

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

PROSTAT KANSERİ KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ İLE KÖK HÜCRE
İÇERMEYEN PROSTAT KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
MTOR VE MLST8 MOLEKÜLLERİNİN İMMUNOFLORESANS YÖNTEMİ
İLE KARŞILAŞTIRILMASI VE MTOR YOLAĞININ PROSTAT
KANSERİNDEKİ YERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Zafer BİNAL

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Barış ALTAY

İZMİR
(2018)

Önsöz

Uzmanlık eğitimimin ikinci kısmında çalışma fırsatı bulduğum ve her türlü mesleki desteği veren Ege Üniversitesi anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Bülent Semerci'ye; tez konusu seçiminden basım aşamasına kadar bütün aşamalarda katkı ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Barış Altay'a; eğitim sürem boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan mutluluk duyan, hem hekim hem de birey olarak örnek aldığım değerli ve saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. İbrahim Cüreklibatır, Sayın Prof. Dr.Oktay Nazlı, Sayın Prof. Dr. Ceyhun Özyurt, Sayın Prof. Dr. Erdal Apaydın, Sayın Prof. Dr. Çağ Çal, Sayın Prof. Dr. Burak Turna ve Sayın Doç. Dr. Adnan Şimşir'e saygılarımı sunarım. Asistanlık süremi çoğunda mesleki bilgi ve tecrübeleri ile sürekli yanımda bulunan, yol gösteren; tüm mesleki sorunlarım ile bizzat yakından ilgilenen Prof.Dr.Rauf Taner Divrik, Prof.Dr Yusuf Özlem İlbey, Dr. Ali Feyzullah Şahin'e saygılarımı sunarım. Gerek cerrahi eğitimimizle, gerekse meslek dışı tüm problemlerimizle yakından ilgilenen Op.Dr.Fuat Kızılay'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezin hazırlık aşamasında tüm desteklerini veren Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalından Prof.Dr.Gülperi Öktem'e ve Eda Açıkgöz'e şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim sürecinde beraber çalışma şansına eriştiğim Op. Dr. Faruk Doğan'a, Op.Dr.Alper Dırık'a, Op.Dr.Kasım Emre Ergün'e, Op.Dr.Tuncer Bahçeci'ye, Op.Dr.Fuad İsmayilov'a, Op.Dr.Emir Akıncıoğlu'na bana olan tüm katkıları için teşekkür ederim. Asistanlığım süresince çalıştığım hem Ege Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı hemşire ve klinik çalışanlarına hem de çalışma fırsatı bulduğum diğer hemşire ve sağlık çalışanlarına, çok kıymetli asistan arkadaşlarım Dr.Mehmet Şahin, Dr.Elmir Aliyev, Dr.Turan Özdemir, Dr.Macid Hakverdiyev, Dr.Bayram Aliyev, Dr.Mustafa Dinçkal ve Dr.Emre Yurtseven, Dr.Yusuf Doğan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak her zaman karşılıksız sevgi ve destekleri ile yanımda olan, beni bugünlere getiren annem, babam ve ağabeylerim başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Zafer BİNAL

İçindekiler

Tablolar, Şekiller, Resimler Listesi	iv
Kısaltmalar.....	v
1. ÖZET.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Prostat Kanseri.....	3
2.2 Kanser Kök Hücreleri.....	6
2.3 Prostat Kanseri Kök Hücreleri	8
2.4 mTOR	11
2.4.1 mTOR tanımı ve tarihçesi	11
2.4.2 mTORC1 ve mTORC2	11
2.4.3 mTOR sinyal yolağı ve kanser ilişkisi.....	15
2.4.4 mTOR inhibitörü ilaçlar	16
2.5 MLST8.....	18
2.5.1 MLST8 tanımı ve fonksiyonu	18
2.5.2 MLST8 ile kanser ilişkisi	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1 Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	20
3.2 Hücre Kültürü.....	21
3.2.1 Hücre kültür hattı için mediumun hazırlanması	21
3.2.2 Yöntem	21
3.2.3 Hücre Hatlarının Üretilmesi.....	21
3.2.4 Hücrelerin Pasajlanması	21
3.2.5. Hücre Hattının Dondurulması.....	22
3.3 Akım (Flow) Sitometrisi Yöntemi	23
3.4 Flow Sitometri Cihazında CD133 ⁺ /CD44 ^{+/low} Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması.....	24
3.5 RNA izolasyonu ve microarray analizi.....	25
3.6 İmmunfloresan Yöntemi.....	28
4. SONUÇLAR.....	29
5. TARTIŞMA	31
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	33
7.KAYNAKLAR	34

Tablolar, Şekiller, Resimler Listesi

Tablo 1	Prostat Adenokarsinom TNM Evrelemesi	4
Tablo 2	Lokal ve lokal ileri prostat kanserinde risk sınıflaması.....	5
Tablo 3	Bazı kanserlerin hücre yüzeyi belirteçleri.....	8
Tablo 4	mTORC1 ve TORC2 fonksiyonları.....	15
Tablo 5	Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, üretici firma bilgileri ve kullanım amaçları.....	20
Tablo 6	Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları.....	20
Tablo 7	Hücre kültürü hazırlanmasında kullanılan malzemeler.....	21
Tablo 8	Hücre Dondurma Mediumu İçeriği	22
Tablo 9	Çeşitli genlerin Rna mikroarray veri analizi sonuçları.....	26
Şekil 1	Kanser kök hücre hipotezi	7
Şekil 2	Prostat hücre tipleri.....	9
Şekil 3	mTORC1 ve mTORC2 komponentleri.....	12
Şekil 4	S6K ve eIF4E uyarılması	13
Şekil 5	mTORC1 ve mTORC2 fonksiyonları.....	14
Şekil 6	mTOR ilaç inhibitörlerinin mekanizması	18
Şekil 7	Akım sitometrisinin çalışma prensibi	24
Şekil 8	DU145 Prostat kanseri hücre hattından izole edilen CD133+/CD44+/low kanser kök hücreleri.....	25
Resim 1	DU-145 KKH ve DU-145 non-KKH de mTOR proteininde meydana gelen değişimler.	29
Resim 2	DU-145 KKH ve DU-145 non-KKH de MLST8 proteininde meydana gelen değişimler.	30

Kısaltmalar

4EBP1	ökaryotik başlatma faktör 4E bağlayıcı protein 1
ABCB5	ATP-binding cassette sub-family B member 5
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
ALDH1A1	Aldehid dehidrogenaz 1A1
AMPK	AMP-activated protein kinase
AR	androjen reseptör
ATCC	American Type Culture Collection®
CD	cluster of differentiation
CK	sitokeratin
CSC	cancer stem cell
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPTOR	DEP domain containing mTOR- interacting protein
DMSO	Dimethyl sulfoxid
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ERG	erythroblast transformation-specific related gene
ESA	epitelyal spesifik antijen
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	Foetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FKBP-12	FK506 bağlayıcı protein 12
GβL	G protein beta subunit-like
HIF-1a	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
IRS-1	insülin reseptörü substrat 1
KKH	kanser kök hücresi
LKB1	liver kinase B1
MAPK	mitojenle aktive olan protein kinaz
MEK-ERK	mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz -Extracellular signal-regulated kinases
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein
mSin1	stress-activated protein kinase interacting protein 1/MAPKAP1
mTOR	mechanistic target of rapamycin/ mammalian target of rapamycin
MTORC	mechanistic target of rapamycin/ mammalian target of rapamycin complex
OCT	octamer-binding transcription factor
PAP	Prostatic acid phosphatase

PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PK1	phosphoinositide dependent kinase 1 fosfatidilinositol bağımlı kinaz 1
PI3K	fosfatidilinositol 3-kinaz
PI3K	fosfatidilinositol 3-kinaz
PIN	prostatik intraepitelyal neoplazi
PIP2	fosfatidilinositol 4,5 bifosfat
PIP3	fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfat
PKC	protein kinaz C
PRAS40	proline-rich Akt substrate 40 kDa
PRM	parmakla rektal muayene
Protor	protein observed with rictor
PSA	prostat spesifik antijen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
Rheb	ras homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of Mtor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	reseptör tirozin kinaz
S6K	S6 kinaz
SCA-1	Stem cell antijen
SGK-1	serum glukokortikoid düzenlenmiş kinaz-1
SMO	Smoothened
TMPRSS2	Androjen ile regüle olan transmembran serin proteaz gen
TRUS	transrektal ultrasonografi
TSC1	tuberöz skleroz 1

1. ÖZET

Giriş ve Amaç: Prostat kanseri erkeklerde kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Kanser kök hücrelerinin özelliklerinin araştırılması ve kanserin gelişiminde yer alan yolların tespiti, hedefe yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemlidir. mTOR yolağı prostat kanserinde aktif olarak yer almaktadır. mTOR ve mLST8 molekülleri hem mTOR1 hem de mTOR2 kompleksinde yer alır. Bu çalışmanın amacı kök hücre içeren prostat kanseri hücre kültürü (Du-145 KKH) ile kök hücre içermeyen (Du-145 non-KKH) prostat kanseri hücre hattı kültüründe mTOR ve mLST8 moleküllerinin yoğunluğunu immüno Floresans yöntemi ile karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Prostat kanseri hücre hattı (Du-145) hücre kültürü flasklarında %5 CO₂'li ortamda, 37 °C'de inkübatörde kültüre edildi. Floresanla-aktifleşmiş hücre ayırma (FACS) yöntemi ile akım sitometri analizi kullanılarak Du-145 prostat kanseri hücre hattında CD133⁺/CD44^{+/low} yüzey belirteçlerini bulunduran kanser kök hücreleri (sorting) ve bunların dışında kalan hücreler (non-sorting) içlerinde 2'şer ml RPMI 1640 medium bulunan 5 ml'lik polistiren falkon tüplere ayrıldı. Du-145 KKH ve Du-145 non-KKH leri, immüno Floresans boyama yöntemi kullanılarak hem hücre canlılık (DAPI yöntemi) hem de mTOR ve MLST8 proteinlerindeki floresan miktarının yoğunluğu görsel olarak analiz edildi. İstatistiksel yöntem olarak t-testi kullanıldı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Du-145 KKH ve Du-145 non-KKH lerinde mTOR ve MLST8 proteinlerde meydana gelen değişimler, immüno Floresans boyama yöntemi ile incelendi. DU-145 non-KKH ile kıyaslandığında, DU-145 KKH de mTOR ve MLST8 proteinlerinin floresan miktarında artış görülmüştür. Bir görüntü analizi programı olan İmageJ programı ile mTOR ve mLST8'e ait immüno Floresans görüntülerdeki yoğunluk (intensity) değerleri hesaplandı. Du-145 KKH ve Du-145 non-KKH lerindeki mTOR ve mLST8 proteinine ait immüno Floresans görüntülerindeki yoğunluk değerleri karşılaştırıldı. Prostat kanseri kök hücresinde mTOR ve MLST8 proteinlerine ait yoğunluk değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Sonuç: Prostat kanseri kök hücresindeki mTOR ve MLST8 proteinlerindeki bu anlamlı artış tedavi ve prognoz tayininde önemli bir yer teşkil edebilir. mTOR yolağı ile ilgili çalışmalar yapılarak hedefe yönelik tedaviler geliştirebilir.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri hücre hattı (Du-145); Kanser Kök Hücre; mTOR; MLST8

1. ABSTRACT

Background and Aim: Prostate cancer is the second most common cancer-related death in men. Investigation of the characteristics of cancer stem cells and the identification of the pathways involved in the development of cancer are important in the development of targeted treatment modalities. The mTOR pathway is actively involved in prostate cancer. The mTOR and mLST8 molecules are found in both the mTOR1 and mTOR2 complexes. The aim of this study is to compare the intensity of mTOR and mLST8 molecules in stem cell-free (Du-145 non-CSC) prostate cancer cell line culture with stem cell-containing prostate cancer cell culture (Du-145 CSC) by immunofluorescence.

Materials And Methods: Prostate cancer cell line (Du-145) was cultured in an incubator at 37°C in 5% CO₂ environment in cell culture flasks. Using flow cytometry analysis with fluorescence activated cell sorting (FACS), the cancer stem cells containing CD133+/ CD44^{+/low} surface markers (sorting) in the Du-145 prostate cancer cell line and the remaining cells (non-sorting) were separated into 5 ml polystyrene tubes which includes 2 ml RPMI 1640 medium. Du-145 CSC and Du-145 non-CSCs were visually analyzed for both cell viability (DAPI method) and the intensity of fluorescence in mTOR and MLST8 proteins using the immunofluorescence staining method. The t-test was used as a statistical method and p<0.05 was considered statistically significant.

Results: Changes in mTOR and MLST8 proteins in Du-145 CSC and Du-145 non-CSCs were examined by immunofluorescence staining. When compared to DU-145 non-CSC, there was an increase in fluorescence of mTOR and MLST8 proteins in DU-145 CSC. Intensity values in the immunofluorescence images of mTOR and mLST8 were calculated using the ImageJ program, an image analysis program. The density values of immunofluorescence images of mTOR protein in Du-145 CSC and Du-145 non-CSCs were compared. The density values of mTOR and MLST8 proteins in the prostate cancer stem cell were statistically significant.

Conclusions: This significant increase in the mTOR and MLST8 proteins in the prostate cancer root cell may be an important part of the treatment and prognosis determination. It is possible to develop targeted therapies by conducting studies on mTOR pathway.

Keywords: Prostate Cancer cell line (Du-145);Cancer Stem Cell; mTOR;MLST8

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Prostat Kanseri

Prostat kanseri Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık görülen birinci, dünyada ve Türkiye'de ise ikinci sırada görülmektedir. Türkiye'de tüm yaş gruplarında ikinci, 70 yaş üzerinde ise ilk sırada yer alır.(1) Avrupa'da ise prostat kanseri kolorektal ve akciğer kanserlerini geçerek en sık görülen solid tümör olmuştur.(2) Bununla birlikte prostat kanseri şu anda erkeklerde kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır.(3) Prostat kanseri risk faktörleri arasında ileri yaş, ailesel yatkınlık, genetik, ırk, diyet, hormonal ve çevresel faktörler yer almaktadır.

Prostat kanseri tanısı süphesinde PSA(prostat spesifik antijen) ve PRM(parmakla rektal muayene) kullanılır. TRUS(transrektal ultrasonografi) eşliğinde prostat biyopsi ile kesin tanı konulur. PRM de sert nodül ve psa yüksekliği biyopsi endikasyonudur.

PSA, 19.kromozomunun kısa kolunda kodlanan human kallikrein grubundan serin proteazdır ve semenin likefaksiyonundan sorumludur. Klinik kullanımı 1980 li yılların ikinci yarısında başlamıştır. Klinik kullanımının artmasıyla lokalize prostat kanseri insidansı artarken metastatik hastalık insidansı azalmıştır. Sonuç olarak psa tanı, evreleme ve tedavi izleminde önemli bir tümör belirteci haline gelmiştir.(4)

PSA ve PRM'nin tek başlarına pozitif prediktif değerleri sırasıyla %42,1 ve %31,4 tür. İkisi beraber kullanılırsa bu oran %60 a kadar çıkmaktadır.(5)

Prostat kanseri ilk evrelerde asemptomatiktir. Prostat kanserlerinin %70 i periferik zondan kaynaklanmaktadır ve ilk dönemlerde işeme bozukluğu çok gözükmez.%15 lik kısım ise transizyonel zondan kaynaklanır ve obstruktif semptomlar verebilir. Hematüri, disüri, pollaküri, urgency, noktüri diğer görülebilecek semptomlardır. Kanserin trigon ve üreter alt uç tutulumuna bağlı böbrek yetmezliği semptomları gözükabilir. Kemik metastazlarına bağlı ağrı ve anemi bulguları gözükabilir. Uzak metastazlara ait spesifik semptomlar da ayrıca ortaya çıkabilmektedir.(6)

Prostat kanseri evrelemesinde TNM (tümör, lenf nodu, metastaz) sınıflaması kullanılmaktadır. TNM sistemi yalnızca adenokanserler için geçerlidir.

Tablo 1. Prostat Adenokarsinom TNM Evrelemesi

<i>T: Tümörün prostat ve çevre dokulara yaygınlığı</i>
<i>N: Lenf nodu tutulumu</i>
<i>M: uzak organlara yayılım</i>
* Tx Prostattaki tümörün değerlendirilememesi
* T0 Prostatta tümör bulunmaması
* T1 Parmakla muayene ve görüntüleme yöntemleriyle prostatta tümör saptanamayan hastalar
T1a Rezeke edilmiş dokuda <%5 oranda raslantısal tümör saptanması
T1b Rezeke edilmiş dokuda >%5 oranda raslantısal tümör saptanması
T1c PSA yüksekliği nedeniyle yapılan iğne biyopsisinde tümör saptanması
* T2 Prostat bezinde sınırlı tümör, parmakla yapılan muayenede prostatta nodül bulunması
T2a Tek bir prostat lobunun yarısı veya daha azını tutan tümör
T2b Tek bir prostat lobunun yarısından fazlasını tutan tümör
T2c Her iki prostat lobunu tutan tümör
* T3 Prostat kapsülünü aşan tümör
T3a Kapsül dışına tek veya iki taraflı uzanım (Mikroskopik mesane boynu tutulumu dahil)
T3b Vezikula seminalis tutulumu
* T4 Vezikula seminalisler dışında diğer komşu organlara yayılım gösteren tümör
* Nx Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi
* N0 Bölgesel lenf bezi tutulumu yok
* N1 Bölgesel lenf bezi tutulumu var
* Mx Uzak organ yayılımının değerlendirilememesi
* M0 Uzak organ yayılımı olmaması
* M1 Uzak organ yayılımı olması
M1a Bölgesel olmayan lenf bezi tutulumu
M1b Kemik metastazı
M1c Diğer organ metastazları

Bu evreleme sayesinde prognoz belirlenir ve uygun tedavinin seçimi sağlanır. Lokalize prostat kanserinde tedavi öncesinde risk sınıflaması önemlidir. İlk kez 1998 yılında D'Amico ve arkadaşları tarafından tanımlanan risk sınıflaması Avrupa Üroloji Birliği tarafından tekrar düzenlenmiştir. Bu sınıflamada psa, T evresi ve Gleason skoru yer almaktadır.

Tablo 2. Lokal ve lokal ileri prostat kanserinde risk sınıflaması

DÜŞÜK RİSK	ORTA RİSK	YÜKSEK RİSK	
PSA<10 ng/ml Gleason skoru <7 T1-2a	PSA 10-20 ng/ml Gleason skoru= 7 T2b	PSA>20 ng/ml Gleason skoru >7 T2c	Herhangi PSA ve ya Gleason skoru T3-4 yada N+
LOKALİZE			LOKAL İLERİ

Lokalize prostat kanserinde tedavi seçenekleri arasında bekle-gör tedavisi, aktif izlem, radyoterapi(RT), hormonoterapi ve cerrahi bulunmaktadır.

Bekle-gör tedavisi küratif tedavi için uygun olmayan ve kısa yaşam beklentisi olan hastalara önerilebilir. Aktif izlem ise aşırı tedavi ve buna bağlı morbiditenin engellenmesinde bir tedavi seçeneğidir. Aktif izlemin şartları PSA<10 ng/ml, Gleason skoru <7, T1-2a, PSA dansitesi <0,15 ng/ml/cc, <3 pozitif kor tutulumu ve her bir korda <50 altında kanser tutulumu olmasıdır.

Radyoterapi tedavi seçenekleri arasında konvansiyonel eksternal radyoterapi, üç boyutlu konformal RT, Intensity Modulated RT, Image-guided radyoterapi yer almaktadır. Hormonoterapi ise radyoterapi ile kombine edilerek yada cerrahi sonrası adjuvan tedavi olarak kullanılır.

Lokalize prostat kanserinde cerrahi rezeksiyon altın standarttır. Radikal retropubik/perineal prostatektomi, laparoskopik radikal prostatektomi, robot yardımlı radikal prostatektomi cerrahi yöntemler arasında yer almaktadır.

Sonuç olarak hastalara multidisipliner yaklaşım ile bütün tedavi seçenekleri anlatılmalı ve hasta bazlı karar verilmelidir.(7)

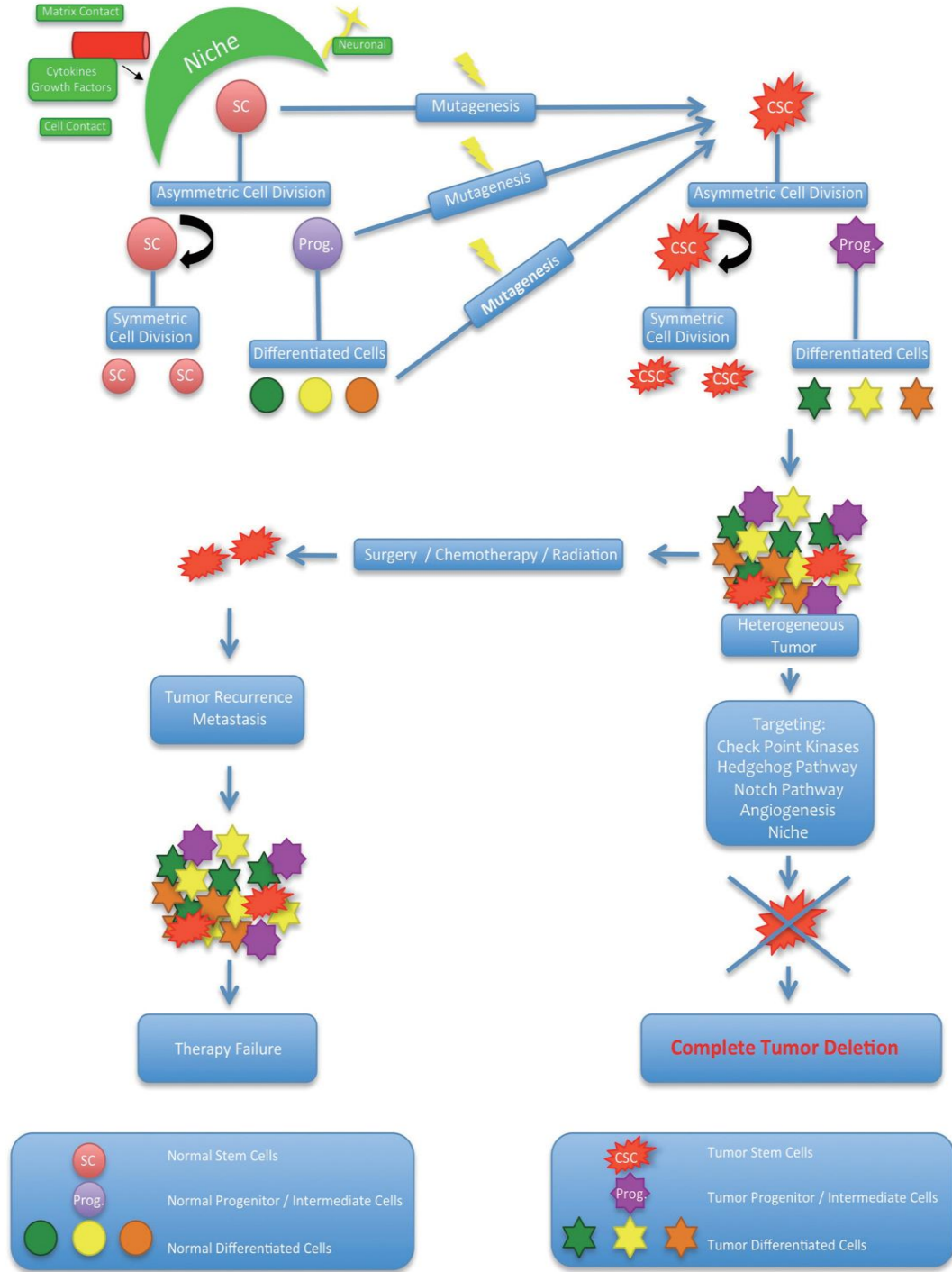
2.2 Kanser Kök Hücresi

Amerikan kanser araştırmaları derneği tarafından yapılan tanıma göre kanser kök hücreleri tümör dokusu içinde yer alan, kendini yenileyebilme özelliğine sahip ve tümörü oluşturan kanser hücrelerine farklılaşabilen hücrelerdir.(8) Kanser kök hücre ile alakalı ilk bulgular 1990 yıllarda lösemi ile ilgili çalışmalardan elde edilmiştir.(9) Kanser dokusu; heterojen bir yapıya sahiptir ve kanser kök hücresi,progenitör hücreler ve diferansiye(farklılaşmış)hücrelerden oluşur.(10) Kanser dokusunun heterojenitesi kansere karşı direnç mekanizmasında önemli yer teşkil etmektedir.

Kanser kök küresinin oluşmasında stokastik ve hiyerarşik model olmak üzere iki hipotez bulunmaktadır. Stokastik model, tümör oluşturan hücrelerin herhangi birisinin tümör başlatma yeteneğinin olmasına dayanır. Şimdilerde bu model sadece tarihsel bir önem arz etmektedir. Hiyerarşik modelde ise tümör dokusunun hiyerarşik olarak organize edildiğini ve yalnızca bir alt hücre popülasyonunun tümör başlatma, büyüme ve hayatta kalma yeteneğine sahip olduğunu savunur.(11)

Kanser kök hücresi ile normal kök hücre arasındaki fark bölünme kontrolünü kaybetmesidir.(8) Kök hücre bölünmesi simetrik veya asimetrik olabilir. Asimetrik bölünmede kök hücre, aynı özelliklere sahip bir kök hücre ile ve daha sonra farklılaşacak olan progenitör hücreye ayrılır. Böylece kök hücre popülasyonu sabit kalır. Simetrik bölünmede aynı özelliklere sahip iki kök hücre oluşur.(11) Aynı hiyerarşik bölünme daha öncede belirtildiği gibi kanser hücresinde de görülmektedir. Normal kök hücresi ile kanser kök hücresi arasında diğer bir fark ise normal kök hücreler dokularda çok küçük bir miktarda mevcut iken aksine kanser kök hücresi,tümör hücrelerinin hacminde oldukça geniş bir popülasyon olabilir.(12)

Şekil 1. Kanser kök hücre hipotezi



Kanser kök hücreleri küresel koloni oluşturur.(13) Bu kök hücreleri saptamak için hücre yüzeyi belirteçleri kullanılır.

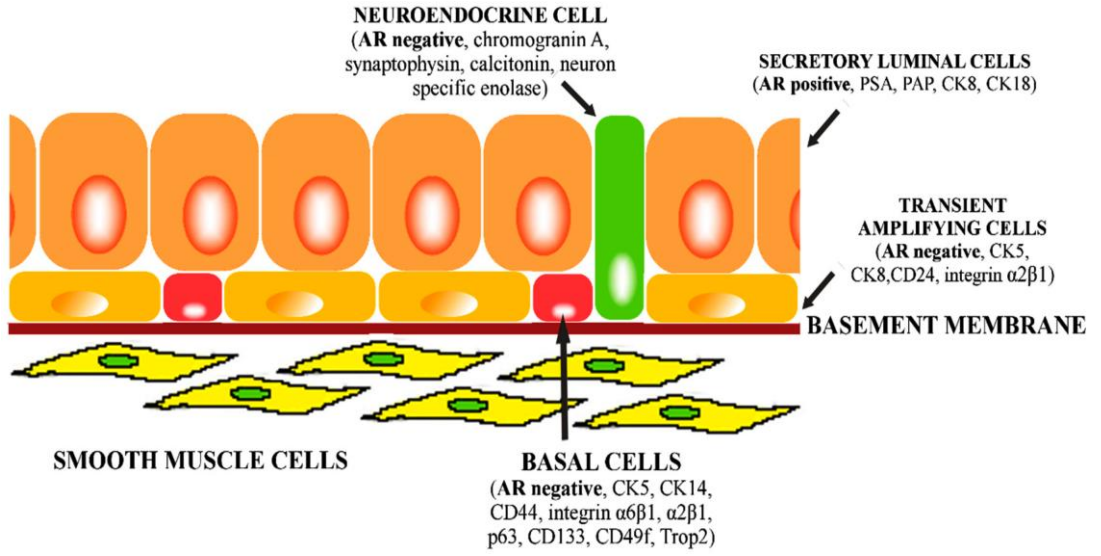
Tablo 3. Bazı kanserlerin hücre yüzeyi belirteçleri

Kanser tipi	Kanser kök hücre belirteci
Beyin tümörü	CD133+
Meme kanseri	CD44+/CD24-
Kolon kanseri	CD133+
Hepatik karsinoma	CD90+/CD45-/CD44+
Akciğer kanseri	CD133+
Melanoma	ABCB5+
Over kanseri	CD44+/CD117+
Pankreas kanseri	CD44+/CD24+/ESA+
Prostat kanseri	CD44+/ α 2 β 1(hi)/CD133+

2.3 Prostat Kanseri Kök Hücresi

Prostat epitelyum dokusu sekresyon görevi yapan luminal hücreler, bazal hücreler ve nöroendokrin hücreler olarak üçe ayrılır. Buna ek olarak, hem bazal hem de luminal hücre belirteçlerini ifade eden küçük bir ara hücre grubu vardır.(11)

Şekil 2. Prostat hücre tipleri



Lüminal hücreler, prostat epitelindeki ana hücre tipidir. Aynı zamanda prostatik epiteldeki en diferansiye olmuş hücrelerdir. Androjen bağımlıdır ve bu nedenle yüksek miktarda androjen reseptörü (AR) vardır. Ayrıca prostatik spesifik antijen (PSA), prostatik asit fosfataz (PAP), sitokeratin 8 ve 18 gibi proteinleri eksprese ederler.(14)

Nöroendokrin hücreler prostat epiteliumunda nadir olarak bulunur. nöron spesifik enolaz kromogranin A, sinaptofizin, kalsitonin eksprese ederler. Buna karşın androjen reseptörü ve prostat spesifik antijeni eksprese edemezler.(15)

Prostat epiteliumunun bazal katmanında yer alan bazal hücreler sitokeratin 5 ve 14, CD44, integrin $\alpha 6\beta 1$ ve p63 eksprese ederler.(11)

Prostat kanserinin bazal ve luminal hücrelerden kaynaklandığı sanılmaktadır.(11) Önceleri, tümör kütlelerinin büyük çoğunluğunu içeren luminal hücrelerin tümör gelişiminin kaynağı olduğu kabul edildi. Bunu destekleyen bazı çalışmalar mevcuttur. Luminal epitel projenitör hücrelerin, Pten-knockout prostat kanseri modelinde tümör başlatan hücreler olduğu tespit edilmiştir.(16) Buna rağmen prostat bezindeki bazal hücreler p63, CD44, CD49f, CD133 gibi kök hücre yenilenmesini düzenleyen yüzey moleküllerini eksprese eder. Prostat kanser kök hücresinin bu bazal hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mevcut anti-androjen terapisi ve kastrasyona dirençli prostat kanserine karşı kemoterapi, sınırlı sağkalım yararları göstermektedir, çünkü bu tipteki tedavi, öncelikli olarak neoplastik, hızlı büyüyen kanser hücrelerini hedeflemektedir ancak kanser kök hücrelerini hedeflememektedir.(17)

Prostat kanseri kök hücreleri hücre hatlarında, ksenograft hayvan modellerinde, hücre kültürlerinde izole edilmiştir. (11) İn vitro ve in vivo olarak prostat kanserini tespit etmek için kullanılan belirteçlerden bazıları CD44,CD133,CK5/14,CK8/18,ABCG2,OCT3/4,SCA-1,SMO, integrin $\alpha 2\beta 1$ dir.(18)

Hücre adezyonu ve hücre göç ile ilgili bir glikoprotein olan CD44, birçok kanser kök hücrelerini tespit etmek için kullanılmaktadır. CD44+ olan prostat kanseri kök hücreleri daha fazla metastaz yapmaya eğilimli olduğu tespit edilmiştir.(19) CD44+CD24- prostat kanseri kök hücrelerin tümör oluşturma yeteneklerinin 100 kat fazla olduğu bulunmuştur.(20) CD44+ hücre sayısı gleason skoru yüksek olanlarda daha fazla tespit edilmiştir.(21)

Bir başka belirteç olan CD133 ile yapılan çalışmada CD133 + hücrelerin proliferatif potansiyele sahip oldukları ve bağışıklığı baskılanmış erkek farelerde prostatik asini hücrelerini yeniden oluşturabildikleri gösterilmiştir.(22)

Bir başka kanser kök hücre çalışmasında CD44 + $\alpha 2\beta 1$ integrin yüksek CD133 + prostat kanser kök hücreleri androjen reseptörü içermemektedir. Fakat kendi kendine yenilenme ve androjen reseptörü pozitif hücelere farklılaşma için yüksek bir kapasite gösterdiler.(23)

Bir diğer belirteç olan Aldehid dehidrogenaz (ALDH1A1), retinoik asit metabolizmasında görev alır. Yüksek ALDH aktivitesi, kök hücre durumu ile koreledir.(24) Ayrıca gleason skoru ve patolojik evre ile pozitif korelasyon olduğu ve hasta sağkalımı ile ters orantılı olduğu bulundu.(25)

CD166'nın ekspresyonu, kastrasyona dirençli prostat kanserinde artar.(26)

Son olarak prostat kanser kök hücrelerini takip etmek için TMPRSS2-ERG gen füzyonu kullanılabilir. Androjen ile regüle olan transmembran serin proteaz gen(TMPRSS2) ile eritroblastozis virus(ERG)onkogeni füzyonu prostat kanseri gelişimi, ilerlemesi ve evresi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir.(27)

Sonuç olarak kanser kök hücrelerini tespit etmek için bir takım belirteçler yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı belirteçlerin kanser kök hücrelerinde ekspresyonunun farklı olması kanser kök hücrelerinin dinamik bir fenotip olduğunu gösterir.

2.4 mTOR

2.4.1 mTOR tanımı ve tarihçesi

mTOR katabolik ve anabolik metabolizmalar arasında kritik öneme sahip fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ile ilgili kinaz familyasına ait bir serin treonin kinazdır.(28) mTOR, memelilerde rapamisinin hedefi olarak bilinmektedir.(29) Rapamisin (sirolimus) ilk kez 1975 yılında Rapa Nui adasında izole edilmiştir. Rapamisin immünsüpresif özelliği olan antifungal bir ilaçtır.(30)1980'li yıllarda Amerika Ulusal Kansere Enstitüsü tarafından antikanser özellikte olduğu ortaya konmuştur. 1990 yıllarda ise mTOR tanımlanmıştır.

2.4.2 mTORC1 ve mTORC2

2.4.2.1 mTORC1 ve mTORC2 komponentleri

mTORC1; mTOR ve diğer dört proteinden raptor, mLST8, PRAS40 ve DEPTOR den oluşur.

Raptor, regulatory-associated protein of mTOR olarak tanımlanır ve düzenleyici protein olarak görev yapar. Raptor,mTORC1'in lokalizasyonunu ve substrat bağlanmasını düzenlemek için iskele proteinleri olarak hizmet eder.(31)

PRAS40, prolin açısından zengin Akt substrat 40 kDa olarak tanımlanır. PRAS40, mTORC1 in negatif düzenleyicisi olarak görev yapar.(28)

mLST8, mammalian lethal with SEC13 protein 8 olarak tanımlanır ve diğer bir ismi G protein beta subunit-like(GβL)dir. mLST8, hem mTORC1 hem de mTORC2'nin ortak bir alt birimidir ve mTOR kinazın aktivasyonu için gereklidir. mLST8'in mTOR'un aktif bölgesini direk olarak stabilize ettiğini ve mTOR kinaz aktivitesinde mLST8'in kritik bir rol oynadığı ortaya çıkarmıştır. Ancak kesin işlevi hala bilinmemektedir.(29)

mTORC2; mTOR ve diğer protein olan rictor, mLST8, DEPTOR, mSin1 ve protordan oluşur.

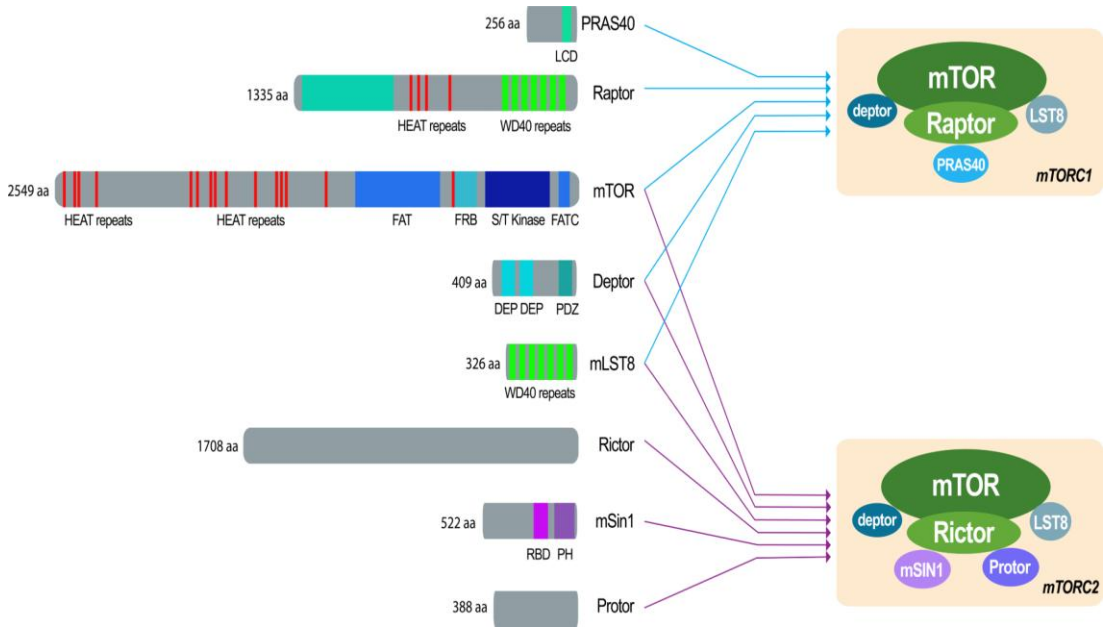
Rictor, rapamycin-insensitive companion of mTOR olarak tanımlanır. mTORC1 de yer alan raptor proteinin görevini mTORC2 de rictor üstlenir. mTORC2'in lokalizasyonunu ve substrat bağlanmasını düzenlemek için iskele proteinleri olarak hizmet eder.(31) Örneğin Pten delesyonu sağlanmış farelerde rictor,prostat tümörlerinin büyümesi için gereklidir.(32)

mSin1 mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 olarak tanımlanır ve diğer bir ismi MAPKAP1 dir.

Protor 1/2 protein observed with Rictor 1 and 2 tanımlanır ve mTORC2 aracılığıyla, SGK-1(serum / glukokortikoid düzenlenmiş kinaz-1)in aktivasyonunu artırır.(31) mSin1 ve protor, mTORC2 kompleksinin oluşmasında ve lokalizasyonunda görev yapan yardımcı proteinlerdir.

DEPTOR, DEP domain-containing mTOR-interacting protein olarak tanımlanmaktadır. Deptor endojen bir mtor inhibitörü olarak görev yapar ve çoğu kanserde düşük seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir.(31) Deptor hem mTORC1 hem de mTORC2 kompleksinde yer alan proteindir.mLST8 pozitif düzenleyici olarak görev alırken Deptor ise negatif bir düzenleyici olarak görev yapar.(28)

Şekil 3. mTORC1 ve mTORC2 komponentleri



2.4.2.2 mTORC1 ve mTORC2 fonksiyonları

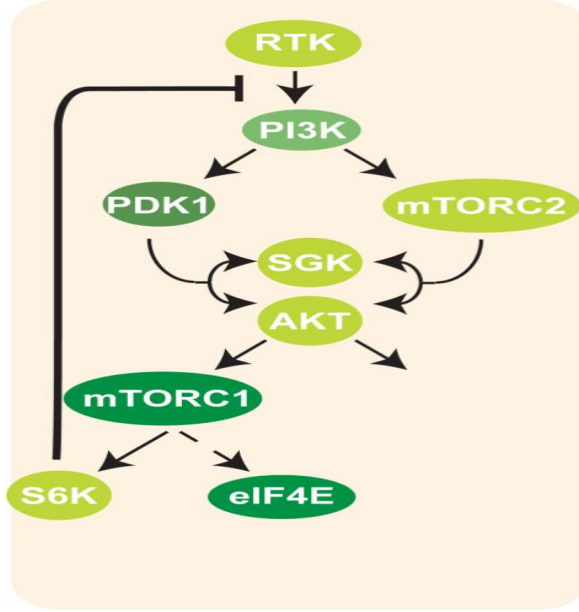
Kanser hücresinin oluşmasında PI3K/AKT/ mTOR yolağı önemli bir yer tutmaktadır.

Büyüme faktörleri ve bir takım reseptör tirozin kinaz(RTK)ların aktivasyonu ile RTK ların sitoplazmik tirozin kalıntıları otofosforilize olur. Bu otofosforilasyon ile fosfatidilinositol 3-kinaz(PI3K) aktive olur.Böylece fosfatidilinositol 4,5 bifosfat(PIP2)

fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfat (PIP3)'e çevrilir. PIP3 ise, fosfatidilinositol bağımlı kinaz(PDK1) aktive olur. PDK1 de AKT ve SGK aktivasyonuna neden olur.

Akt ayrıca, PRAS40 alt birimini fosforile ederek mTORC1'i doğrudan aktive eder. Sonuç olarak mTOR'un aşağı doğru sinyal yolağında temel hedefi olan ribozomal protein S6 kinaz (S6K) ve ökaryotik başlatma faktör 4E bağlayıcı protein 1 (4EBP1) uyarılmış olur.(33)

Şekil 4. S6K ve eIF4E uyarılması



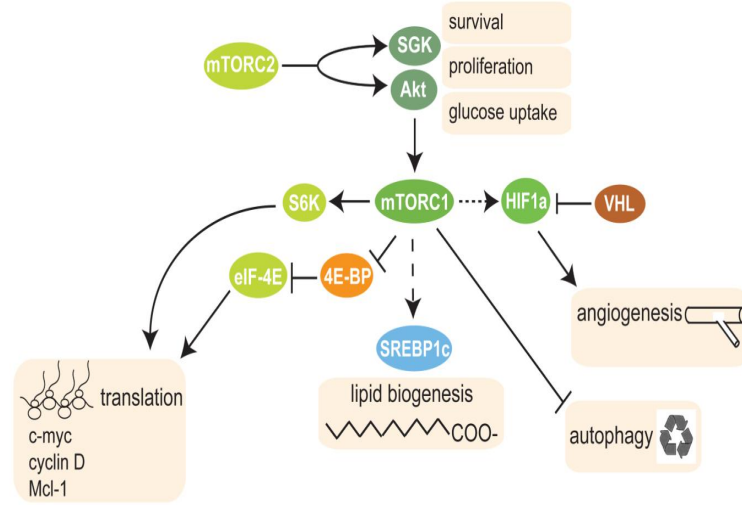
Protein biyosentezinin mTORC1 tarafından düzenlenmesi, ribozomal protein S6 kinaz 1 (S6K1) ve ökaryotik başlatma faktör 4E bağlayıcı protein 1 (4E-BP1)in fosforilasyonu yoluyla gerçekleşir.(34)

4EBP1 normalde eIF4E ile kompleks halindedir. AKT/mTOR yolağının aktivasyonu ile 4EBP1'nin fosforillenir ve bu kompleks ayrılır. Böylece eIF4E aktive olarak protein translasyonu başlamış olur.

Ayrıca 4EBP1'nin fosforilasyonu HIF-1a(Hypoxia-inducible factor 1-alpha) sentezinde artmaya neden olur.

S6K1'nin fosforilasyonu da protein sentezinin başlangıç ve elongasyon(uzama) kısmına yardımcı olur. S6K1, insülin reseptörü substrat 1(IRS-1) inhibisyonu yoluyla PI3K/AKT/mTOR' u negatif geribildirim ile inhibe etmektedir.

Şekil 5. mTORC1 ve mTORC2 fonksiyonları



Glikoliz ve mitokondriyal fonksiyonun kimyasal inhibitörleri mTORC1 aktivitesini baskılamakta, bu da mTORC1'in hücrel enerjiyi algıladığını göstermektedir. AMPK TSC1 / 2'yi fosforile eder, muhtemelen GAP aktivitesini Rheb'e karşı uyarır. AMPK ayrıca raptoru fosforiller ve mTORC1 inhibe eder.(32)

Son çalışmalarda karbamoil fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz, dihidroorataz un oluşturduğu pirimidin sentezinde görev alan enzim kompleksinin; S kinaz tarafından fosforile olduğu bildirilmiştir.(35)

mTORC2, hücre sağkalımını, hücre döngüsü ilerleyişini ve anabolizmi düzenleyen Akt, serum ve glukokortikoidle indüklenebilir kinaz (SGK) ve protein kinaz C(PKC)'yi fosforile eder ve aktive eder.(12) mTORC2, besin maddelerine daha az duyarlıdır, ancak hücre dışı büyüme faktörlerine büyük ölçüde yanıt verir. Bunun nedeni tam olarak açıklanamamıştır.(31)

mTORC2'nin kronik inhibisyonu altında, alternatif yolların, Akt fosforilasyonunu sağlayabileceğini düşündürmektedir.(28) mTORC2 kompleksinin kanser hücrelerinde proliferasyon, sağkalım ve besleyici madde alımının düzenlenmesinde rol oynadığını ileri sürmüştür.(28)

Ayrıca mTORC2'nin ribozomlarla fonksiyonel regülasyonu ve ilişkisi rapor edilmiştir.(36) mTORC2'nin düzenlenmesinde endoplazmik retikulumun rolü vardır. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, endoplazmik retikulumda mTORC2'nin önemli rolünü desteklemektedir.(37)

Tablo 4. mTORC1 ve TORC2 fonksiyonları

mTORC1 fonksiyonları	mTORC2 fonksiyonları
mRNA translasyonu ve ribozom biyogenezi artışı	Aktin organizasyonu
Metabolizma artışı	Büyüme faktörü uyarımı
Anjiogenezis/hipoksi adaptasyonu	
Otofaji ve apoptozis inhibisyonu	

2.4.3 mTOR sinyal yolağı ve kanser ilişkisi

Memeli hücrelerinde, şimdiye kadar tanımlanan tek bir mTOR geni vardır. Evrimsel olarak korunmuş bir kinaz olarak, mTOR, büyük ölçüde sırasıyla mTORC1 (mTOR kompleksi 1) ve mTORC2 (mTOR kompleksi 2) olarak adlandırılan iki ayrı protein kinaz kompleksinin katalitik alt birimi olarak işlev görür.(31) Bu iki kompleks hücrel metabolizmalarda önemli rol oynamaktadır.

mTOR, Aktin sito-iskelet, protein yıkımı, protein kinaz c sinyalizasyonu ve ribozom biyogenezinin organizasyonu, mRNA transkripsiyon ve protein translasyonun başlatılması gibi önemli metabolizma olaylarında görev yapar. Ayrıca mTOR apoptozisten sorumlu molekülleri inhibe eder. mTOR, kanser hücrelerinin hızlı çoğalmasını destekleyen lipid sentezinde yer alan bir enzim olan yağ asidi sentezi yukarı regüle eder.

Kanser sinyalizasyonu yollarında PI3K / AKT kinaz zinciri, protein kinaz C ailesi (PKC) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/Ras sinyalizasyon zincirleri yer almaktadır.

Aktif p53 mTOR negatif düzenleyicisidir ve kanserde p53 fonksiyonu ortadan kalkar ve sonuç olarak mTOR aktivitesi artar. Benzer şekilde; PTEN kaybı veya inaktivasyonu ve tuberoz skleroz 1 ve 2 kompleksi, LKB1 gibi mTOR negatif düzenleyicilerin mutasyonları da mTOR aktivasyonu ile sonuçlanır.(28)

Kanserlerin başlangıcında, gelişmesinde, metastastatik olma durumunda mTOR önemli bir rol oynar. Dolayısıyla aşırı mTOR aktivasyonu, bir çok tümörün patogeneğinde rol oynar. Kanser tedavisinin düzenlenmesinde önemli bir hedef olarak görülmektedir.(32)

Kanser hücrelerinde pek çok farklı mekanizma PI3K/AKT/ mTOR yolunun yapısal aktivasyonu ile sonuçlanabilir. mTOR aktivasyonu ile sonuçlanan hücre içi süreçleri PTEN fonksiyonu kaybı, PI3K p110 katalitik ünitesinin mutasyonu veya amplifikasyonu, PI3K p85 düzenleyici ünitesinin mutasyonu, AKT1 ve 2 AKT enzimlerinin her hangi birisinin amplifiasyonu ve tuberöz skleroz 1 (TSC1) veya TSC2 gibi AKT ile ilişkili mTOR düzenleyici proteinlerin inaktivasyonu ya da mutasyonlarını içerir. İlginç olarak, mTOR'un kendisinin herhangi bir mutasyonu bildirilmemiştir.(38)

2.4.4 mTOR inhibitörü ilaçlar

Aşırı mTOR aktivasyonu, bir çok tümörün patogeneğinde rol oynar. Kanser tedavisinin düzenlenmesinde önemli bir hedef olarak görülmektedir.(32)

Temsirolimus, everolimus, ridaforolimus ve deforolimus gibi mTOR inhibitörlerinin kanserli hastalarda güvenilirlikleri ve etkinlikleri kanıtlanmıştır. mTOR inhibitörü ilaçların meme, lenfoma, akciğer, mide ve sarkom kanserlerini içine alan çeşitli solid tümörlerde etkinliği gösterilmiştir.(32)

Rapamisin(silolimus) ve analogları gibi mTOR inhibitörleri sadece mTORC1'i etkileyip, mTORC2'yi etkilememektedir. Bu ilaçlar, mTOR'un seçici inhibitörü olup mTORC1'i inhibe ederler. mTORC1, silolimusa ve besin seviyelerine duyarlıdır. Aksine mTORC2, silolimusa duyarsızdır.(39)mTOR inhibitörü ilaçlar, hücre içi protein olan FK506 bağlayıcı protein-12 (FKBP-12) ile kompleks oluşturur ve raptor'un mTOR'a bağlanmasını engelleyerek mTOR aktivitesini önlerler.(40)

Rapamisin MTOR 1 için büyük ölçüde seçici olsada bazı çalışmalarda yüksek doz rapamisinin MTOR2 kompleksini de inhibe ettiği hücre hatlarında gösterilmiştir.(35) Rapamisin MTOR 1 inhibe eder. Dolayısıyla SGK'de inhibe olur. Bu inhibisyonla MEK-ERK kaskadı ve PDGFR aktive olur. Bu döngüler, rapamisinin etkilerini azaltarak kanser modellerinde ve hastalardaki etkinliğini azaltmaktadır. Ayrıca rapamisin mTORC1'in tüm fonksiyonlarını inhibe etmez. 4E-BP1 fosforilasyonunu geçici olarak ve kısmen etkiler. S6K1-IRS1 geri besleme döngüsünü baskılayarak ve PI3K-AKT yolunu hiperaktifte olur. Bu olumsuzluklar, mTOR ikinci jenerasyon inhibitörleri arayışına sürüklemiştir.(28)

Temsirolimus 2007 yılında FDA onayı alarak ilerlemiş renal hücreli karsinom hastalarında sağ kalımı artırdığı gösterilmiştir. Temsirolimus, ilk mTOR inhibitör sınıfı

ilaç olmuştur. Başka bir mTOR inhibitörü olan everolimusun da metastatik böbrek hücreli kanser hasta grubunda progresyonsuz sağ kalımı uzattığı görülmüştür. Ayrıca tuberosklozla ilişkili astrositom ve pankreatik nöroendokrin tümörlerde de kullanılmaya başlanmıştır. Ridaforolimus, sarkomada etkinliği gösterilmiş bir diğer mTOR inhibitörüdür.(39)

Daha öncede belirtildiği gibi rapaloglar mTORC1 e daha spesifik olması sebebiyle hem mTORC1 hem mTORC2 i inhibe eden ajanların arayışı olmuştur. ATP-kompetitive mTOR kinaz inhibitörleri hem TORC1 hem de TORC2 kompleksini inhibe eder. Bu inhibisyonunu kinaz aktivitesini ortadan kaldırarak yapar. Bu grup inhibitörler ile rapamisin ile karşılaştırıldığında; her ikisinin de S6K1'in fosforilasyonunun inhibisyonunda etkisi eşittir. 4E-BP1 fosforilasyonunun inhibisyonunda ise mTOR kinaz inhibitörleri daha etkilidir.(41)

Prostat kanseri üzerine bazı Mtor kinaz inhibitörlerinin faz 1 klinik çalışmaları devam etmektedir. Bunlardan INK128, AZD8055, OSI-027 den bahsedilecektir.

INK128, farklı kanser hücre çizgilerinde apoptozu uyarır. İn vivo bir fare çalışmasında INK128 tedavisi, azalmış proliferasyon ve artan apoptoz ile ilişkili olan PtenL/L farelerindeki prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) lezyonlarında % 50 azalma ile sonuçlandı.

PtenL/L farelerindeki INK128 tedavisinin benzersiz sitotoksik özellikleri, prostat kanseri hacminde belirgin bir azalma ile kanıtlandı.

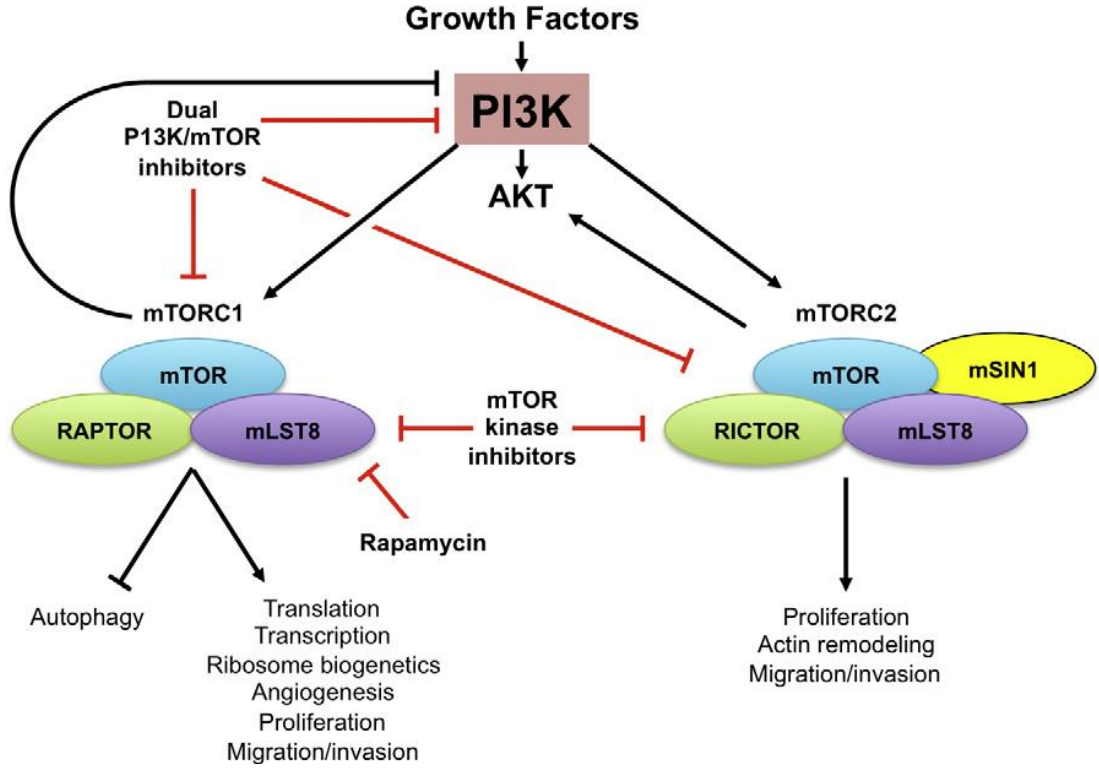
AZD8055;4E-BP1, S6 ve Akt fosforilasyonunu önemli ölçüde inhibe etti. AZD8055; meme, akciğer, kolon, uterin ve prostat dahil olmak üzere birçok kanser hücre dizisinin çoğalmasını güçlü bir şekilde inhibe etti.

OSI-027, in vitro ve in vivo olarak çeşitli kanser modellerinde mTORC1 substratları 4E-BP1 ve S6K1'in yanı sıra mTORC2 substratı Akt'in fosforilasyonunu inhibe etti.

OSI-027 ayrıca, kolon, yumurtalık, göğüs, akciğer, prostat, lenfoma ve baş-boyun kanseri birçok farklı insan ksenograft modelinde antitümör aktivite gösterdi.(42)

Dual PI3K-mTOR inhibitörleri, katalitik mTOR inhibitörlerine göre daha üstün olabilir. Çünkü, PI3K-PDK1 ve mTORC2'yi devre dışı bırakarak Akt inhibisyonuna neden olur. Bununla birlikte, sinyal yollarının bu geniş inhibisyonu normal hücreler için toksik olabilir.(28) NVP-BEZ235, BGT226, XL765/SAR245409, SF1126, GDC-0980, PI-103, PF-04691502, PKI-587, ve GSK2126458 gibi ilaçların ileri solid tümörlerde ve lenfoma için faz1 ve faz 2 çalışmaları devam etmektedir.(28)

Şekil 6. mTOR ilaç inhibitörlerinin mekanizması



2.5 MLST8

2.5.1 MLST8 tanımı ve fonksiyonu

mLST8, daha öncede belirtildiği gibi mammalian lethal with SEC13 protein 8 olarak tanımlanır ve diğer bir ismi G protein beta subunit-like (GβL) dir. mLST8, hem mTORC1 hem de mTORC2'nin ortak bir alt birimidir. Yedi WD40 tekrarını içeren küçük bir adaptör proteini olan mLST8, mTOR'un kinaz alanına bağlanır ve mTOR'un kinaz aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir. (36) MLST8 içermeyen fareleri kullanan aşağıdaki çalışmalar, bu proteinin mTOR-raptor etkileşimi için değil, mTOR-riCTOR etkileşimi için gerekli olduğunu ve mLST8'in mTORC1'den ziyade mTORC2 için bir role sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, mLST8'in kesin rolü, mTORC1'de özellikle belirsiz kalmaktadır. (41) bazı çalışmalarda ise mLST8 upregülasyonunun, mTORC1 / 2 oluşumunun ve akabinde AKT ve 4E-BP1'in fosforilasyonunun desteklenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. (29)

Ayrıca, S6K tarafından fosforile edilen karbamoil fosfat sentetaz 2, aspartat transkarbamilaz, dihidroorataz un oluşturduğu pirimidin sentezinde görev alan enzim kompleksi ile mLST8 ilişkilidir. (29)

2.5.2 MLST8 ile kanser ilişkisi

mLST8 upregölasyonu, mTORC2 yolunun aktivasyonu yoluyla potansiyel olarak hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve fokal kontakların oluşumunu destekler. Bu bulgular, mLST8 upregölasyonunun kanser hücrelerinin invazif potansiyelini arttırdığını göstermektedir.

Bununla birlikte, prostat kanserleri durumunda, normal ve kanser hücreleri arasında mLST8 transkriptlerinin ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır.(29) mLST8'in aynı zamanda, tümör büyümesine ve invazyonuna katkıda bulunduğu birçok insan kolon ve prostat kanseri hücresi dokusunda da düzenlendiğini gösterdik.(29)

Western-blot analizi, test edilen tüm kanser hücresi hatlarında işaretlenmiş bir mLST8 artışı gösterdi. Benzer şekilde, mTOR, RICTOR, RAPTOR ve mSIN1 gibi diğer mTOR kompleks bileşenlerinin protein seviyeleri de bu hücrelerde yukarı doğru düzenlenmiştir.(29)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, üretici firma bilgileri ve kullanım amaçları

Kimyasal	Üretici Firma	Kullanım Amacı
RPMI1640 media	Lonza	Hücrelerin besi ortamı
FBS (Foetal Bovine Serum)	Biowest (S1810)	Besi ortamına eklenen besleyici madde
Penisilin/Streptomisin	Thermo Scientific (SV30010)	Besi ortamına eklenen antibiyotik
Amfoterisin B	Lonza (17-836E)	Besi ortamına eklenen antifungal
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Biovision (2113-500)	Pasaj yapılırken hücrelerin yıkanmasında kullanılan tampon çözelti
Trypsin-EDTA	Lonza (BE12-167F)	Kültüre edilen adheziv hücreleri flask yüzeyinden ayırmak için kullanılan kimyasal
L-Glutamine	Thermo Scientific (SH3003401)	Besi ortamına eklenen (RPMI-1640'a) amino asit

Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	Marka
Hassas Terazî	Ohaus EP 214C
Manyetik Karıştırıcı	Are
İnkübatör	Thermo Scientific
Santrüfj	Nüve NF 200, TR
İnverted Mikroskop	Shimadzu UV-1208
Floresan Mikroskop	
Laminer kabin	Esco, ABD
Su Banyosu	Nüve BM 402
Vorteks	Mhisheler IKA
Etüv	Heraeus
pH metre	İnılab wtw series

3.2 Hücre Kültürü

Prostat kanseri hücre hatları (DU-145) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) temin edilmiştir.

3.2.1 Hücre kültür hattı için mediumun hazırlanması

Tablo 7. Hücre kültürü hazırlanmasında kullanılan malzemeler

Solüsyonlar	%	Hacim (ml)
RPMI1640		500 ml
Fötal Bovin Serum	% 10	50 ml
L-Glutamin	% 1	5 ml
Penisilin/Streptomisin	% 1	5 ml
Amfoterisin B	% 1	5 ml

3.2.2 Yöntem

1. RPMI 1640 solüsyonu içerisine çizelgede gösterilen miktarda FBS, L-Glutamin, Amfoterisin B ve Penisilin/Streptomisin eklenir.
2. Pipetle birkaç kez çekilip bırakılarak ortamın homojen olması sağlanır.
3. Şişe +4⁰ C'de saklanır.

3.2.3 Hücre Hatlarının Üretilmesi

Prostat kanseri hücre hatları (Du-145) %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-Glutamin ve %1 Amfoterisin B içeren RPMI 1640 (Lonza, BE12-167F) mediumla 75 cm²'lik steril polisitren hücre kültürü flasklarında (Corning) % 5 CO₂'li ortamda, 37⁰C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir.

3.2.4 Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlama işlemi için hücrelerin hücre kültürü flasklarının yüzeyini tamamen kaplamış (%90-100) olmaları gerekmektedir. Böyle flasklara 'konfluent flasklar' denir. Konfluent flaskların üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreleri temizlemek için PBS ile yıkanır ve daha sonra PBS aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırılır. Hücre pasajlama işlemi, flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücrelere zarar verilmeden yüzeyden tripsin yardımıyla kaldırılıp sıvı içinde süspanse edilerek başka ortamlara aktarma prensibine dayanır. Aktarılan ortam %5

CO₂'li etüvde 37⁰ C'de hücre tabakası olana kadar inkübe edilir. Standardizasyon açısından her pasajlama işleminde hücre sayımı ve hücre canlılığı kontrol edilir. Hücreler tripan mavisi ile muamele edilerek, bir hemositometrede mikroskop altında incelenir.

Deney sırasında kullanılacak Tripsin-EDTA (Lonza) 30 dakika öncesinden 37°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda bekletilmiştir. Hücreler 4 ml % 0.05 Tripsin-EDTA (Lonza) ile muamele edilerek 3 dakika inkübatörde (37⁰C, %5 CO₂) inkübe edilmiş ve hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmaları sağlanmıştır. Süre bitiminde hücrelerin tutundukları kültür kabının yüzeyinden ayrılması mikroskop altında gözlenmiştir. Tripsin-EDTA ile hidroliz edilen hücre ortamına 8 ml FBS içeren RPMI 1640 medium eklenerek tripsin inaktivasyonu sağlanmış ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne (non pirojenik ve steril, AFS) transfer edilerek 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir (Nüve NF 200, TR). Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp tüp içerisine 2 ml besiyeri eklenerek hücreler tekrar süspanse edilmiş ve mikroskopta sayılmışlardır. Hücrelerin sayılması için 10 µl hücre süspansiyonu 90 µl Tripan boyasıyla karıştırılarak mikroskop altında sayım yapılmıştır. Hemositometredeki dört karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra çıkan sayı Dilüsyon katsayısı x 10⁴ ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı (hücre/ml) 1x10⁵ hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlemin sonucunda çoğaltma işlemi için hücreler yeni kültür flasklarına alınmıştır. Hücreler % 5 CO₂'li ortamda, 37⁰C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir.

3.2.5. Hücre Hattının Dondurulması

Kullanılan hücreler, yapılan çalışmada duyulan ihtiyaçtan daha fazla sayıda çoğalıyor veya yapılan çalışma bitmiş ya da ara verilecek ise uygun koşullarda dondurularak saklanabilir. Hücrelerin dondurulması, hücrelerin yeniden çözdürüldüğünde canlılık oranının yüksek olması için çok dikkat edilmesi gereken bir işlemdir.

Tablo 8. Hücre Dondurma Mediumu İçeriği

Malzemeler	Final Konsantrasyon	1 ml dondurma mediumu
Medium (RPMI1640)	% 70	0.7 ml
Fetal bovin serum (FBS)	% 20	0.2 ml
DMSO	% 10	0.1 ml

Uygulama Basamakları

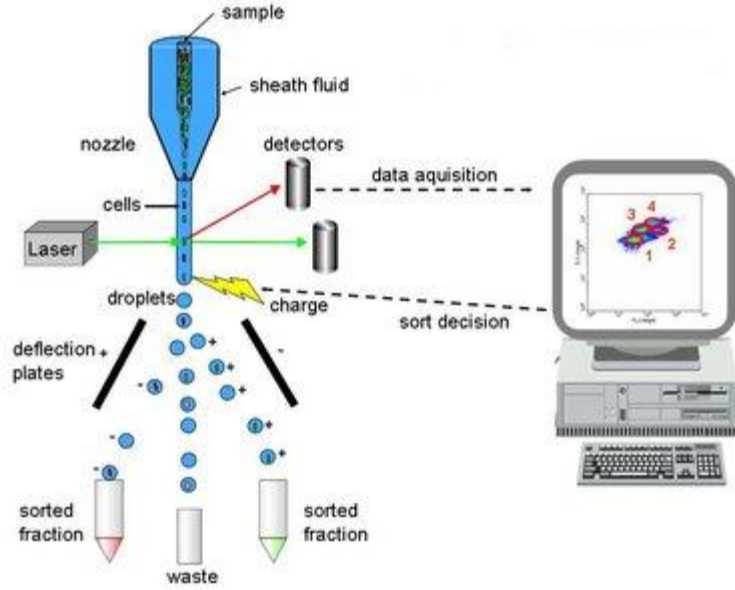
1. Su banyosu 37⁰ C'ye ısıtılır.
2. Hücre besisi ortamı ve serum su banyosunda 37⁰ C'ye ısıtılır.
3. 'Hücre Pasajlanması' protokolünde belirtildiği şekilde hücre pelleti elde edilir.
4. Hücre pelleti, 1 mL dondurma ortamı içinde süspande edilir ve 'cryovial' adı verilen tüplere konulur (Hücre süspansiyonunda 2-4 x10⁶ hücre/ml olması, yeniden çözöldüğünde hücre canlılığının iyi olması açısından önemlidir).
5. Hücrelerin bulunduğu tüpler dondurma kabına konulur ve -80°C'de bir gece bekletilir.
6. Ertesi gün sıvı azot tankına transfer edilir.

3.3 Akım (Flow) Sitometrisi Yöntemi

Akış sitometrisi, belli bir hızda akan bir sıvıdaki hücre veya partiküllerin akışkanın içinde iken karakteristiklerinin ölçölmesidir. Akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışışın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granölarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikölün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi elde edilir.

Akış sitometrisinde, her bir hücre lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan floresan ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürölürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçölün parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur.

Şekil 7. Akım sitometrisini çalışma prensibi

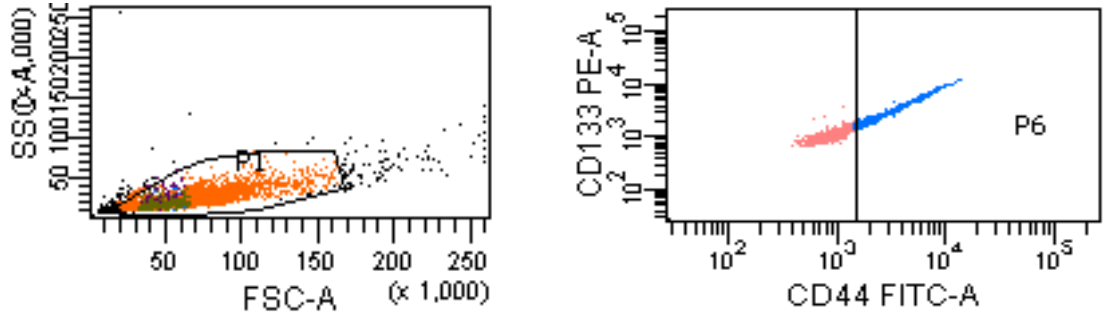


3.4 Flow Sitometri Cihazında CD133⁺/CD44^{+/low} Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması

DU145 prostat kanseri hücrelerinin %1 L-Glutamin (Thermo Scientific, SH3003401), %10 FBS (Biowest, S1810), %1 Amfoterisin B (Lonza, 17-836E) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Thermo Scientific, SV30010) içeren RPMI 1640 (Lonza, BE12-167F) mediumla 75 cm²'lik steril polisitren hücre kültürü flaskslarında (Corning) çoğaltılmalarından sonra hücreler 4 ml % 0.05 Tripsin-EDTA (Lonza) ile muamele edilerek 5 dakika inkübatörde (37°C, %5 CO₂) tutuldu ve flask yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. % 0.05 Tripsin-EDTA + hücre karışımına FBS içeren 8 ml RPMI 1640 medium eklenerek tripsin inaktivasyonu sağlandı ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne (non pirojenik ve steril, AFS) alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi (Nüve NF 200, TR). Süpernatant atıldıktan sonra tüpe 5 ml PBS eklendi, vortekslendi ve bu süspansiyondan 10 µl örnek alınarak tripan blue (Sigma Biyoteknoloji, ABD) ile sayım yapıldı. Yaklaşık 3.000.000 hücre olduğu tespit edildi. Sonrasında bu süspansiyon 300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Daha sonra hücreler 5ml'lik polisitren Falcon tüpe alınarak (steril ve non pirojenik, Becton Dickinson Labware, USA) 1x PBS ile 300 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Sonra tüpe 10 µl CD44-FITC (Clone B-F24, GenProbe USA) ve 10 µl CD133-PE (Miltenyi Biotech, UK) eklendi. 20 dakika karanlık ortamda

oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1ml PBS eklenerek CD133⁺/CD44⁺ yüzey belirteçlerini barındıran DU145 prostat kanseri hücre hattı hücrelerinin floresanla aktive hücre ayırma (FACS) yöntemiyle akım sitometri analizi Ege Üniversitesi AREL'de bulunan FACS Aria II (Beckton Dickinson) cihazında yapıldı (Şekil 1). Hücreler CD133⁺/CD44⁺ (sorting) ve bunların dışında kalan hücreler (non-sorting) olarak içlerinde 2'şer ml RPMI 1640 medium bulunan 5 ml'lik polistiren Falcon tüplere toplandı. Sonra bu hücreler çoğaltılmak üzere 25 cm²'lik steril polistiren hücre kültürü flasksına (Corning) alındı.

Şekil 8. DU145 Prostat kanseri hücre hattından izole edilen CD133⁺/CD44⁺/low kanser kök hücreleri



3.5 RNA izolasyonu ve microarray analizi

Üreticinin protokülüne bağlı olarak RNA'ların tamamı RNeasy Mini kiti (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) kullanılarak hücrelerden üretildi.

Hibridizasyonlu Biotin etiketli RNA örnekleri, Illumina, Inc.'in tavsiye edilen numune etiketleme prosedürüne göre hazırlandı. Hibridizasyon Illumina Human HT12 v4 Expression BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) kiti ile oluşturuldu.

Toplam 250 ng toplam RNA cDNA sentezi için kullanılmış. Daha sonra biotin etiketli cRNA sentezlemek için bir amplifikasyon / etiketleme basamağı izlemiştir. cRNA'nın kalitesi, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak kontrol edildi. Hibridizasyon, 150 ng cRNA / ul konsantrasyonunda GEXHCB tamponu (Illumina, Inc.) içinde 58°C'de gerçekleştirildi. BeadChipler daha sonra yıkandı, bloklandı ve siyanin 3streptavidin (Thermo Fisher Scientific, Inc.) ile konjuge edildi.

Mikroarrayler, iScan Sistemi (Illumina, Inc.) aracılığıyla tarandı. Elde edilen amplifikasyon verileri (tüm genlerin kantifikasyon döngüsü değerlerinde katlama değişimleri), Agilent GeneSpring Veri Analiz Yazılımı'nda (Agilent Technologies, Inc.) işlendi ve filtreleme kriteri için 2 kattan fazla değişim baz alındı.

Tablo 9 Çeşitli genlerin Rna mikraarray veri analizi sonuçları

Gen ID	Sembol	FC (Kat değişimi)	Regulasyon	Definition(Tanım)
11224	RPL35	2,380	up(yukarı)	Homo sapiens ribosomal protein L35
6128	RPL6	2,566	up(yukarı)	Homo sapiens ribosomal protein L6
6233	RPS27A	2,072	up(yukarı)	Homo sapiens ribosomal protein S27a
6136	RPL12	2,063	up(yukarı)	Homo sapiens ribosomal protein L12
285855	RPL7L1	2,170	up(yukarı)	Homo sapiens ribosomal protein L7-like 1
144581	RPL14L	2,057	up(yukarı)	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (RPL14L)
6189	RPS3A	2,459	up(yukarı)	Homo sapiens ribosomal protein S3A
6196	RPS6KA2	1,274	up(yukarı)	Homo sapiens ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2
6195	RPS6KA1	1,317	up(yukarı)	Homo sapiens ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1
1977	ELF4E	1,303	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E
56648	EIF5A2	1,281	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 5A2
8662	EIF3B	1,622	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B
7458	EIF4H	1, 661	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4H
192669	EIF2C3	1,698	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2C, 3
1973	EIF4A1	1,227	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4A
3646	EIF3E	1,433	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E
1982	EIF4G2	1,396	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2
8665	EIF3F	1,409	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F

8663	EIF3C	1,366	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C
8661	EIF3A	1,428	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A
3646	EIF3E	1,433	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E
1975	EIF4B	1,674	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4B
1975	EIF4B	1,674	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4B
1979	EIF4EBP2	1,424	up(yukarı)	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2
57521	RPTOR	1,338	up(yukarı)	Homo sapiens regulatory associated protein of MTOR, complex 1
253260	RICTOR	1,487	up(yukarı)	Homo sapiens RPTOR independent companion of MTOR, complex 2
64223	MLST8	1,762	up(yukarı)	Homo sapiens MTOR associated protein, LST8
3320	HSP90AA1	3,213	up(yukarı)	Homo sapiens heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
207	AKT1	1,370	up(yukarı)	Homo sapiens v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
3091	HIF1A	2,104	up(yukarı)	Homo sapiens hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit
8408	ULK1	-1,509	down/aşağı	PREDICTED: Homo sapiens unc-51-like kinase 1
9706	ULK2	-1,667	down/aşağı	Homo sapiens unc-51-like kinase 2
5290	PIK3CA	1,381	up(yukarı)	Homo sapiens phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
5291	PIK3CB	1,483	up(yukarı)	Homo sapiens phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide

3.6 İmmunfloresan Yöntemi

6'lı kuyucuklar içerisinde lamellerin üzerine alınan hücreler RPMI1640 + 10% FBS + %5 Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin içeren besiyerinde bir gece inkübe edildi. Hücrelerin lamel yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat bekletildi. Hücreler % 4 Paraformaldehid ile 15 dakika fikse edildikten sonra PBS ile yıkandı (3x5 dk). Önce % 0.1 PBS ve TritonX-100 solüsyonunda 10 dk ve daha sonra bloking serumda (Invitrogen, USA) +4°C'de 1 saat bekletildi. Tekrar PBS (3x5 dk) ile yıkanarak anti-mTOR ve anti-MLST8 primer antikori 1/100 oranında PBS ile dilüe edilip uygulandı ve +4°C'de 1 gece boyunca bekletildi. Uygun sekonder antikor (FITC) eklenerek +4°C'de 1 saat bekletildi. Tekrar PBS (3x5 dk) ile yıkanıp DAPI ile kapatılarak Olympus BX 50 (Olympus, Tokyo, Japan) marka floresan mikroskopta görüntülendi.

4. SONUÇLAR

Primer Antikorlar:

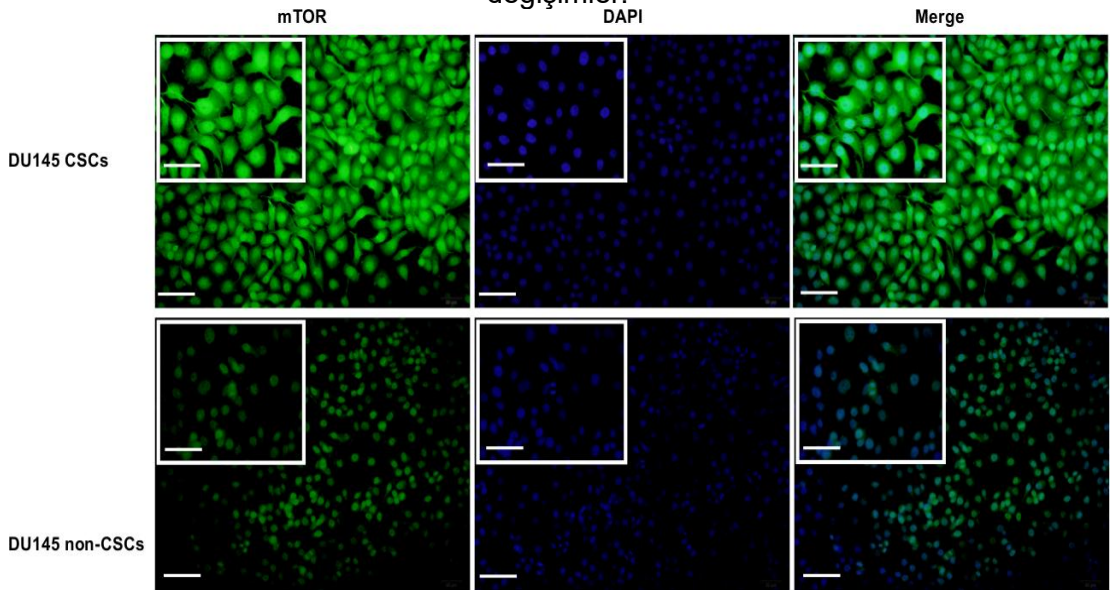
mTOR→Anti-mTOR (1/100 diluted; bs-1992R, bioss)

MLST8→Anti-LST8 (1/100 diluted; TA326904; Origene)

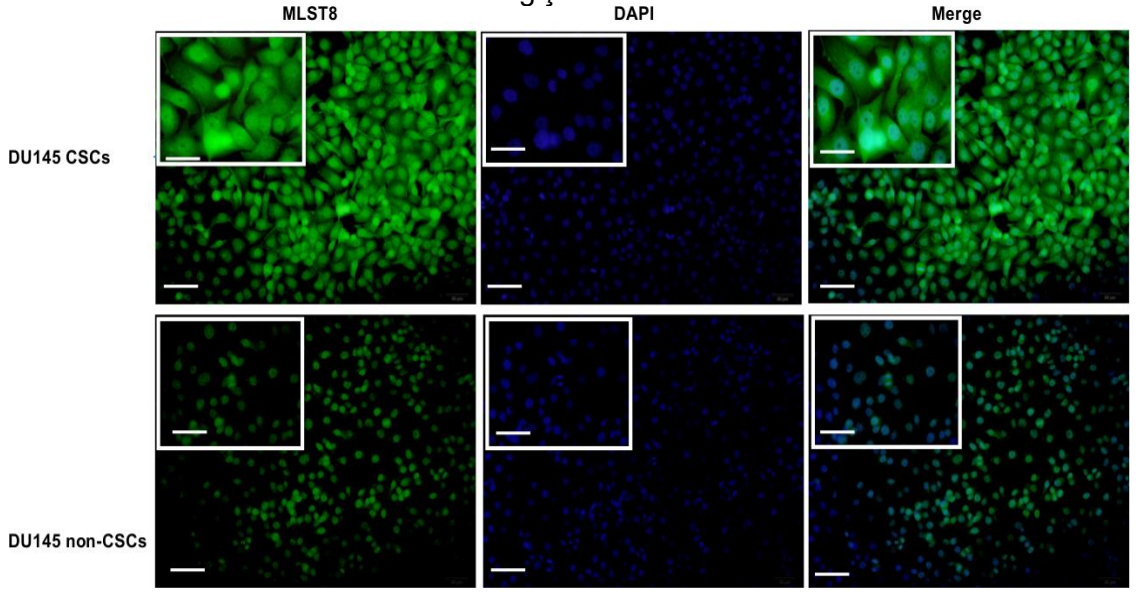
IF Sonuçları

DU-145 KKH ve DU-145 non-KKH hücrelerinde mTOR ve MLST8 proteinlerinde meydana gelen değişimler, immunfloresan boyama yöntemi ile incelendi. DU-145 non-KKH ile kıyaslandığında, mTOR ve MLST8 proteinlerinin floresan miktarında artış görülmüştür.

Resim 1. DU-145 KKH ve DU-145 non-KKH de mTOR proteininde meydana gelen değişimler.



Resim 2. DU-145 KKH ve DU-145 non-KKH de MLST8 proteininde meydana gelen değişimler.



İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 17 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı istatistikler, değişkenler (mTOR ve mLST8 boyama yoğunluğu) için ortalama $\pm$ std. sapma verilerek yapıldı. Sürekli değişkenlerin analizinde, bağımsız iki grubun (DU145 KKH leri ve DU145 non-KKH leri) karşılaştırılmasında normal dağılım durumunda bağımsız gruplarda *t*-testi ile analiz edildi. *p*-değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. TARTIŞMA

Prostat kanseri başlangıç evresinde cerrahi, radyoterapi, hormonoterapi ile tedavi edilebilirken metastaz yapan hastalıkta kemoterapi ve hormonoterapi tedavi olarak verilmektedir. Metastatik prostat kanseri tedaviye yanıt vermemektedir. Bunun sebeplerin birisi de androjen reseptörlerinin yapısının değişmesidir. Daha öncede belirtildiği gibi tümör dokusu heterojendir ve kısmi olarak kök hücre içermektedir. Kök hücrelerin tümör başlaması, büyümesi, yayılımı açısından çok önemlidir. Kanser kök hücresi ;kemoterapiye hormonoterapiye ve radyoterapiye karşı direnç gösterir. Kanser kök hücresi çoklu ilaç direnci oluşturarak kemoterapiye rezistan hale gelir. Ayrıca tedavi sonrası daha dirençli hücreler oluşmaktadır.

Bizim çalışmamızda Du-145 KKH ve Du-145 non-KKH leri, immünfloresans boyama yöntemi kullanılarak hem hücre canlılık (DAPI yöntemi) hem de mTOR ve MLST8 proteinlerindeki floresan miktarının yoğunluğu görsel olarak analiz edildi. İstatistiksel yöntem olarak t-testi kullanıldı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

DU-145 non-KKH ile kıyaslandığında, DU-145 KKH de mTOR ve MLST8 proteinlerinin floresan miktarında artış görüldü. Bir görüntü analizi programı olan İmageJ programı ile mTOR ve mLST8'e ait immünofloresans görüntülerdeki yoğunluk (intensity) değerleri hesaplandı. Du-145 KKH ve Du-145 non-KKH lerindeki mTOR ve mLST8 proteinine ait immünofloresans görüntülerindeki yoğunluk değerleri karşılaştırıldı. Prostat kanseri kök hücresinde mTOR ve MLST8 proteinlerine ait yoğunluk değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Bizim çalışmamızın dışında bir başka çalışmada mTOR komplekslerinin gerekli bir bileşeni olan mLST8'in tümör progresyonundaki rolünü ele alınmış. Bazı kanser dokularında ve hücrelerinde mLST8'in yukarı regüle edildiğini ve yukarı-regüle edilen mLST8 nin AKT'nin aktivasyonunu ve .4E-BP1'in fosforilasyonu indüklediğini bulunmuştur. Kolon kanserlerinde, mLST8 transkriptlerinin seviyeleri yükselmiştir. ilginç bir şekilde bu çalışmada prostat kanseri ile normal hücreler arasında mLST8 transkriptlerinin ekspresyonuna western blot yöntemi ile bakılmış ve anlamlı bir değişiklik olmamıştır. (29)

Kanser sinyal yolları kanserlerin mekanizmal temellerini ortaya koymakla birlikte yeni tedavi ajanların geliştirilmesinde önemli rol oynar. Kanser yollarının birisi olan PI3K/AKT/ mTOR yolağının önemli molekülü olan mTOR a karşı çeşitli ilaçlar geliştirilmiştir. mTOR yollarının mLST8 aracılı regülasyonunun daha ileri analizleri, çok çeşitli insan kanserlerinde terapötik müdahale için yeni hedefler sağlayabilir. Hedefe yönelik ilaçlara örnek olarak ilerlemiş renal hücreli karsinomda

FDA onayı almış Temsirolimus örnek verilebilir. Henüz FDA onayı almış prostat kanserlerine yönelik herhangi bir mTOR inhibitörü ilaç yoktur. Fakat bazı mTOR inhibitörü moleküllerin prelinik çalışmaları devam etmektedir. Özellikle metastatik prostat kanserlerde bu yeni ajanlar yeni umut olabilir.

Ayrıca mTOR ve MLST8 moleküllerinin artışı kanserlerinin prognoz tayininde, tedavi cevabında kullanılabilir. Prostat kanserlerinde TMPRSS2-ERG gen füzyonu moleküler prognostik faktör olarak bulunmuştur. mTOR ve MLST8 proteinleri de prognostik faktör olarak kullanılabilir. Fakat bununla ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Moleküler biyolojinin daha da gelişmesi ile mTOR inhibitörleri ile kanser hücrelerinde bozulan yolları hedef alan moleküler ilaçların geliştirilmesi kanser tedavisinde kolaylıklar sağlayacaktır.

Prostat kanseri kök hücrelerinin tanımlanması ve yeni sinyal yollarının araştırılması ile hedefe yönelik ilaçlar tedavide daha etkin sonuçlar oluşturacaktır.

.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser kök hücreleri metastaz yapma ve tedavi direncinde önemli rol oynar. Bu kanser kök hücrelerine yeni tedavi ajanları özellikle hedefe yönelik ilaçlar ilerde önemli rol oynayacaktır. Metastatik prostat kanserine yönelik yeni ilaçlar geliştirilmektedir. Fakat henüz klinik kullanıma giren mTOR inhibitörü ilaç yoktur. Bizim çalışmamızda ve diğer çalışmalarda prostat kanser kök hücrelerinde artmış mTOR ve MLST8 molekülleri gösterilmiştir.Bu iki moleküle yönelik hedef ilaçlar geliştirilmesinin prostat kanseri tedavisinde önemli olabileceğini ve hem mTOR hem MLST8 in prostat kanseri prognozunun belirlenmesinde yardımcı olabileceğini düşünüyoruz.

Sonuç olarak, prostat kanseri kök hücreesindeki mTOR ve MLST8 proteinlerindeki bu anlamlı artış tedavi ve prognoz tayininde önemli bir yer teşkil edebilir. mTOR yolağı ile ilgili çalışmalar yapılarak hedefe yönelik tedaviler geliştirebiliriz.

7.KAYNAKLAR

1. Aydın S, Boz MY. Türkiye’de üriner sistem kanserlerinin görülme sıklığında hızlı değişme. Turk Urol Derg. 2015;41(4):215–20.
2. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann Oncol. 2005;16(3):481–8.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer Statistics, 2008. CA Cancer J Clin [Internet]. 2008;58(2):71–96. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/CA.2007.0010>
4. Alkibay T, Gürocak S. Temel Üroloji. 4th ed. Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y, editors. Ankara: Güneş tıp kitapçevleri; 2011. 742 p.
5. Prostate-specific antigen after anatomic radical retropubic prostatectomy. Patterns of recurrence and cancer control.
6. Sümer B, İlker G. Temel Üroloji. 4th ed. Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y, editors. Ankara: Güneş tıp kitapçevleri; 2011. 801 p.
7. Aydın S. Türkiye Klinikleri J Urology-Special Topics. Türkiye Klin J Urol Top. 2017;10(1308–1101).
8. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer Stem Cells — Perspectives on Current Status and Future Directions : AACR Workshop on Cancer Stem Cells. 2006;(19):9339–45.
9. Bonnet D. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. 2015;(April).
10. Moltzahn F, Thalmann GN. Cancer stem cells in prostate cancer. Transl Androl Urol [Internet]. 2013;2(3):242–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816738>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4708185>
11. Jaworska D, Król W, Szliszka E. Prostate cancer stem cells: Research advances. Int J Mol Sci. 2015;16(11):27433–49.
12. Jiang W, Peng J, Zhang Y, Cho W, Jin K. The Implications of Cancer Stem Cells for Cancer Therapy. Int J Mol Sci [Internet]. 2012;13(12):16636–57.

Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/12/16636/>

13. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, et al. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004;101(39):14228–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=521140&tool=pmc&rendertype=abstract>
14. Verhagen APM, Ramaekers FCS, Aalders TW, Schalken J a. Colocalization of Basal and Luminal Cell-type Cytokeratins in Human Prostate Cancer Colocalization of Basal and Luminal Cell-type Cytokeratins in Human Prostate Cancer. 1992;6182–7.
15. Parimi V, Goyal R, Poropatich K, Yang XJ. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *Am J Clin Exp Urol* [Internet]. 2014;2(4):273–85. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4297323&tool=pmc&rendertype=abstract>
16. Korsten H, Ziel-van der Made A, Ma X, van der Kwast T, Trapman J. Accumulating progenitor cells in the luminal epithelial cell layer are candidate tumor initiating cells in a Pten knockout mouse prostate cancer model. *PLoS One*. 2009;4(5):25–7.
17. Semenas J, Allegrucci C, Boorjian SA, Mongan NP, Persson JL. Overcoming drug resistance and treating advanced prostate cancer. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2012;13(10):1308–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3474961&tool=pmc&rendertype=abstract>
18. Aydın S. *Turkiye Klinikleri J Urology-Special Topics. Türkiye Klin J Urol Top*. 2017;10(1308–1101):79.
19. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, et al. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*. 2006;25(12):1696–708.
20. Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL. CD44+CD24–

prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer* [Internet]. 2008;98(4):756–65. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6604242>

21. Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, et al. Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med*. 2008;14(10):450–60.
22. Richardson GD. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* [Internet]. 2004;117(16):3539–45. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.01222>
23. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):10946–51.
24. Van Den Hoogen C, Van Der Horst G, Cheung H, Buijs JT, Lippitt JM, Guzmán-Ramírez N, et al. High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer. *Cancer Res*. 2010;70(12):5163–73.
25. Li T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, Liu Z, et al. HHS Public Access. 2013;90(2):234–44.
26. Jiao J, Hindoyan A, Wang S, Tran LM, Goldstein AS, Lawson D, et al. Identification of CD166 as a surface marker for enriching prostate stem/progenitor and cancer initiating cells. *PLoS One*. 2012;7(8):1–14.
27. Pettersson A, Graff RE, Bauer SR, Pitt M, Rosina T, Stack EC, et al. The TMPRSS2-ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: A cohort study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev*. 2013;1–20.
28. Hay N, Sonenberg N. NIH Public Access. NIH Public Access. 2012;12(1):21–35.
29. Kakumoto K, Ikeda JI, Okada M, Morii E, Oneyama C. MLST8 promotes mTOR-mediated tumor progression. *PLoS One*. 2015;10(4):1–15.

30. Sehgal SN, Baker H. Rapamycin (ay-22,989), a new antifungal antibiotic II. fermentation, isolation and characterization. *J Antibiotics*. 1975;XXVIII(10).
31. Manuscript A, Dysfunction E. NIH Public Access. 2015;25(8):713–24.
32. Yuan R, Kay A, Berg WJ, Lebwohl D. Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2009;2(1):45. Available from: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-2-45>
33. Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen J, et al. the mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer*. 2009;15(2):148–59.
34. James J. Gibbons, Robert T. Abraham KY. Mammalian Target of Rapamycin: Discovery of Rapamycin Reveals a Signaling Pathway Important for Normal and Cancer Cell Growth. Elsevier. 2009;
35. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22(2):159–68.
36. Chen CH, Sarbassov DD. The mTOR (mammalian target of rapamycin) kinase maintains integrity of mTOR complex 2. *J Biol Chem*. 2011;286(46):40386–94.
37. Boulbés DR, Shaiken T, Sarbassov DD. Biochemical and Biophysical Research Communications Endoplasmic reticulum is a main localization site of mTORC2. 2011;413:46–52.
38. Küçüköner M. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Dicle Med J / Dicle Tıp Derg* [Internet]. 2013;40(1):156–60. Available from: <http://dergipark.gov.tr/doi/10.5798/diclemedj.0921.2013.01.0248>
39. Zaytseva YY, Valentino JD, Gulhati P, Mark Evers B. MTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett* [Internet]. 2012;319(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.005>
40. Choo AY, Yoon S-O, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially

inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008;105(45):17414–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0809136105>

41. Nakashima A, Kawanishi I, Eguchi S, Yu EH, Eguchi S, Oshiro N, et al. Association of CAD, a multifunctional protein involved in pyrimidine synthesis, with mLST8, a component of the mTOR complexes. *J Biomed Sci*. 2013;20(1):1–7.
42. Sun SY. MTOR kinase inhibitors as potential cancer therapeutic drugs. *Cancer Lett* [Internet]. 2013;340(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.06.017>