

ÖZET

Prostat kanseri, prostat bezi hücrelerinde büyüme ve bölünme kontrolünün kaybıyla organ hacminde meydana gelen büyüme olarak tanımlanmaktadır. Prostat kanseri dünya genelinde en çok tanı konulan ikinci kanser türü olup, erkeklerde kanser nedeniyle ölüm vakalarında altıncı sırada yer almaktadır. Androjenler prostat kanseri gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte prostat kanserinin metastatik formlarının androjenlerden bağımsız olması nedeni ile yüksek mortalite oranları görülmektedir. Bu nedenle prostat kanseri tedavisine yönelik olarak yeni terapötik hedeflerin araştırılması halen araştırmacıların ilgi odağı olup, bu hedeflerin etkileşime girdikleri hücresel sinyal yolları aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Anti-kanser stratejilerden bir tanesi kanserli hücrelerin aşırı çoğalma potansiyelinin indirgenmesine yönelik çalışmalardır. Bu mekanizmada önemli rol oynayan siklinler ve sikline bağımlı kinazlar (CDK) yer almaktadır. CDK protein ailesinin ana görevi hücre siklusunu yönetmek ve hücrelerin sağlıklı bir şekilde bölünmesini sağlamaktır. Kanser hücrelerinde CDK'ların aşırı aktivasyonu hücrelerin engellenemeyen bir şekilde sürekli olarak siklusta kalmalarını ve aşırı çoğalmalarını sağlar. Yeni nesil CDK inhibitörlerinden roscovitine (CYC202, seliciclib) ve purvalanol kendilerine özgü CDK hedeflerini inhibe ederek hücre çoğalmasına ket vururlar ve bu nedenle yüksek apoptotik potansiyele sahip ajanlar olarak literatürde yer almaktadırlar.

Bu tez kapsamında mTOR susturması gerçekleştirilmiş, androjen reseptörü pozitif LNCaP ve negatif DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında yeni nesil CDK inhibitörleri roscovitine ve purvalanol uygulamaları ile terapötik modelin apoptotik yetkinliğinin moleküler mekanizmasının anlaşılabilmesi, mTOR ile ilişkili çeşitli sinyal kaskadlarının tetiklenen apoptotik ve/veya mekanizmalarda rolünün gösterilmesi amaçlanmaktadır. mTOR siRNA uygulanmasına ihtiyaç duyulması, mTOR inhibitörü olan rapamycinin mTOR inhibisyonunu geri dönüşümlü şekilde gerçekleştirmesinden kaynaklanmaktadır. Rapamycin, mTOR kompleks 1'i inhibe

ederken, mTOR kompleks 2'ye duyarsızdır. Bu sebeple, mTOR siRNA kullanımı tüm mTOR komplekslerinin baskılanması açısından avantajlıdır.

PC3 ve LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörleri purvalanol ve roscovitine'in tek başlarına ve mTOR yoksunluğunda, mTOR'un alt ve üst sinyal yollarına olan etkileri Pathscan ELISA analiziyle taranmıştır. Bu ilaçların CDK'den bağımsız etkilerinin bulunduğu; purvalanolün mTOR ve mTOR ilişkili farklı kinaz molekülleri üzerinde roscovitine'den daha yetkin olduğu görülmüştür. PC3 ve LNCaP hücre hatlarında mTOR yoksunluğunun CDK inhibitörlerinin apoptotik etkilerine ket vurduğu ve mTOR tarafından düzenlenen Stat1 ve Stat3 proteinlerinin purvalanol ve roscovitine'in terapötik etkileri üzerinde belirleyici olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, LNCaP hücrelerinde CDK inhibitörlerinin Stat3 Ser727 fosforilasyonunu arttırarak Stat3-FoXO1 ve ayrıca CDK5 aktivitesini inhibe ederek AR-Stat3 interaksiyonlarının azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, özellikle Stat3 anlatımının ve fosforilasyonunun hücre sağ kalımı ve hücre ölümüyle ilişkili yolların düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı açığa çıkarılmıştır. DU145 hücrelerinde mTOR siRNA ile birlikte CDK inhibitörlerinin uygulanması, LNCaP ve PC3 hücrelerinden farklı Stat3 anlatım profiline neden olmaktadır. Bu nedenle, DU145 hücrelerinde mTOR yoksunluğu CDK inhibitörlerinin otofaji ya da apoptoz ilişkili olarak değil ama Stat proteinleri aracılığıyla CDK'lar üzerinden hücre siklusuna etki ettiği düşünülmektedir. mTOR protein ifadesini baskılayan CDK inhibitörleri farklı hücre sinyal yollarını da baskı altında tutarak apoptotik veya otofajik karara neden olabilmektedirler. mTOR proteinin bu nedenle belirli bir düzeyde hücrelerde bulunması her iki sinyal yolağı hedefleri açısından düzenleyici olup, CDK inhibitörleri erken cevap mekanizmasında terapötik etkiyi rapaloglar kadar etkili bir şekilde yansıtmamaktadırlar.

ABSTRACT

Prostate cancer is defined as loss of cell growth and proliferation control in prostate tissue cells lead to increased size of prostate gland. Prostate cancer is the second most frequently diagnosed cancer as well as the sixth leading cause of death in males with cancer worldwide. Androgens play a critical role in prostate cancer development. However prostate cancer cells may progress androgen-independently that causes higher mortality rates. Therefore, new therapeutic targets and clarification of their signaling pathways against these aggressive forms are required.

One of the anti-cancer strategies is inhibition of over-proliferation potential of cancer cells. In this mechanism, cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs) play important roles. Major effect of CDK protein family is regulate cell cycle and cell division. In cancer cells, over-activation of CDKs leads to cells continuously remain in cell cycle and causes cellular overproliferation. New generation CDK inhibitors roscovitine (CYC202, seliciclib) and purvalanol inhibits specific CDK targets and thus prevent cell proliferation.

In this study, purvalanol and roscovitine was used to expose the mechanism underlying mTOR-related apoptotic and/or autophagic response and to understand roles of mTOR depending on its signal cascades in the cell death processes via mTOR silenced androgen receptor (AR) negative PC3, DU145 and AR positive LNCaP prostate cancer cell lines. The purpose of using mTOR siRNA is due to a mTOR inhibitor rapamycin's effect on mTOR reversible. Rapamycin inhibits mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) however is not effective on mTORC2. Therefore, using mTOR siRNA has huge advantage on silencing both complexes.

In PC3 and LNCaP cells, CDK inhibitors were used alone and with mTOR siRNA combination to scan and analyze differentiation upstream and downstream targets of mTOR using Pathscan ELISA Assay. CDK inhibitors purvalanol and roscovitine affects activation of mTOR and mTOR-related kinases in a CDK-independent manner. However purvalanol shows more potent inhibitory function than

roscovitine. In PC3 and LNCaP cell lines, mTOR deficiency causes blockage of apoptotic processes induced by CDK inhibitors. On the other hand, regulation of Stat1 and Stat3 proteins by mTOR seems to determine apoptotic effects of those drugs. Increased Stat3 Ser727 phosphorylation levels by CDK inhibitors leads to decrease Stat3-FoxO1 and CDK5 activity. Diminished CDK5 activity then causes AR-Stat3 dissociation. Therefore, especially differentiation in Stat3 expression and phosphorylation status play a vital role in the manner of regulation of cell survival and cell death pathways signalling. However, CDK inhibitors and their combination with mTOR siRNA leads to diverse Stat3 expression profiles in DU145 cell line. It shows that mTOR deprivation in DU145 cells affects Stat1 and Stat3 protein levels and thus alters CDK regulation in cell cycle rather than influences apoptotic and/or autophagic signalling pathways. CDK inhibitors suppress mTOR protein and different signalling pathways so that determine apoptotic or autophagic outcomes. The presence of mTOR in certain level is critical for both signalling pathways. In addition, CDK inhibitors is appeared to less effective than rapalogs in early response mechanism.