCAGTGCCTACC**CGGGGA**ACTCTTG**

**CCTCGTTTCTGGCTGGGGTCTGCTGGCGAACG**GCAGAA**TGCCTACCGTGCTGCAG** *Ekzon 4*

R2

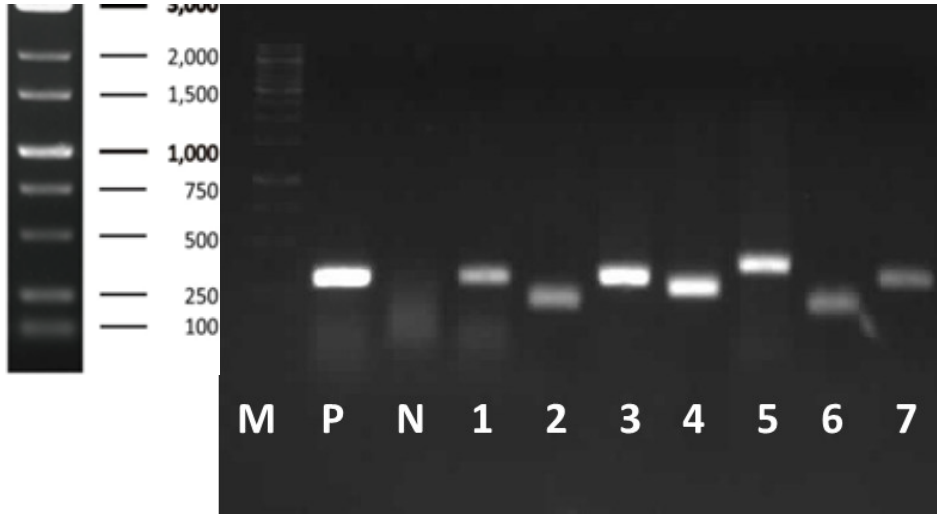
**TGCGTGAACGTGTCGGTGGTGTCTGAGGAGGTCTGCAGTAAGCTCTATGACCCGCT**

**GTACCACCCAGCATGTTCTGCGCCGGCGGAGGGCAAGACCAGAAGGACTCCTGC**

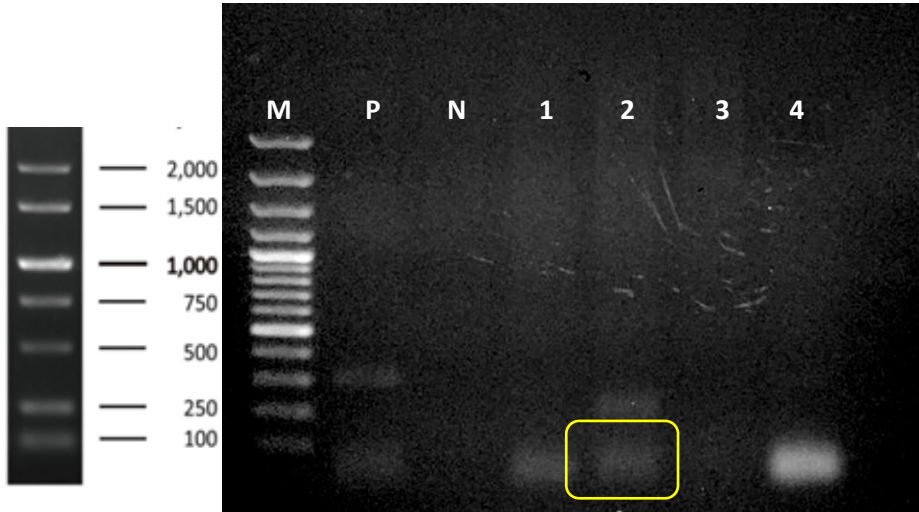
**AAC**GGTGA**CTCTGGGGGGCCCTGATCTGCAACGGGTA**CTTGCAGGGCCTTGTGTC *Ekzon 5*

TTTCGGAAAAGCCCCGTGTGGCCAAGTTGGCGTGCCAGGTGTCTACACCAACCTCT

GCAAAT**CTACTGAGTGGATAGAGAAAACCGTCCAGGCCAGTTAA**



**Şekil 4.9:** LNCaP hücrelerinde KLK4 genine yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (marker(M), pozitif kontrol(P), negatif kontrol(N), 1-5 Ekspresyon primeri).

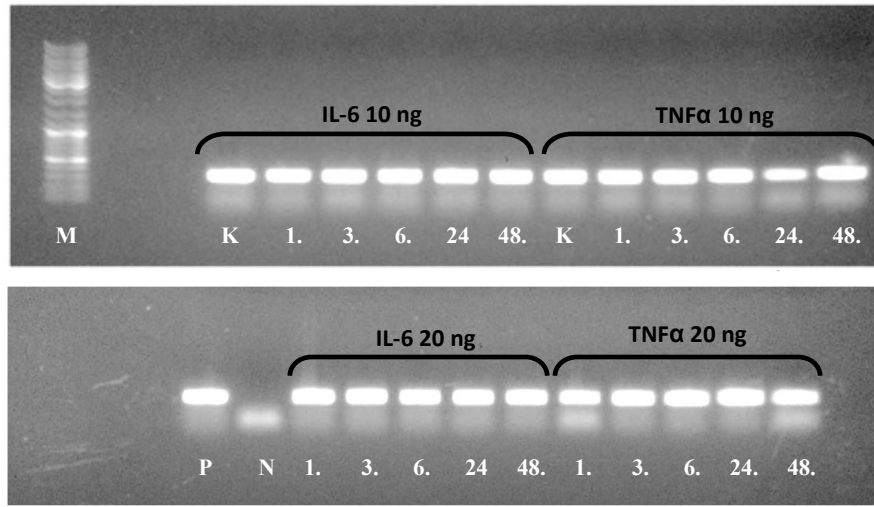


**Şekil 4.10:** PC3 hücrelerinde KLK4 genine yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (marker(M), pozitif kontrol(P), negatif kontrol(N), 2: Ekspresyon Primerleri F2-R1)

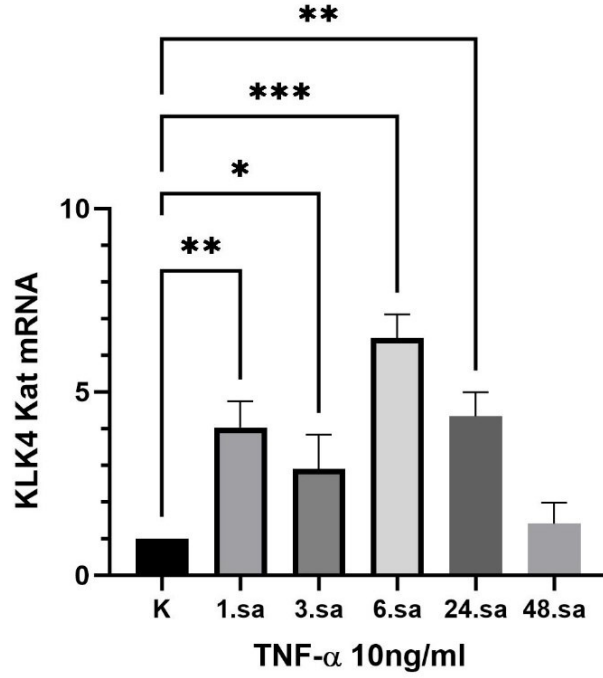
#### 4.4 PC3 Hücrelerinde IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin KLK4 geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin mRNA seviyesinde Belirlenmesi

PC3 hücre hatları Bölüm 3.2.4.4'de belirtilen teknikler kullanılarak sağlıklı bir şekilde büyütüldü ve mL'deki canlı hücre sayıları belirlendi. Daha sonra hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara, 2x10<sup>6</sup> hücre/flask olacak şekilde paylaştırıldı ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinleri son konsantrasyon 10 ng/mL-20 ng/mL olacak şekilde hücrelere uygulandı. Hücrelerden 1., 3., 6., 24. ve 48. saatler sonunda deney

ve kontrol gruplarından hücre pelleti alınarak Bölüm 3.2.8.1’de belirtildiği gibi RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA saflığı ve konsantrasyonu kontrol edildikten sonra 1 µg total RNA’dan cDNA eldesi (bkz. Bölüm 3.2.8.4.) yapılmıştır. cDNA kalıp olarak kullanılıp KLK4 genine spesifik ekspresyon primerleri (bkz Tablo 4.1) ile PCR yapılarak ekspresyon primerlerinin doğruluğu belirlenmiştir. (Şekil 4.9). Aynı zamanda hücre pelletlerinden hazırlanan tüm cDNA’ların kontrolü amacıyla insan Hβ-2 ekspresyon primerleri kullanılarak cDNA verimliliği belirlenmiştir. (Şekil 4.10).

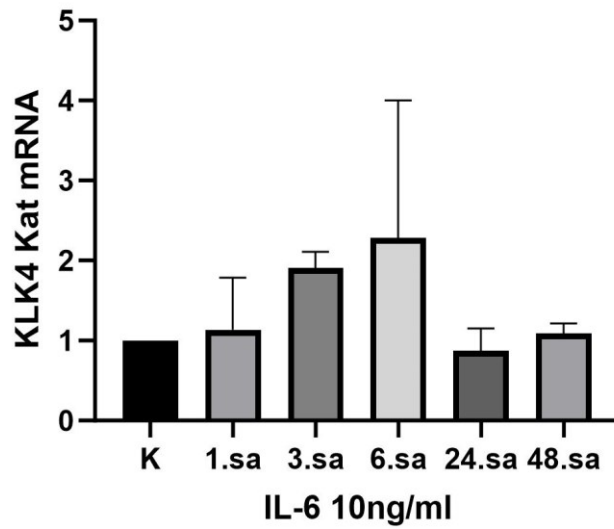


**Şekil 4.11:** PC3 hücrelerinde KLK4 genine yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (marker (M), pozitif kontrol (P), negatif kontrol (N), A: IL-6 10 ng/mL, B: IL-6 20 ng/mL, C: TNF-α 10 ng/mL, D:TNF- α 20 ng/mL)



**Şekil 4.12:** TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış PC3 hücrelerinde KLK4 geninin ekspresyonunun mRNA seviyesinde belirlenmesi (p<0,05(\*), p<0,01(\*\*), p<0,0001(\*\*\*))

TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış PC3 hücrelerinde KLK4 geninin mRNA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla 1., 3., 6. ve 24. saatte yaklaşık 3 kat fazla olduğu görülmektedir. Ancak 48. saat sitokin uygulama sonrasında kontrol grubuna kıyasla eşit olduğu ekspresyonun diğer uygulama saatlerine kıyasla azaldığı görülmektedir.

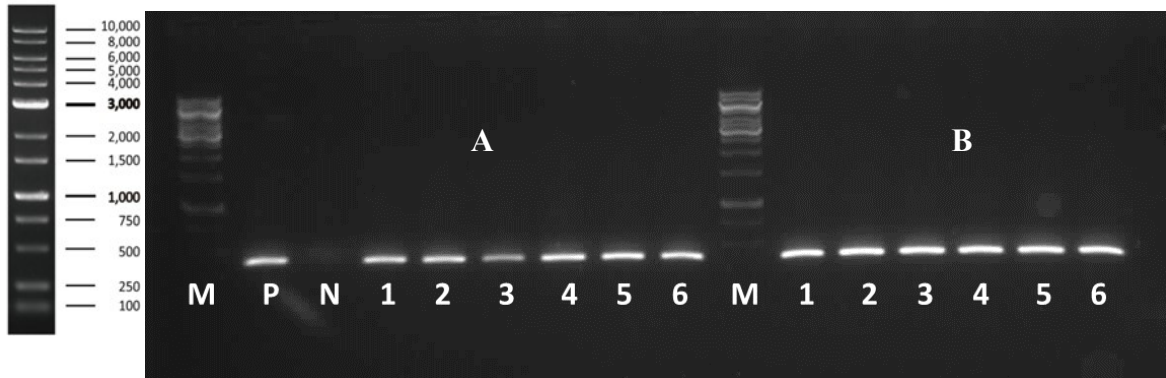


**Şekil 4.13:** IL-6 sitokini uygulanmış PC3 hücrelerinde KLK4 geninin ekspresyonunun mRNA seviyesinde belirlenmesi

IL-6 sitokini uygulanmış PC3 hücrelerinde KLK4 geninin mRNA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla 3. ve 6. saatte yaklaşık 2 kat fazla olduğu görülmektedir. Ancak 24. saat sitokin uygulama sonrasında kontrol grubuna kıyasla eşit hale geldiği görülmektedir. 48. Saat uygulama sonrasında ise ekspresyonun seviyesinin tekrar 2 kata yakın arttığı belirlenmiştir.

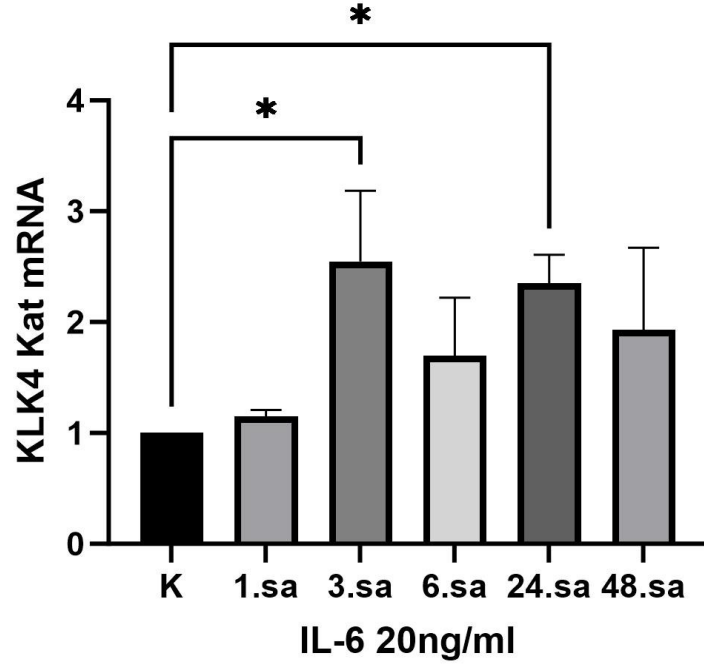
#### 4.5 LNCaP Hücrelerinde IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinlerinin KLK4 geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisininin mRNA seviyesinde Belirlenmesi

LNCaP hücre hatları Bölüm 3.2.4.4’de belirtilen teknikler kullanılarak sağlıklı bir şekilde büyütüldü ve mL’deki canlı hücre sayıları belirlendi. Daha sonra hücreler 6’ lı plakalara 300.000 hücre/flask olacak şekilde paylaştırıldı ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinleri son konsantrasyon 20 ng/mL olacak şekilde hücrelere uygulandı. Hücrelerden 1.3.6.24. ve 48. saatler sonunda deney ve kontrol gruplarından hücre pelleti alınarak Bölüm 3.2.8.1’de belirtildiği gibi RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA saflığı ve konsantrasyonu kontrol edildikten sonra 1  $\mu$ g total RNA’dan cDNA eldesi (bkz. Bölüm 3.2.8.4.) yapılmıştır. cDNA kalıp olarak kullanılıp KLK4 genine spesifik ekspresyon primerleri (bkz Tablo 4.2) ile PCR yapılarak ekspresyon primerlerinin doğruluğu belirlenmiştir. Aynı zamanda hücre pelletlerinden hazırlanan tüm cDNA’ların kontrolü amacıyla insan H $\beta$ -2 ekspresyon primerleri kullanılarak cDNA verimliliği belirlenmiştir. (Şekil 4.15).



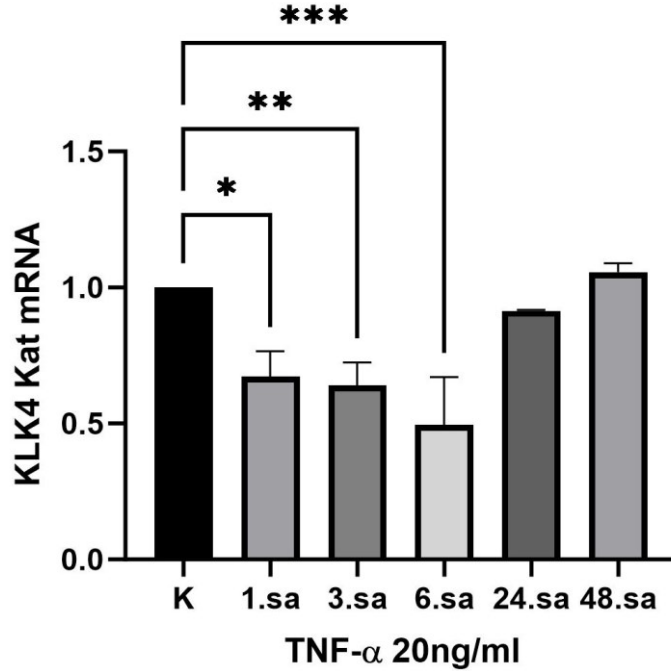
**Şekil 4.14:** LncAP hücrelerinde KLK4 genine yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: marker, P: pozitif kontrol, N: negatif kontrol, A 1-6 kuyular IL-6 uygulanmış sırası ile K,1sa,3sa,6sa,24sa,48sa,B1-6 kuyular TNF- $\alpha$  uygulanmış sırası ile K,1sa,3sa,6sa,24sa,48sa)

IL-6 sitokini uygulanmış LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin mRNA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla 4., 24. ve 48. saattelerde yaklaşık 2-3 kat fazla olduğu görülmektedir. Diğer saatlerde sitokin uygulama sonrasında kontrol grubuna kıyasla ekspresyon seviyesinin arttığı görülmektedir.



**Şekil 4.15:** IL-6 sitokini uygulanmış LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin ekspresyonunun mRNA seviyesinde belirlenmesi ( $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*))

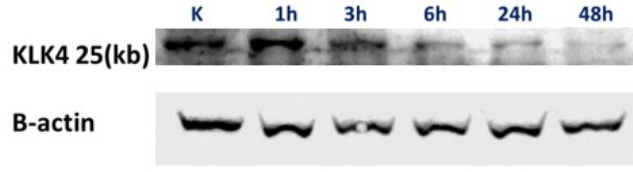
TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin mRNA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla 1., 3., ve 6. Saatlerde ekspresyon seviyesinin yarıya yakın azalma gösterdiği, 24. ve 48. Saatlerde ekspresyonda ciddi bir artış yada azalma olmadığı belirlenmiştir.



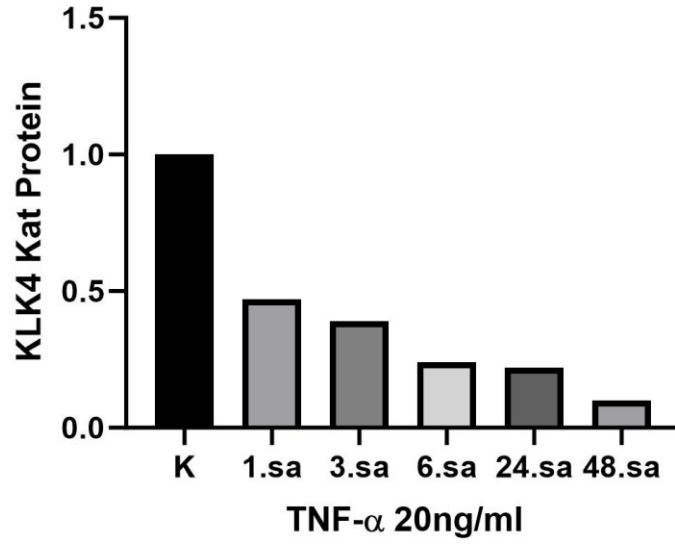
**Şekil 4.16:** TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin ekspresyonunun mRNA seviyesinde belirlenmesi ( $p < 0,05$ (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,0001$ (\*\*\*)

#### 4.6 KLK4 Geninin LnCAP Hücrelerinde IL-6 ve TNF- $\alpha$ Uygulamasının Protein Seviyesinde Doğrulanması

KLK4 Geninin LnCAP hücrelerinde sitokin uygulaması sonucunda protein seviyelerindeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla western blot deneyi yapılmıştır. Bölüm 3.2.9.2. de anlatıldığı gibi LnCAP hücreleri sayılarak 6'lı plakalara eekilmiş ve belirli saat aralıklarında sitokin uygulaması yapılmıştır. Bölüm 3.2.9.4'te anlatıldığı gibi western blot deney basamakları uygulanarak deney sonlandırılmıştır.

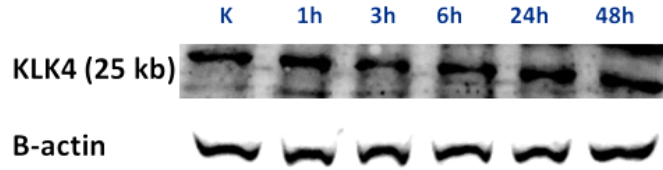


Şekil 4.17: LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış protein bantları

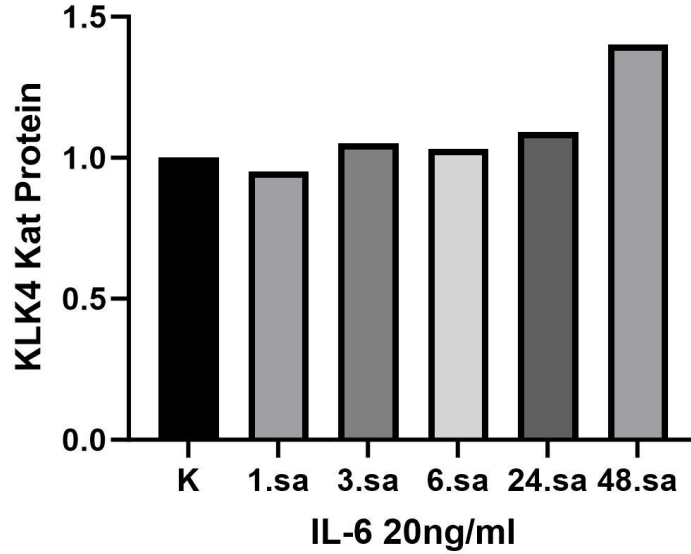


Şekil 4.18: LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış protein seviyeleri





**Şekil 4.19:** LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin IL-6 sitokini uygulanmış protein bantları

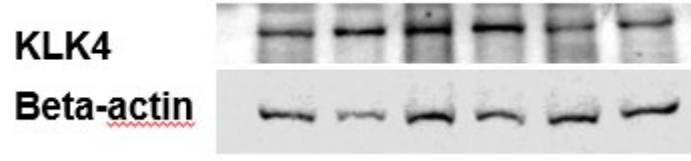


**Şekil 4.20:** LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin IL-6 sitokini uygulanmış protein düzeyinin belirlenmesi

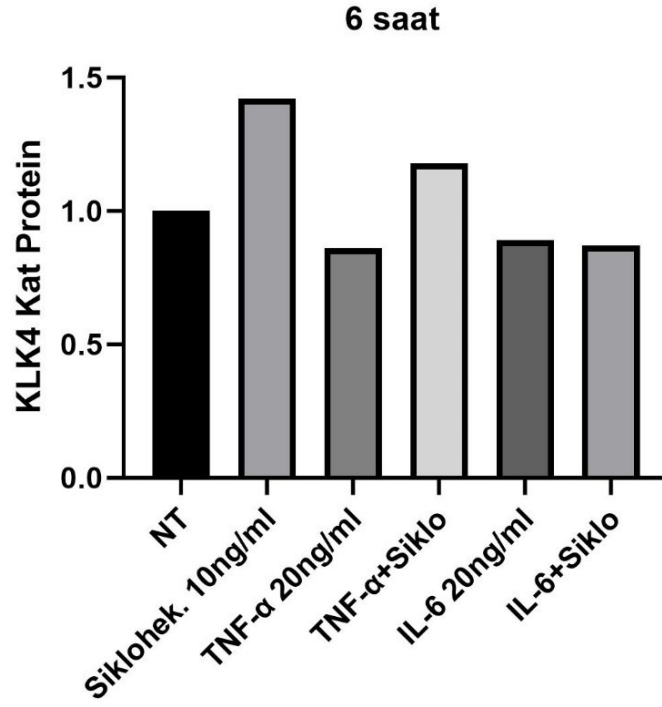
#### 4.7 LNCaP Hücrelerinde Siklohegzimid Uygulaması ile Translasyonun

##### Durdurulması

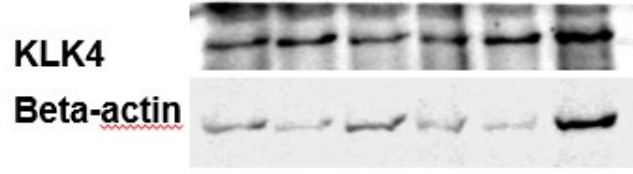
LNCaP hücre hatları Bölüm 3.2.9.7’de belirtilen teknikler kullanılarak sağlıklı bir şekilde büyütüldü ve mL’deki canlı hücre sayıları belirlendi. Daha sonra hücreler 6’ lı plakalara 300.000 hücre/flask olacak şekilde paylaştırıldı ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinleri son konsantrasyon 20 ng/mL olacak şekilde hücrelere uygulandı. Uygulamadan 1 saat sonra son konsantrasyonu 10 ng/mL olacak şekilde siklohegzimid uygulandı. Hücrelerden 6., 24. ve 48. saatler sonunda deney ve kontrol gruplarından hücre pelleti alınarak RIPA ile protokol uygulanarak gerekli basamaklar yapıldıktan sonra Bradford yöntemiyle protein miktarları belirlenerek western blot deneyinde kullanılmak üzere -80°C’de saklandı.



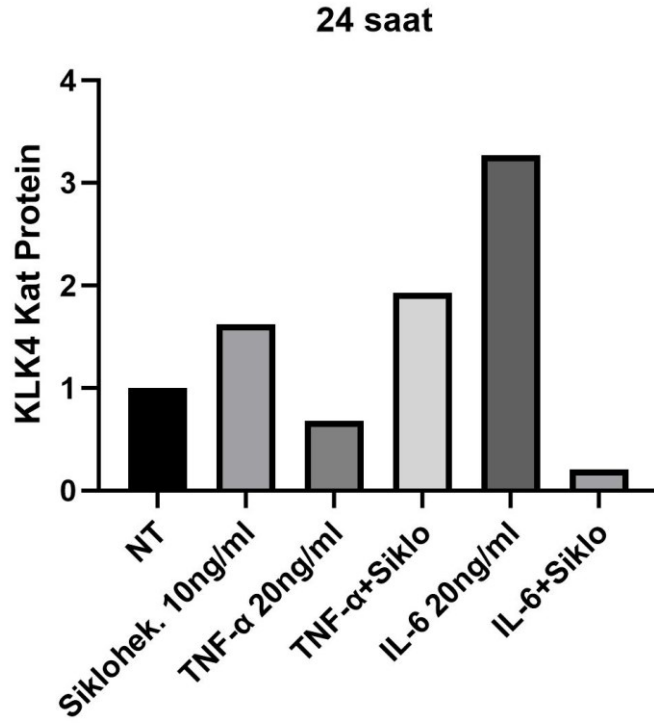
Şekil 4.21 Siklohegzimid uygulaması (6. Saat) protein bantları



Şekil 4.22. Siklohegzimid uygulaması (6. Saat) protein seviyesinin belirlenmesi



Şekil 4.23 Siklohegzimid uygulaması (24. Saat) protein bantları



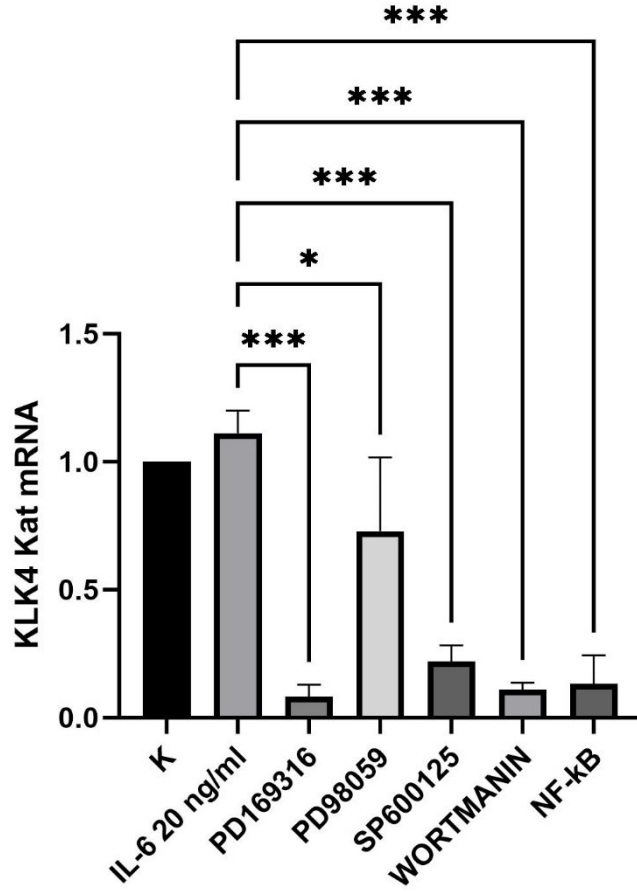
Şekil 4.24 Siklohegzimid uygulaması (24. Saat) protein seviyesinin belirlenmesi

#### 4.8 Farklı Yolak inhibitörlerinde KLK4 Geninin İfadesinin Belirlenmesi

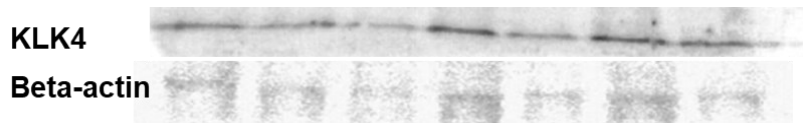
Yolak inhibisyon deneyi kurmak için öncelikle hazırlanan petrielerde yüzeye tutunan hücrelerin besiyeri %0.1 BSA içeren DMEM ile değiştirilmiştir. 45 dk. sonra inhibitörler PD98059 (MEK inhibitörü), SP600125 (JNK inhibitörü), NF-κB (NF-κB İnhibitörü), PD169316 (p38 MAPK inhibitörü), WORTMANNIN (PI3K inhibitörü), eklenip 1 sa. inkübasyondan sonra 20 ng/mL olacak şekilde TNF-α ve IL-6 sitokinleri uygulanmıştır. Bu uygulama sonucunda IL6 sitokini uygulanmış gruplarda mRNA düzeyinde dört farklı yolakta KLK4 geninin ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlenmiştir.

**Tablo 4.4.** Kullanılan İnhibitörler

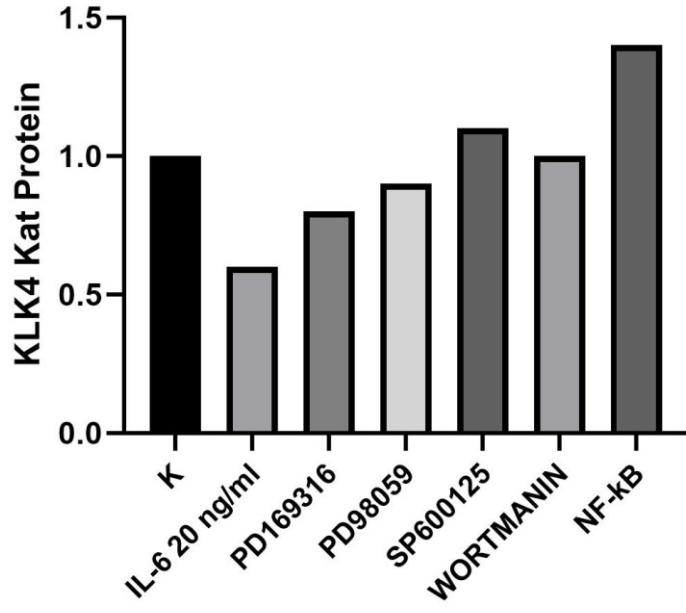
Yolak Adı	Etkili Olduğu Yolak	Konsatrasyon
WORTMANNIN	PI3K inhibitörü	2 $\mu$ M
PD98059	MEK inhibitörü	5 $\mu$ M
SP600125	JNK inhibitörü	5 $\mu$ M
NF- $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B İnhibitörü	5 $\mu$ M
PD169316	p38 MAPK inhibitörü	20 $\mu$ M



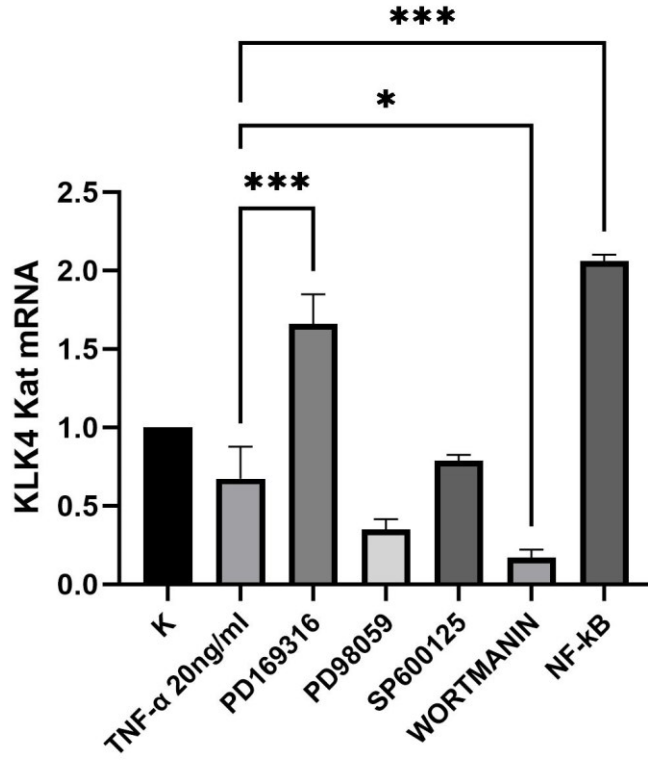
**Şekil 4.25:** LNCaP hücrelerinde KLK4 geninin IL-6 sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri mRNA seviyesinde belirlenmesi



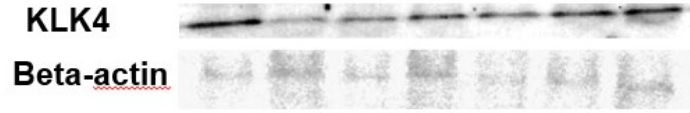
**Şekil 4.27.** LNCaP hücrelerinde KLK4 geninin IL-6 sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri protein düzeyi belirlenmesi



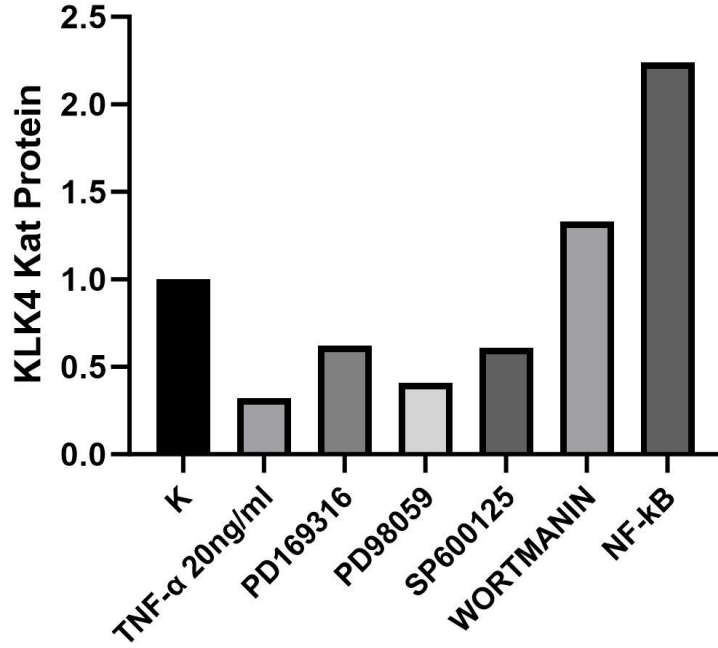
Şekil 4.26: LNCaP hücrelerinde KLK4 geninin IL-6 sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri protein düzeyi belirlenmesi



Şekil 4.27: LNCaP hücrelerinde KLK4 geninin TNF-α sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri mRNA seviyesinde belirlenmesi



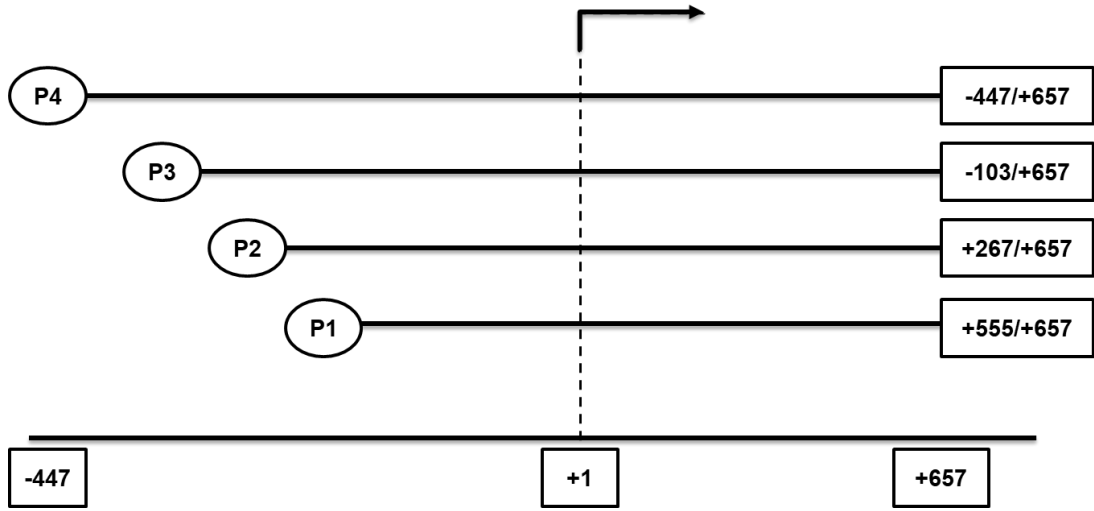
**Şekil 4.28:** LnCAP hücrelerinde KLK4 geninin TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri protein bantları



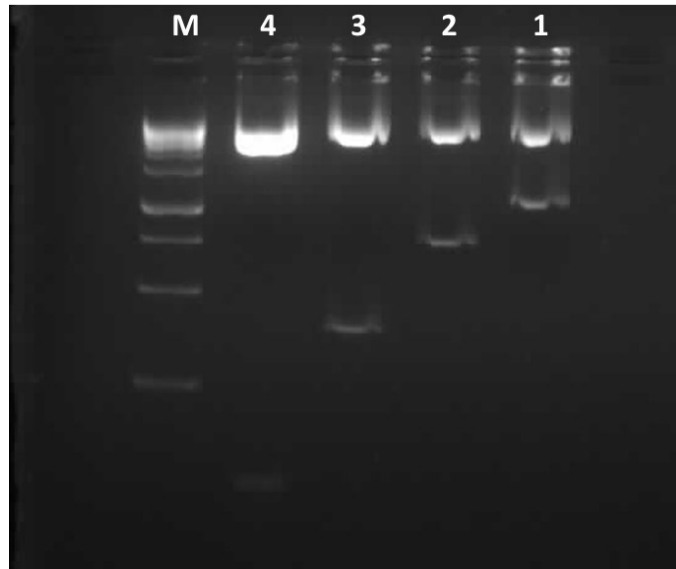
**Şekil 4.29:** LNCap hücrelerinde KLK4 geninin TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış yolak inhibitörleri protein seviyesinde belirlenmesi

#### 4.9 IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinleri ve Yolak İnhibitörlerinin KLK4 Promotor Parçalarına Transkripsiyonel Etkisinin Belirlenmesi

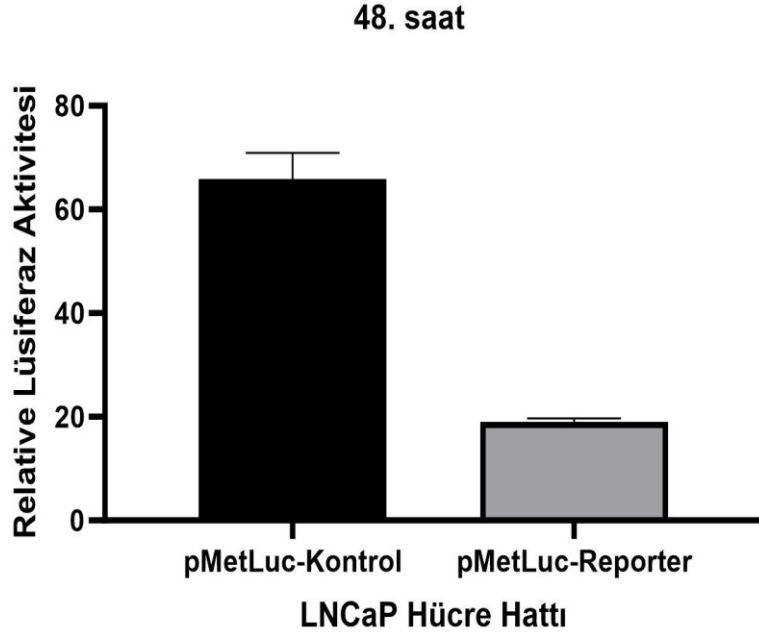
KLK4 genine ait promotör parçalarının transkripsiyonel aktivitesini araştırmak için Dr. Fatma Poyrazlı tarafından pMetLuc vektöründe klonlanmış olan promotör parçaları, restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimine tabi tutuldu. Bu promotör parçalarının klonlanmış oldukları agaroz jelde görüntülenerek her bir promotör parçasının büyüklüğü kanıtlandı (Şekil 4.31). Dört farklı promotör parçası, Bölüm 3.2.5.1’te belirtildiği gibi Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metoduyla geçici olarak transfekte edildi ve ardından lusiferaz aktivitesi ile SEAP aktivitesi ölçüldü. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafiklendirildi ve ANOVA testi ile analiz edildi.



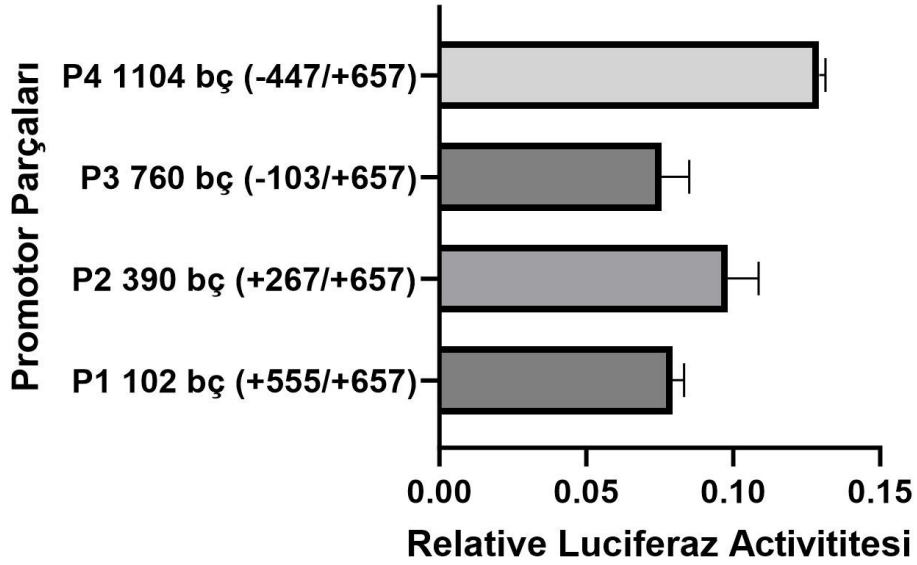
**Şekil 4.30:** KLK4 promotör parçalarının şematik gösterimi 4)-447/+657 , 3)-103/+657, 2)+267/+657, 1) +555/+657



**Şekil 4.31:** Promotor parçalarının restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimi agaroz jel görüntüsü. (M=marker, 4)-447/+657 , 3)-103/+657, 2)+267/+657, 1) +555/+657).



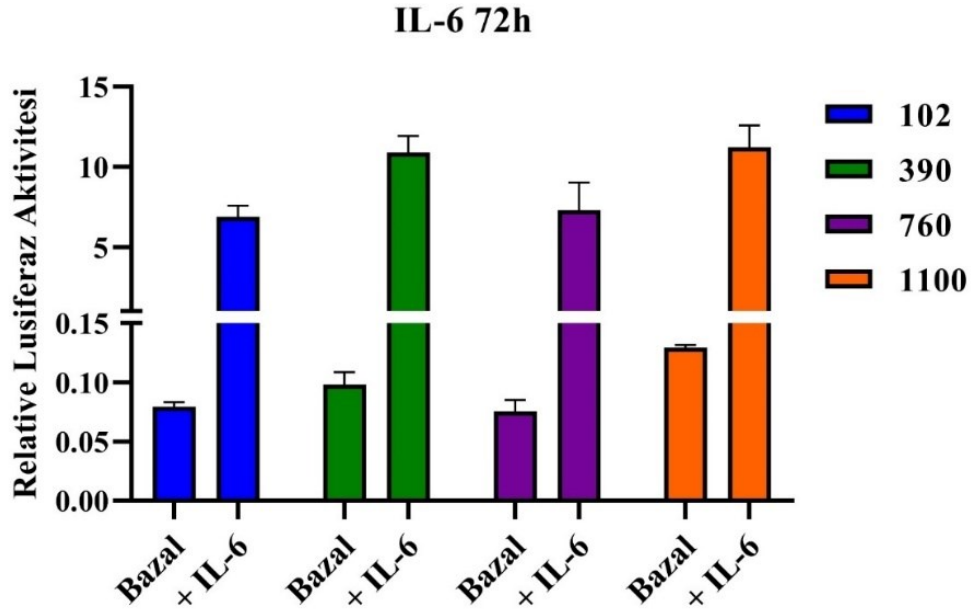
Şekil 4.32: pMetLuc-Kontrol ve pMetLuc-Reporter ektörlerinin transfeksiyon etkinliği



Şekil 4.33: KLK4 geninin promotör parçalarının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri

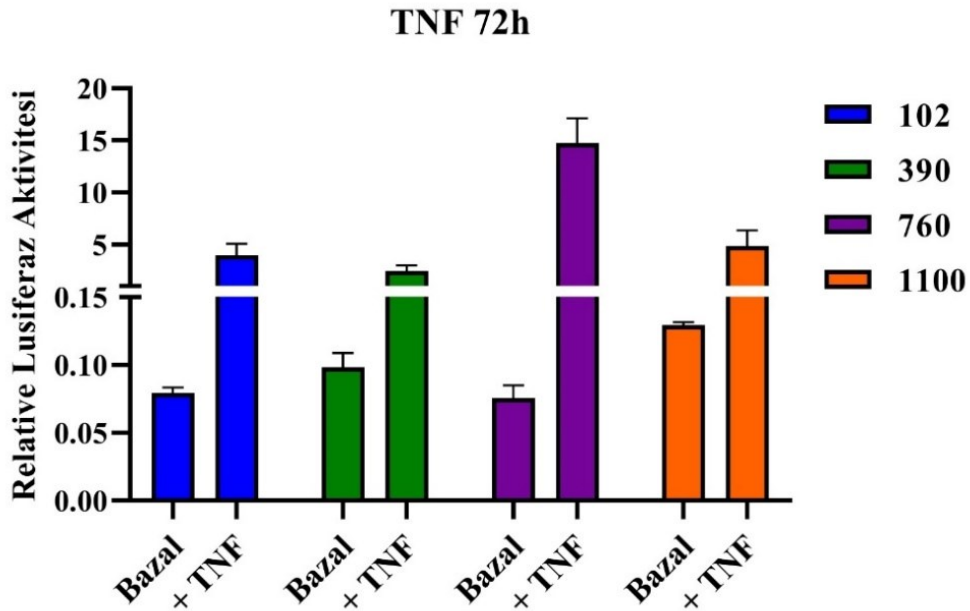
Promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktiviteleri incelendiğinde, P4 (1104) promotör parçasının en yüksek transkripsiyonel aktiviteyi gösterdiği belirlendi (Şekil 4.34). Promotor parçaları transfekte edildikten sonra 20 ng/mL IL-6 sitokini uygulandı ve promotör aktivitelerinde artış gözlemlendi. En yüksek artışın P4: -447/+657 promotör parçasında meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.35).





Şekil 4.34: KLK4 promotor parçalarının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve IL-6 sitokin'in transkripsiyonel aktivitelere etkisi.

Promotor parçaları transfekte edildikten sonra 20 ng/mL TNF- $\alpha$  sitokini uygulandı ve promotor aktivitelerinde artış gözlemlendi. En yüksek artışın P3: -103/+657 promotor parçasında meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.36).

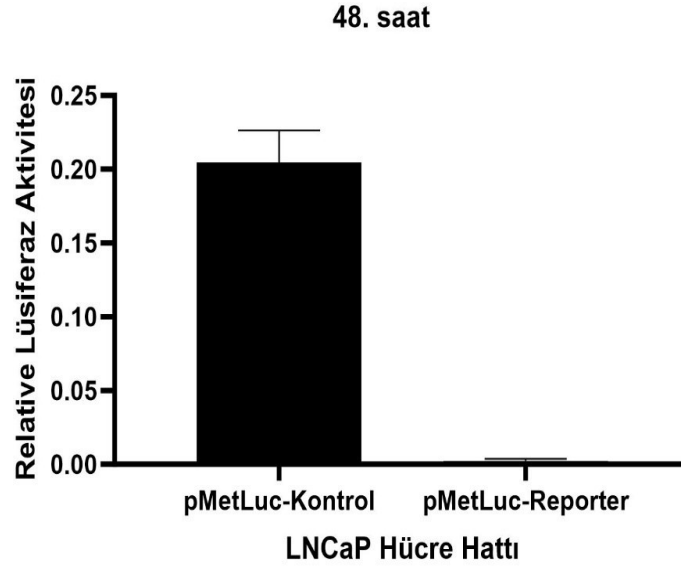


Şekil 4.35: KLK4 promotor parçalarının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve TNF- $\alpha$  sitokin'in transkripsiyonel aktivitelere etkisi.

#### 4.10 IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinleri ve Yolak İnhibitörlerinin KLK4 Geninin 1100 bç'lik Promotor Parçası için Transkripsiyonel Etkisinin Belirlenmesi

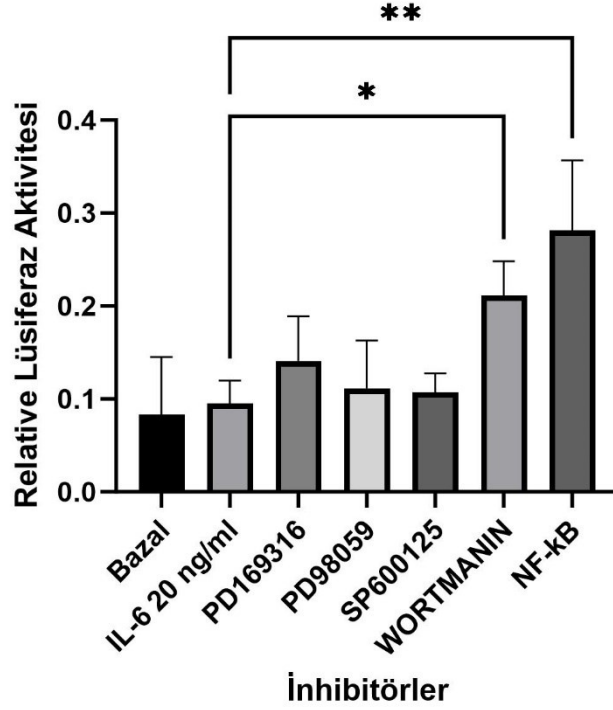
Promotör çalışmaları için tasarlanmış olan promotör parçalarından en büyüğü 1100 baz çiftlik promotör parçası için bölüm 3.2.2.6.'de belirtildiği gibi kalsiyum-fosfat prespitasyon metoduyla geçici olarak transfekte edilerek bölüm 3.2.2.7. belirtilen Lusiferaz Aktivitesinin ve SEAP Aktivitesinin Ölçümü protokolüne uygun olarak deneyleri yapıp sonuçlar değerlendirilmiştir.

Yapılan trasfeksiyon etkinliği pMetLuc-Reporter' karşı pMetLuc-Kontrol'ün lüsiferaz aktivitesi belirlenerek 48. saat sonuçları belirlenerek transfeksiyon etkinliği Şekil 4.36'da gösterilmiştir.

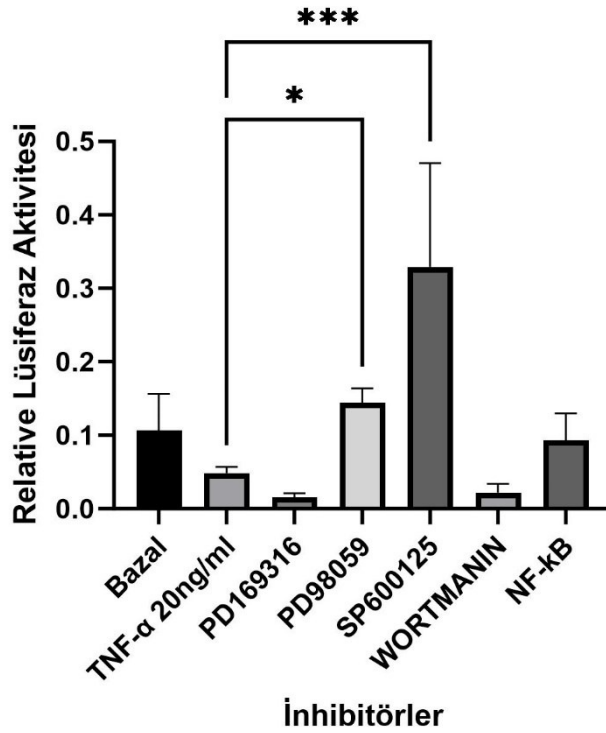


**Şekil 4.36:** pMetLuc-Kontrol ve pMetLuc-Reporter ektörlerinin transfeksiyon etkinliği (1104bç promotör parçası)

IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış hücre hatlarına belirlenen saatte ve dozda yolak inhibitörleri uygulanarak uytgulama sitokinlerine kıyasla farklı yolkaların lüsiferaz aktivite belirlenerek Şekil 4.47-4.38.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.37: 1104bç'lik KLK4 promotor parçasının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve IL-6 sitokin'in transkripsiyonel aktivitelere etkisi.

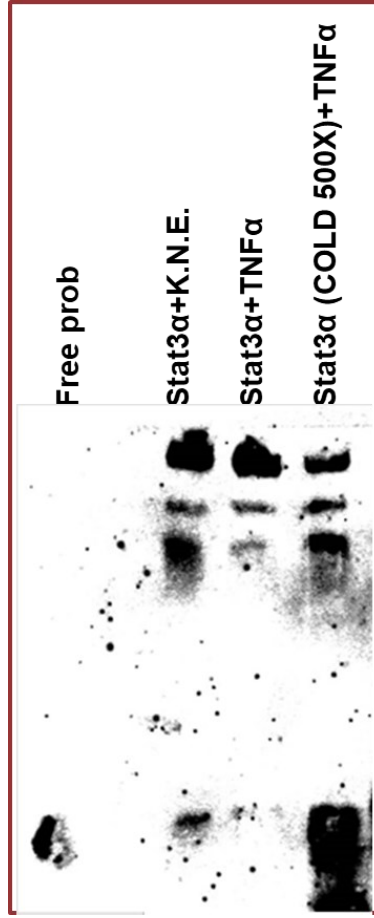


Şekil 4.38: 1104bç'lik KLK4 promotor parçasının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve TNF-α sitokin'in transkripsiyonel aktivitelere etkisi.

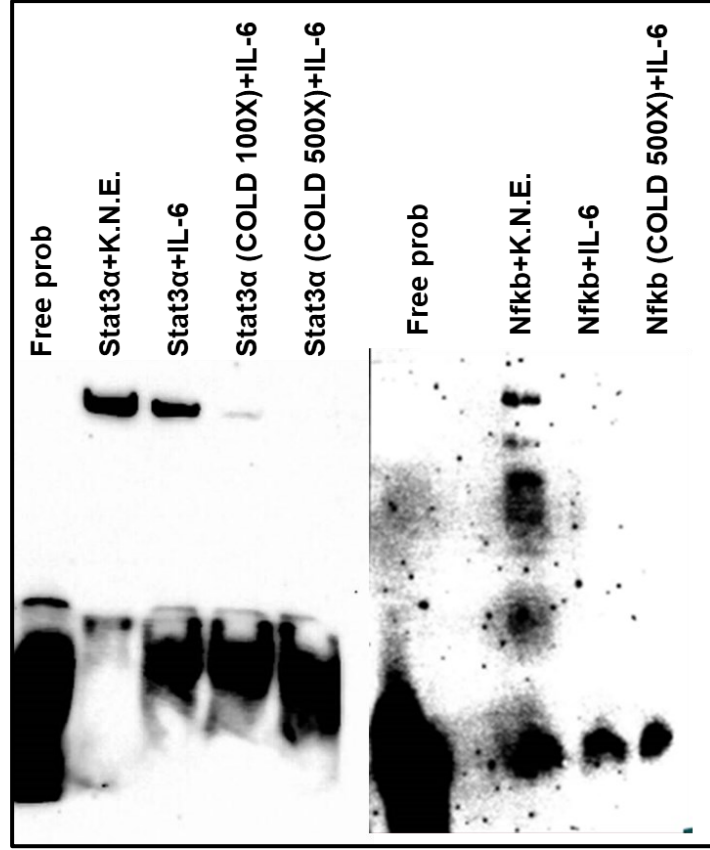
#### **4.11 IL-6 ve TNF- $\alpha$ Sitokinleri Uygulanmış LNCaP Nükleer Ekstraktlarında STAT-3 ve NF $\kappa$ B Transkripsiyon Faktörlerinin Aktifliğinin EMSA ile Belirlenmesi**

Transkripsiyonun başlangıç kısmı olarak kabul edilen promotör bölgesi aynı zamanda transkripsiyon faktörlerinin de bağlandığı bir lokasyon olarak gen ekspresyon düzenlemesinde görev alırlar. Bu doğrultuda androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattının promotör bölgesine hangi transkripsiyon faktörlerinin bağlanacağını araştırılması ilgili genin regülasyonu anlaşılmasını zemin hazırlayacaktır. Bu doğrultuda KLK4 genini promotörlerindeki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerine STAT-3 ve NF $\kappa$ B'nin bağlanma ilgisini belirlemek amacıyla Bölüm 3.2.10.1'de açıklandığı gibi EMSA deneyleri gerçekleştirildi. Androjen bağımlı bir prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP hücrelerinde son konsantrasyon 20 ng/mL TNF- $\alpha$ , 20 ng/mL IL-6 olacak şekilde sitokinler uygulandı. Uygulama yapılan hücrelerden Bölüm 3.2.10.1'de belirtildiği gibi nükleer ekstraktlar hazırlandı. Buna göre TNF- $\alpha$  uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP nükleer ekstraktlarda, Biotin etiketlenmiş Stat3a konsensus dizisinin bağlanma reaksiyonunun gerçekleştiği görülmektedir. Şekil 4.40 da üç DNA protein kompleksinin oluştuğu görülmektedir. Ancak 500 kat uygulanmış biyotinlenmemiş probun 1. Kompleksin yoğunluğunun bir miktar azalttığı görülmektedir.

IL-6 uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP nükleer ekstraktlarda, Biotin etiketlenmiş Stat3a ve NF $\kappa$ B konsensus dizisinin bağlanma reaksiyonunun gerçekleştiği görülmektedir. Buna Stat3a konsensus dizi ile IL6 uygulanmış nükleer ekstraktlarında bir kompleks oluştuğu bu kompleksinde, 100x de büyük ölçüde kaybolduğu fakat 500x soğuk probda tamamen kaybolduğu anlaşılmaktadır. Biotin uygulanmış NF $\kappa$ B konsensus probunun 3 den fazla DNA-protein kompleksi oluşturduğu ve bu komplekslerin 500X etiketlenmiş probun ile yarıştığı anlaşılmaktadır (Şekil 4.41).



**Şekil 4.39:** TNF- $\alpha$  sitokini uygulanmış KLK4 EMSA görüntüsü.



Şekil 4.40: IL-6 sitokini uygulanmış KLK4 probunun EMSA görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Prostat kanseri dünya genelinde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Erkeklerde en sık görülen ikinci kanser olup, kansere bağlı ölümlerin beşinci önde gelen nedenidir [112]. Prostat kanserinin erken tespiti, büyük ölçüde yaygın olarak kullanılan ve KLK3 geni tarafında üretilen prostat spesifik antijen (PSA) proteininin kan testi ile belirlenmesi ile yapılmaktadır [113].

İnsan kallikrein (KLK) lokusu, kromozom 19q13.3–13.4 üzerinde yaklaşık 265 kb'lik bir alanı kaplar ve insanlardaki en büyük ardışık peptidaz kümesini oluşturur [114]. Toplam 15 üyesi olan KLK gen ailesi birçok farklı kanser türünde rol almaktadırlar. Örneğin, KLK2 ve KLK3, prostatta en yüksek düzeyde ifade edilen genlerden ikisidir [115]. KLK1, böbrek, tükürük bezi ve pankreasta bol miktarda bulunurken, KLK6 merkezi sinir sisteminde yüksek düzeyde ifade edilir. Ancak, bu kallikreinlerin hiçbiri tamamen dokuya özgü değildir. KLK3, prostatta bulunduğu konsantrasyonlardan 100 kat daha düşük konsantrasyonlarda olsa da, tükürük bezi, beyin, meme ve diğer dokularda da tespit edilmiştir. Birkaç kallikrein farklı seviyelerde genellikle aynı dokuda ifade edilebilir [116, 117].

KLK gen ailesinin önemli bir üyesi olan KLK4 özellikle prostat kanserinde yüksek oranda ifade edildiği için özel bir ilgi olmuştur ve birçok araştırma yapılmıştır. KLK4 ifadesi prostat kanseri hücrelerinde ifadesi mRNA ve protein düzeyinde androjenler tarafından aşırı ifade edilmektedir. Prostat kanseri hücrelerinde en baskın KLK4 transkriptinin, ekzon 2'de bulunmaktadır. Bu transkript ve klasik KLK4 formu da androjen tarafından regüle edilir. [59, 118].

Literatür incelendiğinde KLK4 geninin sitokinlerle regülasyonu üzerine yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu doğrultuda birçok farklı kanser süreçlerinde rol oynayan IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin KLK4 geni ifadesine etkilerinin araştırılması ve transkripsiyonel düzeyde hangi transfeksiyon bağlanma bölgeleri üzerinden regüle edildiği ile ilgili bir çalışma bulunamamaktadır.

Çalışmamız kapsamında androjen bağımsız PC-3 ve androjen bağımlı LNCaP hücre hatları kullanılmıştır. Yapılan tüm deneysel çalışmalar boyuncu kullanılan hücre hatları doğru protokoller ve koşullar altında pasajlanıp, stoklandı. Tez kapsamında ilk olarak IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin farklı doz ve farklı zaman aralıklarında kullanılan hücre hatları üzerindeki

proliferatif etkisi araştırılmıştır. Her iki hücre hattı içinde 20 /mL düzeyinde sitokin kullanılması kararlaştırılmış ve tüm deneylere bu doz üzerinden devam edilmiştir.

Devamında IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin KLK4 geni üzerine mRNA ve protein düzeyinde etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı uzunluklarda ekspresyon primeleri tasarlanarak PCR ile KLK4 gen bölgesinin ekspresyonu amaçlanmıştır. Yapılan Real TIME deneylerinde PC3 hücre hatlarında oldukça düşük seviyede KLK4 ekspresyonu belirlediği için devamında yapılan tüm deneylere LNCaP hücre hatlarıyla devam edilmiştir. IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinleri kullanılarak yapılan gen ifadesi deneylerinde hem mRNA hem de protein düzeylerinde IL-6 sitokini uygulanan gruplarda gen ifadesinin artmış olduğu belirlenmiştir. Ancak TNF- $\alpha$  uygulanan deney gruplarında klk gen ifadesinin baskılandığı belirlenmiştir.

KLK4 ifadesinin belirlenmesi amacıyla deneysel çalışmalarda kullanılan sitokinler aracılığıyla gen ifadesinin hangi yollar aracılığıyla düzenlendiğinin belirlenmesi için LNCaP hücre hatlarına yolak inhibitörleri uygulandı. PI3K inhibitörü, MEK inhibitörü, P38/MAPK inhibitörü, JNK inhibitörü, NFkB inhibitörü olmak üzere toplam beş yolak inhibitörü IL-6 ve TNF- $\alpha$  varlığında hücrelere uygulanmıştır. mRNA ve protein düzeyinde KLK4 geninin ekspresyonu belirlenmeye amaçlanmıştır. IL-6 sitokini ile yolak inhibitörlerinin beraber uygulandığı gruplarda NFkB, PI3K ve P38/MAPK yollarında gen ifadesinin oldukça azaldığı belirlenmiştir. TNF- $\alpha$  uygulanan deney gruplarında ise PI3K ve MEK yollarında ifadenin azaldığı ancak NFkB, P38/MAPK yollarında ifadenin oldukça fazla artış gösterdiği belirlenmiştir. Aynı şekilde protein düzeyinde özellikle TNF- $\alpha$  uygulanmış gruplarda NFkB yolağında aşırı ifade olduğu doğrulanmıştır.

Sikloheksimid tabanlı transkripsiyon durdurma deneylerinde hem IL-6 hem de TNF- $\alpha$  sitokinleri uygulanarak protein düzeyine olan etkileri belirlenmiştir. 6 saat sikloheksimid uygulama sonuçlarına göre protein ifadesinin TNF- $\alpha$  uygulanan gruplarda arttığı ancak IL-6 uygulanan gruplarda ifadenin değişmediği belirlenmiştir. 24 saat sikloheksimid uygulama sonuçlarına göre ise TNF- $\alpha$  uygulanan gruplarda gen ifadesinin arttığı ancak IL-6 uygulama gruplarında neredeyse 3 kat azaldığı belirlenmiştir.

Transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması amacıyla dört farklı promotör parçası hazırlanarak bunların LNCaP hücrelerine transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyon sonunda



lüsiferaz deneyleriyle bazal aktivite belirlenmiştir. KLK4 promotör parçalarının LnCAP hücrelerinde bazal transkripsiyonel aktiviteleri ve IL-6 sitokin'in transkripsiyonel regülasyon üzerine aktivite etkisi yapılan istatistiksel analizler sonucunda belirlenmiştir. 48 saatlik sonuçlara göre bazal aktiviteye kıyasla IL-6 uygulanan dört farklı promotör parçasında gen ifadesinde artış gözlenmiştir. TNF- $\alpha$  uygulanmış 48 saatlik sonuçlarda da bazala kıyasla tüm promotör parçalarında yüksek aktivite belirlenmiştir.

Transkripsiyonel aktivitenin en uzun promotör parçası üzerinden yolak inhibisyon çalışmalarıyla belirlenmesi amacıyla yapılan deneyler sonucunda uygulanan PI3K inhibitörü, MEK inhibitörü, P38/MAPK inhibitörü, JNK inhibitörü, NF $\kappa$ B inhibitörü yolak inhibitörlerinin aktiviteli her iki sitokin uygulama deneylerinde belirlenmiştir. IL-6 sitokini uygulanan gruplarda NF $\kappa$ B, PI3K ve P38/MAPK inhibitörlerinin uygulandığı gruplarda yüksek gen ifadesi belirlenmiştir. TNF- $\alpha$  uygulanmış sitokini uygulanmış deney gruplarında ise bazal aktiviteye kıyasla JNK ve MEK inhibitörü uygulanan gruplarda yüksek ifade belirlenirken diğer inhibitör uygulamalarında bazala kıyasla daha düşük bir aktivite gözlenmiştir.

Transkripsiyonel aktivitenin hangi transkripsiyon faktörü aracılığıyla yapıldığının belirlenmesi amacıyla ilk önce biyoinformatik analizler yapılarak KLK4 geninin promotöründeki muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin belirlenmesi sağlanarak diziye özgü olacak şekilde problemler tasarlandı. Tasarlanan problemlere Terminal Deoksinükleotidil Transferaz enzimi kullanılarak Biotin takıldı. DNA-protein etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla IL-6 ve TNF- $\alpha$  uygulanmış LNCaP hücrelerinden nükleer ekstrakt oluşturularak EMSA deneyleri gerçekleştirildi. Yapılan deneysel analiz sonucunda tasarlanan KLK4 gen problemlerinde hem STAT-3 hem de NF $\kappa$ B transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesinin bulunduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak; KLK4 geninin IL-6 ve TNF- $\alpha$  sitokinleriyle mRNA ve protein düzeyinde regüle edildiği ve ekspresyonunun indüklendiği ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca, IL-6 ve TNF- $\alpha$  aracılığıyla gerçekleştirilen transkripsiyonel regülasyonun nasıl olduğu bu çalışma ile ilk kez ortaya konmuştur. KLK geninin IL-6 ve TNF- $\alpha$  varlığında promotör seviyesinde farklı konstraklarda promotör aktivitesinin nasıl regüle edildiği ve bu düzenlemenin hangi yollar üzerinden gerçekleştiği aydınlatılmıştır. Yapılan EMSA deneyleri ile STAT3 ve NF $\kappa$ B transkripsiyon faktörlerinin işlevsel olarak bağlanma analizi de bu çalışma ile ilk kez ortaya

konmuştur. Bu çalışma, gelecekte KLK4 geninin regülasyonunun sitokinler, inhibitörler ve transkripsiyon faktörleri tarafından daha detaylı bir şekilde incelenmesine zemin hazırlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] CancerToday, Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Males, in 2022. 2022, <https://gco.iarc.who.int>.
- [2] Rani, A., P. Dasgupta, and J.J. Murphy, Prostate cancer: the role of inflammation and chemokines. *The American journal of pathology*, 2019. 189(11): p. 2119-2137.
- [3] Rawla, P., Epidemiology of prostate cancer. *World journal of oncology*, 2019. 10(2): p. 63.
- [4] Taitt, H.E., Global trends and prostate cancer: a review of incidence, detection, and mortality as influenced by race, ethnicity, and geographic location. *American journal of men's health*, 2018. 12(6): p. 1807-1823.
- [5] Haas, G.P., et al., The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *The Canadian journal of urology*, 2008. 15(1): p. 3866.
- [6] Konski, A., Evaluating the Addition of Total Androgen Suppression to Radiation versus Radiation Alone for Locally Advanced Prostate Cancer. *Radiation Oncology REVIEW*, 2004: p. 71-72.
- [7] Wang, M., et al., Purification of a human prostate specific antigen. *The Journal of urology*, 2002. 167(2): p. 960-964.
- [8] Stamey, T., et al., Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. *The Journal of Urology*, 1988. 139(5): p. 1134-1134.
- [9] Feldman, B.J. and D. Feldman, The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2001. 1(1): p. 34-45.
- [10] Prensner, J.R., et al., Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Science translational medicine*, 2012. 4(127): p. 127rv3-127rv3.
- [11] Montgomery, B.T., et al., Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *The Prostate*, 1992. 21(1): p. 63-73.
- [12] Murtha, P., D.J. Tindall, and C.Y. Young, Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hKLK2: characterization of an androgen response element in the 5'promoter region of the gene. *Biochemistry*, 1993. 32(25): p. 6459-6464.
- [13] Altwajry, N., et al., Regression of prostate tumors after intravenous administration of lactoferrin-bearing polypropylenimine dendriplexes encoding TNF- $\alpha$ , TRAIL, and interleukin-12. *Drug Delivery*, 2018. 25(1): p. 679-689.
- [14] Lamy, P.-J., et al., Prognostic biomarkers used for localised prostate cancer management: a systematic review. *European Urology Focus*, 2018. 4(6): p. 790-803.
- [15] Meyer, A.R., et al., Initial experience performing in-office ultrasound-guided transperineal prostate biopsy under local anesthesia using the precisionpoint transperineal access system. *Urology*, 2018. 115: p. 8-13.
- [16] Chopra, S., et al., Comparing oxygen-sensitive MRI (BOLD R2\*) with oxygen electrode measurements: a pilot study in men with prostate cancer. *International journal of radiation biology*, 2009. 85(9): p. 805-813.
- [17] Turanli, B., et al., Drug repositioning for effective prostate cancer treatment. *Frontiers in physiology*, 2018. 9: p. 500.
- [18] Adhyam, M. and A.K. Gupta, A review on the clinical utility of PSA in cancer prostate. *Indian journal of surgical oncology*, 2012. 3: p. 120-129.
- [19] Shen, M.M. and C. Abate-Shen, Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development*, 2010. 24(18): p. 1967-2000.

- [20] Estébanez-Perpiná, E., et al., The molecular mechanisms of coactivator utilization in ligand-dependent transactivation by the androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(9): p. 8060-8068.
- [21] Dehm, S.M. and D.J. Tindall, Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-related cancer*, 2011. 18(5): p. R183-R196.
- [22] Denmeade, S.R., X.S. Lin, and J.T. Isaacs, Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *The prostate*, 1996. 28(4): p. 251-265.
- [23] Korpala, M., et al., An F876L mutation in androgen receptor confers genetic and phenotypic resistance to MDV3100 (enzalutamide). *Cancer discovery*, 2013. 3(9): p. 1030-1043.
- [24] Robinson, D., et al., Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 2015. 161(5): p. 1215-1228.
- [25] Fraser, M., et al., Genomic hallmarks of localized, non-indolent prostate cancer. *Nature*, 2017. 541(7637): p. 359-364.
- [26] Porkka, K.P. and T. Visakorpi, Molecular mechanisms of prostate cancer. *European urology*, 2004. 45(6): p. 683-691.
- [27] Park, J.W., et al., Reprogramming normal human epithelial tissues to a common, lethal neuroendocrine cancer lineage. *Science*, 2018. 362(6410): p. 91-95.
- [28] Ku, S.Y., et al., Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science*, 2017. 355(6320): p. 78-83.
- [29] Mu, P., et al., SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53- and RB1-deficient prostate cancer. *Science*, 2017. 355(6320): p. 84-88.
- [30] Schulz, W., M. Burchardt, and M. Cronauer, Molecular biology of prostate cancer. *Molecular human reproduction*, 2003. 9(8): p. 437-448.
- [31] Virchow, R., Die krankhaften Geschwülste: 30 Vorlesungen, geh. während d. Wintersemesters 1862-1863 an d. *Univ. zu Berlin*. Vol. 2. 1865: Hirschwald.
- [32] Sfanos, K.S. and A.M. De Marzo, Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*, 2012. 60(1): p. 199-215.
- [33] Hughes, C.E. and R.J. Nibbs, A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*, 2018. 285(16): p. 2944-2971.
- [34] Olivás, A. and R.S. Price, Obesity, inflammation, and advanced prostate cancer. *Nutrition and Cancer*, 2021. 73(11-12): p. 2232-2248.
- [35] Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's immunobiology*. 2016: Garland science.
- [36] Nagarsheth, N., M.S. Wicha, and W. Zou, Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 2017. 17(9): p. 559-572.
- [37] Plytycz, B. and R. Seljelid, From inflammation to sickness: historical perspective. *Archiwum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2003. 51(2): p. 105-110.
- [38] Wang, M., et al., Targeting inflammation as cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 2024. 17(1): p. 13.
- [39] Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science*, 2012. 125(23): p. 5591-5596.
- [40] Zamarron, B.F. and W. Chen, Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International journal of biological sciences*, 2011. 7(5): p. 651.
- [41] Amin, M.N., et al., Inflammatory cytokines in the pathogenesis of cardiovascular disease and cancer. *SAGE open Medicine*, 2020. 8: p. 2050312120965752.
- [42] Idriss, H.T. and J.H. Naismith, TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship (s). *Microscopy research and technique*, 2000. 50(3): p. 184-195.

- [43] Yoshimatsu, Y., et al., TNF- $\alpha$  enhances TGF- $\beta$ -induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF- $\beta$  signal augmentation. *Cancer science*, 2020. 111(7): p. 2385-2399.
- [44] Landskron, G., et al., Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research*, 2014. 2014.
- [45] Li, H., et al., Tumor necrosis factor  $\alpha$  reduces SNAP29 dependent autolysosome formation to increase prion protein level and promote tumor cell migration. *Virologica Sinica*, 2021. 36: p. 458-475.
- [46] Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2014. 6(10): p. a016295.
- [47] Heinrich, P.C., et al., Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical journal*, 2003. 374(1): p. 1-20.
- [48] Adler, H.L., et al., Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *The Journal of urology*, 1999. 161(1): p. 182-187.
- [49] Wise, G.J., et al., Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer. *The Journal of urology*, 2000. 164(3): p. 722-725.
- [50] Nguyen, D.P., J. Li, and A.K. Tewari, Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU international*, 2014. 113(6): p. 986-992.
- [51] Pampalakis, G. and G. Sotiropoulou, Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 2007. 1776(1): p. 22-31.
- [52] Lu, Y., et al., Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. 2008.
- [53] Oikonomopoulou, K., et al., Kallikrein-mediated activation of PARs in inflammation and nociception. *Inflammation Research*, 2007. 56: p. S499-S502.
- [54] Filippou, P.S., et al., Expression profile of human tissue kallikrein 15 provides preliminary insights into its roles in the prostate and testis. *Clinical Biochemistry*, 2018. 59: p. 78-85.
- [55] Kishibe, M., Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. *Journal of dermatological science*, 2019. 95(2): p. 50-55.
- [56] Harvey, T.J., et al., Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13. 4. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(48): p. 37397-37406.
- [57] Xi, Z., et al., Kallikrein 4 is a predominantly nuclear protein and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer research*, 2004. 64(7): p. 2365-2370.
- [58] Clements, J., et al., The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. 2001.
- [59] Lawrence, M.G., J. Lai, and J.A. Clements, Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocrine reviews*, 2010. 31(4): p. 407-446.
- [60] Fortelny, N., et al., Network analyses reveal pervasive functional regulation between proteases in the human protease web. *PLoS biology*, 2014. 12(5): p. e1001869.
- [61] Gratacós-Mulleras, A., et al., Characterisation of the main PSA glycoforms in aggressive prostate cancer. *Scientific reports*, 2020. 10(1): p. 18974.
- [62] Sotiropoulou, G. and G. Pampalakis, Targeting the kallikrein-related peptidases for drug development. *Trends in pharmacological sciences*, 2012. 33(12): p. 623-634.
- [63] Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 2011. 144(5): p. 646-674.
- [64] Srinivasan, S., et al., Remodelling of the tumour microenvironment by the kallikrein-related peptidases. *Nature Reviews Cancer*, 2022. 22(4): p. 223-238.

- [65] Loessner, D., et al., Combined expression of KLK4, KLK5, KLK6, and KLK7 by ovarian cancer cells leads to decreased adhesion and paclitaxel-induced chemoresistance. *Gynecologic oncology*, 2012. 127(3): p. 569-578.
- [66] Dong, Y., et al., Kallikrein-related peptidase 7 promotes multicellular aggregation via the  $\alpha 5\beta 1$  integrin pathway and paclitaxel chemoresistance in serous epithelial ovarian carcinoma. *Cancer research*, 2010. 70(7): p. 2624-2633.
- [67] Emami, N. and E.P. Diamandis, Utility of kallikrein-related peptidases (KLKs) as cancer biomarkers. *Clinical Chemistry*, 2008. 54(10): p. 1600-1607.
- [68] Mavridis, K., et al., Expression analysis and study of the KLK15 mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer science*, 2010. 101(3): p. 693-699.
- [69] Avgeris, M., K. Stravodimos, and A. Scorilas, Kallikrein-related peptidase 4 gene (KLK4) in prostate tumors: Quantitative expression analysis and evaluation of its clinical significance. *The Prostate*, 2011. 71(16): p. 1780-1789.
- [70] Scorilas, A. and A.K. Gregorakis, mRNA expression analysis of human kallikrein 11 (KLK11) may be useful in the discrimination of benign prostatic hyperplasia from prostate cancer after needle prostate biopsy. 2006, *Walter de Gruyter*.
- [71] Gelmini, S., et al., Real-time RT-PCR for the measurement of prostate-specific antigen mRNA expression in benign hyperplasia and adenocarcinoma of prostate. 2003.
- [72] Borgoño, C.A. and E.P. Diamandis, The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2004. 4(11): p. 876-890.
- [73] Avgeris, M., K. Mavridis, and A. Scorilas, Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biological chemistry*, 2010. 391(5): p. 505-511.
- [74] Paliouras, M., C. Borgono, and E.P. Diamandis, Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer letters*, 2007. 249(1): p. 61-79.
- [75] Xi, Z., et al., Kallikrein 4 is associated with paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 2004. 94(1): p. 80-85.
- [76] Kontos, C.K. and A. Scorilas, Kallikrein-related peptidases (KLKs): a gene family of novel cancer biomarkers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2012. 50(11): p. 1877-1891.
- [77] Talieri, M., et al., The use of kallikrein-related peptidases as adjuvant prognostic markers in colorectal cancer. *British journal of cancer*, 2009. 100(10): p. 1659-1665.
- [78] Talieri, M., et al., Expression analysis and clinical evaluation of kallikrein-related peptidase 10 (KLK10) in colorectal cancer. *Tumor Biology*, 2011. 32: p. 737-744.
- [79] Scorilas, A. and K. Mavridis, Kallikrein-related peptidases (KLKs) as novel potential biomarkers in gastric cancer: An open yet challenging road lies ahead. 2012, *Wiley Online Library*. p. 223-224.
- [80] Nagahara, H., et al., Clinicopathologic and biological significance of kallikrein 6 overexpression in human gastric cancer. *Clinical cancer research*, 2005. 11(19): p. 6800-6806.
- [81] Huang, W., et al., Downregulation and CpG island hypermethylation of NES1/hK10 gene in the pathogenesis of human gastric cancer. *Cancer letters*, 2007. 251(1): p. 78-85.
- [82] Avgeris, M., K. Mavridis, and A. Scorilas, Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biological chemistry*, 2012. 393(5): p. 301-317.
- [83] Konstantoudakis, G., et al., Kallikrein-related peptidase 13 (KLK13) gene expressional status contributes significantly in the prognosis of primary gastric carcinomas. *Clinical biochemistry*, 2010. 43(15): p. 1205-1211.

- [84] Yousef, G.M., et al., Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: an independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clinical chemistry*, 2002. 48(8): p. 1241-1250.
- [85] Avgeris, M., et al., Down-regulation of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) expression in breast cancer patients: a biomarker for the differential diagnosis of breast lesions. *Clinical proteomics*, 2011. 8: p. 1-12.
- [86] Papachristopoulou, G., et al., Quantitative expression analysis and study of the novel human kallikrein-related peptidase 14 gene (KLK14) in malignant and benign breast tissues. *Thrombosis and haemostasis*, 2011. 105(01): p. 131-137.
- [87] Fritzsche, F., et al., Expression of human Kallikrein 14 (KLK14) in breast cancer is associated with higher tumour grades and positive nodal status. *British journal of cancer*, 2006. 94(4): p. 540-547.
- [88] Sher, Y.-P., et al., Human kallikrein 8 protease confers a favorable clinical outcome in non-small cell lung cancer by suppressing tumor cell invasiveness. *Cancer research*, 2006. 66(24): p. 11763-11770.
- [89] Nathalie, H.V.h., et al., High kallikrein-related peptidase 6 in non-small cell lung cancer cells: an indicator of tumour proliferation and poor prognosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2009. 13(9b): p. 4014-4022.
- [90] Planque, C., et al., KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005. 329(4): p. 1260-1266.
- [91] Garber, M.E., et al., Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. 98(24): p. 13784-13789.
- [92] Planque, C., et al., A multiparametric serum kallikrein panel for diagnosis of non-small cell lung carcinoma. *Clinical cancer research*, 2008. 14(5): p. 1355-1362.
- [93] Planque, C., et al., Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of the kallikrein-related peptidases 13 and 14 in lung. 2008.
- [94] Lai, J., Y. Dong, and J. Clements, KLK4 (kallikrein-related peptidase 4). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 2009. 13(12): p. 944-949.
- [95] Gratio, V., et al., Kallikrein-related peptidase 4: a new activator of the aberrantly expressed protease-activated receptor 1 in colon cancer cells. *The American journal of pathology*, 2010. 176(3): p. 1452-1461.
- [96] Zhang, S.-q., et al., Kallikrein 4 overexpression in endometrial carcinoma and upregulation by estrogen via mitogen-activated protein kinase signal pathway. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 2009. 19(8).
- [97] Klock, T.I., et al., Kallikrein 4 is a proliferative factor that is overexpressed in prostate cancer. *Cancer research*, 2007. 67(11): p. 5221-5230.
- [98] Cui, Z., et al., Kallikrein-related peptidase 4 contributes to the tumor metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017. 81(9): p. 1768-1777.
- [99] Lose, F., et al., Genetic association of the KLK4 locus with risk of prostate cancer. 2012.
- [100] Korkmaz, K.S., et al., Distinctly different gene structure of KLK4/KLK-L1/prostate/ARM1 compared with other members of the kallikrein family: intracellular localization, alternative cDNA forms, and regulation by multiple hormones. *DNA and cell biology*, 2001. 20(7): p. 435-445.
- [101] Tse, B.W.-C., et al., KLK4 induces anti-tumor effects in human xenograft mouse models of orthotopic and metastatic prostate cancer. *Cancers*, 2020. 12(12): p. 3501.

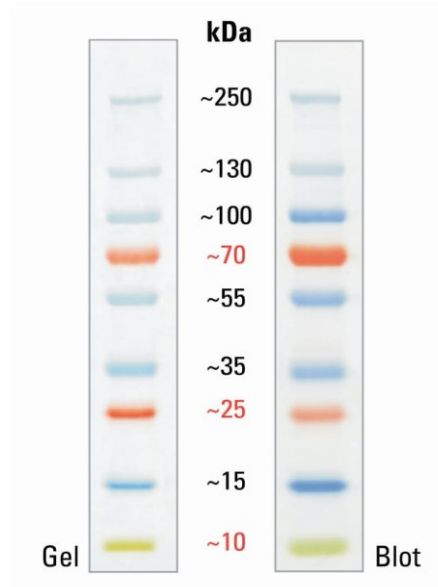
- [102] Wang, W., et al., Kallikrein-related peptidase-4 initiates tumor–stroma interactions in prostate cancer through protease-activated receptor-1. *International Journal of Cancer*, 2010. 126(3): p. 599-610.
- [103] Ramsay, A.J., et al., Prostatic trypsin-like kallikrein-related peptidases (KLKs) and other prostate-expressed tryptic proteinases as regulators of signalling via proteinase-activated receptors (PARs). 2008.
- [104] Yang, F., et al., Stromal TGF- $\beta$  signaling induces AR activation in prostate cancer. *Oncotarget*, 2014. 5(21): p. 10854.
- [105] in, Y., et al., Molecular circuit involving KLK4 integrates androgen and mTOR signaling in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. 110(28): p. E2572-E2581.
- [106] Fan, B., et al., KLK4 silencing inhibits the growth of chromophobe renal cell carcinoma through ERK/AKT signaling pathway. *Kidney and Blood Pressure Research*, 2022. 47(12): p. 702-710.
- [107] Cui, Z., et al., MicroRNA-378-3p/5p represses proliferation and induces apoptosis of oral squamous carcinoma cells via targeting KLK4. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2020. 47(4): p. 713-724.
- [108] Lundwall, Å., et al., KLK4T2 is a hormonally regulated transcript from the KLK4 locus. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. 22(23): p. 13023.
- [109] Köçkar, F., Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene. 1999, Ph. D, *Cardiff School of Biosciences*, Cardiff.
- [110] Strober, W., Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 1997. 21(1): p. A. 3B. 1-A. 3B. 2.
- [111] Hellman, L.M. and M.G. Fried, Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature protocols*, 2007. 2(8): p. 1849-1861.
- [112] Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2018. 68(6): p. 394-424.
- [113] Wasim, S., S.-Y. Lee, and J. Kim, Complexities of prostate cancer. *International journal of molecular sciences*, 2022. 23(22): p. 14257.
- [114] Gan, L., et al., Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene*, 2000. 257(1): p. 119-130.
- [115] tanbrough, M., et al., Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer research*, 2006. 66(5): p. 2815-2825.
- [116] Shaw, J.L. and E.P. Diamandis, Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clinical chemistry*, 2007. 53(8): p. 1423-1432.
- [117] Narita, D., et al., Prostate-specific antigen value as a marker in breast cancer. *Neoplasma*, 2006. 53(2): p. 161-167.
- [118] Lai, J., et al., Direct progesterone receptor and indirect androgen receptor interactions with the kallikrein-related peptidase 4 gene promoter in breast and prostate cancer. *Molecular cancer research*, 2009. 7(1): p. 129-141.



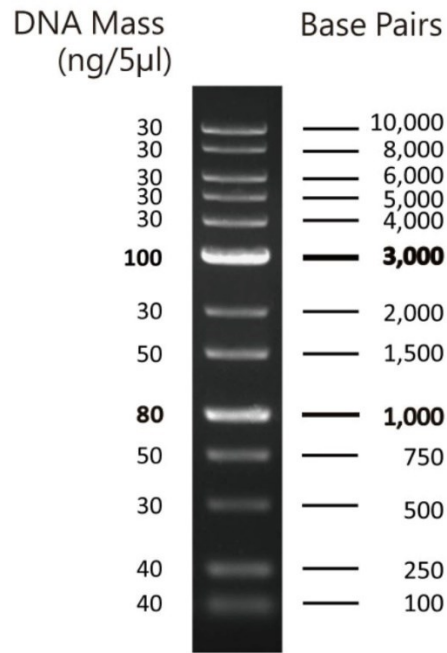
# **EKLER**

## EKLER

### EK A: Kullanılan Markerlar



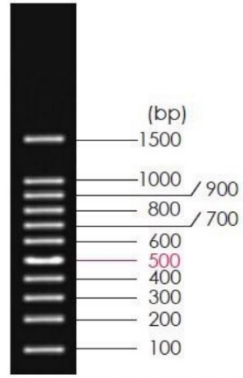
Şekil A.1: Protein marker



1 % TAE agarose gel

Şekil A.2: DNA marker 1 kb

100 bp DNA Ladder



2.0% TAE agarose gel stained with GelStain  
(loading volume: 5  $\mu$ l)

**Şekil A.3:** DNA marker 100 bp

## EK B : KLK4 Geni Transkript Varyant 1

Homo sapiens kallikrein related peptidase 4 (KLK4), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM\_004917.5

LOCUS NM\_004917 1416 bp mRNA linear PRI 08-APR-2024

DEFINITION Homo sapiens kallikrein related peptidase 4 (KLK4), transcript variant 1, mRNA.

ACCESSION NM\_004917 XM\_001134318

VERSION NM\_004917.5

KEYWORDS RefSeq; MANE Select.

SOURCE Homo sapiens (human)

```
1  aggcagcagg ctggagctca gcccagcagt ggaatccagg agcccagagg tggccgggtg
61  ctgacgtgat ggccacagca ggaaatccct ggggctggtt cctgggttac ctcaccttg
121 gtgtcgagg atcgtctgtc tctgtagct gcagccaat cataaacggc gaggactgca
181 gcccgcactc gcagccctgg caggcggcac tggcatgga aaacgaattg ttctgctcgg
241 gcgtcctggt gcatccgcag tgggtgctgt cagccgcaca ctgttccag aactctaca
301 ccatcgggct gggcctgcac agtcttgagg ccgaccaaga gccagggagc cagatggtgg
361 aggccagcct ctccgtacgg caccagagt acaacagacc ctgctcgtc aacgacctca
421 tgctcatcaa gttggacgaa tccgtgtccg agtctgacac catccggagc atcagcattg
481 cttcgcagtg ccctaccgcg gggaactctt gcctcgttfc tggctggggt ctgctggcga
541 acggcagaat gcctaccgtg ctgcagtgcg tgaacgtgtc ggtggtgtct gaggaggtct
601 gcagtaagct ctatgaccg ctgtaccacc ccagcatggt ctgcgccggc ggagggcaag
661 accagaagga ctctgcaac ggtgactctg gggggcccct gatctgcaac gggacttgc
721 agggccttgt gtcttctgga aaagccccgt gtggccaagt tggcgtgcca ggtgtctaca
781 ccaacctctg caaattcaat gaggtagatg agaaaaccgt ccaggccagt taactctggg
841 gactgggaac ccatgaaatt gacccccaaa tacatctgctc ggaaggaatt caggaatata
901 tgttccagc ccctctccc tcaggcccag gaggccagc cccagcccc tctcctca
961 aaccaagggt acagatcccc agcccctct cctcagacc caggagtcca gacccccag
1021 cccctctcc ctgagacca ggagtccagc cctcctccc tcagaccag gaggccagc
1081 ccccagccc ctctcctc agaccagga gtccagccc tctcctca gaccaggag
1141 tccagacccc ccagcccctc ctccctcaga cccaggggtc caggccccc acccctctc
1201 cctcagactc agaggtccag gcccacaacc cctcctccc cagaccaga ggtccaggtc
1261 ccagcccctc ctccctcaga cccagcggtc caatgccacc tagactctcc ctgtacacag
1321 tgccccctg tggeacgttg acccaacct accagttggt tttcatttt ttgtccctt
1381 ccctagatc cagaaataaa gtctaagaga agcgca
```

>NP\_004908.4 kallikrein-4 isoform 1 preproprotein [Homo sapiens]

```
MATAGNPWGWFLGYLILGVAGSLVSGSCSQIINGEDCSPHSQPWQAALVMENELFCSGVL
VHPQWVLSAAHCFQNSYITIGLGLHSLEADQEPGSQMVEASLSVRHPEYNRPLLANDLMLI
KLDESVSSESDTIRSISIASQCPTAGNSCLVSGWLLANGRMPTVLQCVNVSVVSEEVCSKL
YDPLYHPSMFACGGGQDQKDCSNGDSGGPLICNGYLQGLVSFGKAPCGQVGVPGVYTNL
CKFTEWIEKTVQAS
```

## **EK C : KLK4 Geninin 4 Farklı Promotör Parçasının Forward ve Reverse Dizileri**

### **1104bp forward**

ATTAAGCGCAGACATGAGAGAGACAGGAGAGAATGAGAGGAAATGAAAGAAAACAC  
GAGAAAAATAATGAGAGAGAGAATGAGAGAAAGAAAGAAGGAGAGAAAGAGAAAA  
TGAGAGATACAGGCAAGAGAGAGGTATCTCATGAGAGAGAATAAGAACATGAAAAG  
AGAAAGAATGAGAGAGAGAGAGAGAAAAGAAAAAGGAGAGTGGAGTCTAGGATCTGG  
GCAGGGGTCTCCTCCCTGGGTCCCTAGACCCTGCTGCCAGCCCCTTCTGGGCCCCCAAC  
CACTGCCTGGTCAGAGTTGAGGCAGCCTGAGAGAGTTGAGCTGGAAGTTTGCAGCACC  
TGACCCCTGGAACACATCCCCTGGGGGCAGGCCAGCCAGGCTGAGGATGCTTATAAG  
CC CCAAGGAGGCCCTGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCCAGCAGTG  
GAATCCAGGAGCCCAGAGGTGGCCGGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCACTAAAAGC  
CTGCAGTGTTTATGATCCAACCTCTCCCTACAGCTCCATGTGCTGGATTCTCAGCCTCT  
GTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAGACAGATCTCTCACTGTCTCTAGTTAGGAGTCA  
CTGTCTCTAGTTAGGGTCTCTCTGTCTCTCTGAATCTATATCTCCATGTCTAACTCTCA  
GACTGTCTCTGAGGATATCTCTCAAGCACTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTG  
TCTTCC TCCATGCTTGTGTTGCGGTGGCTAGACACCATCTCTCCCATTACAGATGG  
CTAGATGCTTTTCTCTAAACTTTCCTTTCTACTTAGGTCTCTCTCTC

### **1104bp reverse**

GGTGGCGAAAAAATATCGTGTCTGGGGACTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCCTCTCTT  
GTCCCTCCCTTTCTTCCCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGCCTAGACCATCTAC  
CCCCTCTCCCATCCATGGACCCAGAACCTAGGAGACAGATTTAGAGACTGAGAGAGA  
AAAAGAGAGAGAGAGAGGTGGGAAAAGAGAGAGAGAGAGAACTAAGTAGAAAGGA  
AAGTTTAGAGAAAGCATCTAGCCATCTGTGAATGGGGAGAGATGGTGTCTAGCCACCC  
GCAAACAAGCATGGAGGGAAGACACACAGAGAATCAGAGCCGGAGAGACAGAGTGC  
TTGAG AGATATCCTCAGAGACAGTCTGAGAGTTAGACATGGAGATATAGATTTCAG  
AGAGACAGAGAGACCCCTAACTAGAGACAGTGACTCCTAACTAGAGACAGTGAGAGA  
TCTGTCTAGAGAGATGTGGAGACAGAAGGCACAGAGGCTGAGAATCCAGCGACATGG  
AGCTGTAGGGAGAGTTGGATCATGAACACTGCAGGCTTTTAGTGGGGGACCACCAGG  
CCTCTTACCCGGCCACCTCTGGGCTCCTGGATTCCACTGCTGGGCTGAGCTCCAGCCTG  
CTGCCTCCCGCAGGGGCCTCCTTGGGGCTTATAAGCATCCTCAGCCTGCGCTGGCCTGC  
CCCCAGGGGATGTGTTCCAGGGGTCACGTGCTGCAAACCTCCAGCTCAACTCTCTCAT  
GCT GCCTCAACTCTGACCAGGCAGTGGTTGGGGGCCAGAATGGGCTGGCAGC  
AGGTCTAGGGACCCAGGGAGGAAGACCCCTGCCAGATC

### **760bp forward**

CATCGTTTGTAGTTACATTTACATAGACATCCCTGGGGGCAGGCCAGCCCAGGCTGAGGA  
TGCTTATAAGCCCAAGGAGGCCCTGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCCAG  
CAGTGGAATCCAGGAGCCCAGAGGTGGCCGGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCACTA  
AAAGCCTGCAGTGTTTATGATCCAACCTCCCCTACAGCTCCATGTCGCTGGATTCTCAG  
CCTCTGTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAGACAGATCTCTCACTGTCTCTAGTTAGGA  
GTCAGTGTCTCTAGTTAGGGTCTCTCTGTCTCTCTGAATCTATATCTCCATGTCTAAC  
TCTCAGACTGTCTCTGAGGATATCTCTCAAGCACTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCT  
GTGTGTCTTCCCTCCATGCTTGTGTTGGGGTGGCTAGACACCATCTCTCCCCATTACA  
GATGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCCTTTCTACCTAGTTCTCTCTCTCTCTCTTTT  
CCCATCTCTCTCTCTTTTTCTCTCTCAGTCTCTAAATCTGTCTCTCTAGGTTCTGGGTC  
CATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAGGCTCTTGCCTACCTAATAACGTCCCAGA

GGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGAGACTTGGGCTGAAGATCCCCA  
GACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCATCCCCAGGTGCTGACGTGAAGCTTCGAATTCTGC  
AGTCGACGGTACCGCGGGCCCCGGGATCCACCGGGTCGCCACCATGGACATCAAGGTG  
GGGGTTC

**760bp reverse**

GGGACTACTAGCGTGTCTGGGGACTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCTCTTTGTCCC  
TCCCTTTCTTCCCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGCCTAGACCATCTACCCCT  
CTCCCATCCATGGACCCAGAACCTAGAGAGACAGATTTAGAGACTGAGAGAGAAAAA  
GAGAGAGAGAGATGGGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGGTAGAAAGGAAAGTT  
TAGAGAAAGCATCTAGCCATCTGTGAATGGGGAGAGATGGTGTCTAGCCACCCACAA  
ACAAGCATGGAGGGAAGACACACAGAGAATCAGAGCCGGAGAGACAGAGTGCTTGA  
GAGATA TCCTCAGAGACAGTCTGAGAGTTAGACATGGAGATATAGATTCAGAGAGA  
CAGAGAGACCCCTAACTAGAGACAGTGA CTCTAACTAGAGACAGTGAGAGATCTGT  
CTAGAGAGATGTGGAGACAGAAGGCACAGAGGCTGAGAATCCAGCGACATGGAGCTG  
TAGGGGGAGTTGGATCATGAACACTGCAGGCTTTTAGTGGGGGACCACCAGGCCTCTT  
ACCCGGCCACCTCTGGGCTCCTGGATTCCACTGCTGGGCTGAGCTCCAGCCTGCTGCCT  
CCCGCACGGGCCTCCTTGGGGCTTATAAGCATCCTCAGCCTGGCTGGCCTGCCCCAG  
GGGATGTGTTCCAGGGGTCAGTGCTGCAA ACTTCCAGCTCAACCTCGAGATCTGAGTC  
CGG TAGCGCTAGTAATAACTAATGCATGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAT CA

**391bp forward**

CTACATCTGTCTCTCGGCTCTGATTCTCTGTGTGTCTTCCCTCCATGCTTGTGTTGTGGGT  
GGCTAGACACCATCTCTCCCATTCACAGATGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCTT  
TCTACCTAGTTCTCTCTCTCTCTTTTTCCCATCTCCCTCTCTTTTTCTCTCTCAGTCTCT  
AAATCTGTCTCTCTAGGTTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAGGC  
TCTTGCTACCTAATAACGTCCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATG  
GAGAG ACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCATCCCCA  
GGTGTGACGTGAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCCGGGATCCAC  
CGGTGCCACCATGGACATCAAGGTGGTGTTCACCCTGGTGTTCAGCGCCCTGGTGCA  
GGCCAAGAGCACCGAGTTCGACCCCAACATCGACATCGTGGGCTGGAAGGCAAGTT  
CGGCATCACCAACCTGGAACCGACCTGTTACCATCTGGGAGACCATGGAAGTGATG  
ATCAAGGCCGACATCGCCGACACCGACCGGGCCAGCAACTTCGTGGCCACCGAGACC  
GACGCCAACCGGGGCAAGATGCCCGGCAAGAAGCTGCCCTGGCCGTATCATGGAA  
ATGGA AGCCAACGCCTTCAAGCCGGCTGCACCCGGGGCTGCCTGATCTGCCTGAG  
CAGATCAAGTGCACCGCCAGATGAAGTGTACATCCCCGGGCAG

**391 bp reverse**

GTACATACTAGCGTGTCTGGGGACTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCTCTTTGTCCC  
TCCCTTTCTTCCCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGCCTAGACCATCTACCCCT  
CTCCCATCCATGGACCCAGAACCTAGAGAGACAGATTTAGAGACTGAGAGAGAAAAA  
GAGAGAGGGAGATGGGAAAAGAGAGAGAGAGAACTAGGTAGAAAGGAAAGTTTAGA  
GAAAGCATCTAGCCATCTGTGAATGGGGAGAGATGGTGTCTAGCCACCCACAAACAA  
GCATGGAGGGAAGACACACAGAGAATCAGAGCCGGAGAGACAGAGTGCTTGAGAGA  
TATCCT CAGAGACAGTCCTCGAGATCTGAGTCCGGTAGCGCTAGTAATAACTAATG  
CATGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTA  
GAGAAATGTTCTGGCACCTGCACTTGCCTGGGGACAGCCTATTTTGCTAGTTGTTTT  
GTTTCGTTTTGTTTTGATGGAGAGCGTATGTTAGTACTATCGATTCACACAAAAACCA  
ACACACAGATGTAATGAAAATAAAGATATTTTATTACATGTGAGCAAAAGGCCAGCA  
AAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC

CCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA  
CTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACC  
CTGCCGCTTACCGGATACCTGT

**102bp forward**

GGGAGGAGAGACTTGGGCTGAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCA  
TCCCCAGGTGCTGACGTGAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGC  
CCGGGATCCACCGGTGCCACCATGGACATCAAGGTGGTGTTCACCCTGGTGT  
TCAGCGCCCTGGTGCAGGCCAAGAGCACCGAGTTCGACCCCAACATCGACAT  
CGTGGGCCTGGAAGGCAAGTTCGGCATCACCAACCTGGAAACCGACCTGTTCA  
CCATCTGGGAGACCATGGAAGTGATGATCAAGGCCGACATCGCCGACACCGA  
CCGGGCCAGCAACTTCGTGGCCACCGAGACCGACGCCAACCGGGGCAAGATG  
CCCGGCAAGAAGCTGCCCCCTGGCCGTCATCATGGAAATGGAAGCCAACGCCTT  
CAAGGCCGGCTGCACCCGGGGCTGCCTGATCTGCCTGAGCAAGATCAAGTGCA  
CCGCCAAGATGAAGGTGTACATCCCCGGCAGGTGCCACGACTACGGCGGGCA  
CAAGAAAACCGGCCAGGCCGGCATCGTGGGCGCCATCGTGGACATCCCCGAG  
ATCAGCGGCTTCAAAGAAATGGCCCCATGGAACAGTTCATCGCCAGGTGG  
ACAGATGCGCCAGCTGCACCACCGGCTGCCTGAAGGGCCTGGCCAACGTGAA  
GTGCAGCGAGCTGCTGAAGAAGTGGCTGCCCGACCGCTGCGCCAGCTTCGCCG  
ACAAGATCCAGAAAGAGGTGCACAACATCAAGGGCATGGCCGGCGACAGGTG  
AGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTTA  
CTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGA  
ATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAA  
GCAATAGCATCACAAATTTCAAATAAAGCATTTTTTTTTCACTGCATTCTAAG  
TTGTGGGTTTGTCCAAACTCATCAATGGTACCTTAAGGGCGTAAAATTGTAAAC  
CGTTAATATTTTTGTTAAAAATTCCCGGTTAAATTTTTTTGTTAAAAATCCGCCCC  
TTTTTTTAACCAAAGGGGCCAAAAAATCGGGAAAAACCCCTTTAAAATCAAA  
AAAAAAAAC

**102bp reverse**

ACGTCCGTTTCGGGCTTACTCGCTCGGGCTTTTTCCTTTTCCCACCCCCCCCC  
CCAAGTTGGGGGAAGGCCAGGGCTTGCAAGCCAAAGTTGGGGCGGCAGGC  
CCTGCCATAGCCTCAGGTTATTCATAATTATTTAGATTGATTTAAACTTCATT  
TTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA  
TCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCTACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCA  
AAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAA  
AAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACT  
CTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTT  
CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA ACTCTGTAGCACCGCCTAC  
ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC  
GTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT  
CGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA  
CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCC  
AAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAG  
AGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTC  
GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG  
GCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCT  
TTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTAATAAAATATCTTTATTTTATTACATCTGT

GTGTTGGTTTTTTGTGTGAATCGATAGTACTAACATACGCTCTCCATCAAAACA  
AAACGAAACAAAACAAACTAGCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGG  
TGCCAGAACATTTCTCTACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGAT  
AACCGTATTACCGCCATGCATTAGTTATTACTAGCGCTACCGGACTCAGATCTC  
GAGCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGAGACTTGGGC  
TGAAGATCCCCAGACACGCTATTT



## ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı** : Serhad ONAT
2. **Doğum Tarihi** :
3. **Adres** : Plevne Mah. Güven Sok. No:11-13/6 Altteylül-BALIKESİR
4. **Telefon** :
5. **Mail** :
4. **Öğrenim Durumu** : Yüksek Lisan

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Balıkesir Üniversitesi	2010
Y. Lisans	Biyoloji	Balıkesir Üniversitesi	2016
Doktora	Moleküler Onkoloji	Balıkesir Üniversitesi	Dev. Ediyor

### 5. Yüksek Lisans ve Doktora Tezi

#### 5.1. Yüksek Lisans Tezi

‘‘Zeytin  $\beta$ -glukozidaz Enziminin Saflaştırılması ve Nano Parçacıklara İmmobilizasyonu’’ Fen Bilimleri Enstitüsü-Biyoloji Bölümü, (1100778 nolu proje ile Tübitak Desteği)

#### 5.2. Doktora Tezi

‘Prostat Kanseri Hücre Modelinde IL-6 ve TNF- $\alpha$ ’nın KLK4 Geninin Regülasyonu Üzerine Etkisi’’ Fen Bilimleri Enstitüsü-Moleküler Onkoloji (Tübitak 1001 Proje Desteği)

### 6. Yayınlar

#### 6.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI, SSCI, Arts and Humanities)

- 1- E Savas, MY Kaya, O Karaagac, S Onat, H Kockar, H Yavas, F Kockar. (2018), Novel debittering process of green table olives: application of  $\beta$ -glucosidase bound onto superparamagnetic nanoparticles, *CyTA-Journal of Food* 16 (1), 840-847
- 2- S Onat, E Savas. (2019) Immobilization and characterization of  $\beta$ -glucosidase from gemlik olive (*olea europea l.*) responsible for hydrolyzation of oleuropein ,*Italian Journal Of Food Science*, 31(4), 749-763

#### 6.2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1- Savas E.; Turkoglu S. A.; Onat S. Kockar F. (2011) Purification and characterization of the olive fruit beta-glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics *FEBS JOURNAL* Volume: 278 Special Issue: SI Supplement: 1 Pages: 318-319
- 2- Savas, E.; Onat, S.; Kaya, Y. M. Kockar, H, Kockar, F (2013) Immobilization of Olive beta-glucosidase on to superparamagnetic nanoparticules and its characterization *FEBS JOURNAL* Volume: 280 Special Issue: SI Supplement: 1 Pages: 522-522.

## 6.2. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1- Onat, S., Aydoğan Türkoğlu, S., & Köçkar, F. (2024). Effects of IL-6 and TNF- $\alpha$  Cytokines on Cell Proliferation in Androgen Dependent/Independent Prostate Cancer Cell Lines. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 10(1), 1-8. <https://doi.org/10.28979/jarnas.1282119>

## 6.3. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1- Serhad Onat, Mihrap Yaşar Kaya, Feray Köçkar, Elif SAVAŞ. (2012), Edremit Çeşidi Yeşil Zeytin  $\beta$  -glukozidaz'ının Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi. [ile Sıfırlanması II.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi ,Antalya, 15-18 Kasım 2012](#)
- 2- Serhad ONAT, Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU, Feray KÖÇKAR, (2023), Androjen Bağımsız Prostat Kanseri Hücrelerinde IL-6 (İnterlökin 6) Sitokininin KLK4 Gen Ekspresyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi, 25. Ulusal Biyoloji Kongresi, İZMİR

## 9. Projeler

- 1- ‘‘Zeytin  $\beta$ -Glukosidazın Nanoparçacıklara İmmobilizasyonu ve Sofralık Zeytin Üretiminde Uygulamaları’’, 3501 - Kariyer, Burslu Araştırmacı, ARDEB, TOVAG - Tarım, Ormanlık Ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.05.2011 - 15.05.2013
- 2- ‘‘Prostat Kanseri KLK-4’ün Transkripsiyonel Regülasyonu’’, 1001 - Araştırma, Burslu Araştırmacı, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.01.2019 - 19.08.2019.
- 3- ‘‘Hepatosellüler Kanserde MIR100HG’nin Moleküler Karakterizasyonu’’, 1001 - Araştırma, BİDEB Burslusu, Yürürlükte, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.04.2022 - 15.04.2025, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.04.2022 - 15.04.2025.

## 10. Burslar

- 1- YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar Burs Programı  
Burs başlangıç ve bitiş tarihleri: 01.03.2018 - 01.03.2022
- 2- 2211-A Tübitak Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, 2019–2023.  
Burs başlangıç ve bitiş tarihleri: 01.06.2019 - 31.05.2023.
- 3- 2250 Tübitak Lisansüstü Performans Bursları 2022 (Şubat-Ağustos)

## 11. Katıldığı Bilimsel Kongreler ve Kurslar

25. Ulusal Biyoloji Kongresi ,İZMİR,2023
8. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, İZMİR, 2020
- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2019
- Mol. Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, BAUGEN, Balıkesir Üniversitesi, 2018
- Kök Hücre ve Gen Tedavisi Sempozyumu’’ Uludağ Üniversitesi, BURSA, 2013

Febs Kongresi, İTALYA, 2011

Ultra Yüksek Performanslı Likit Kromatografi Kolonları ve İleri Uygulama Teknikleri  
Eğitim Programı-Balıkesir Üniversitesi, BALIKESİR, 2011

Genetik Kış Okulu- İstanbul Üniversitesi, İSTANBUL, 2010

Moleküler Biyoloji ve Genetik Kongresi- Ege Üniversitesi, İZMİR, 2009