



Prostat Kanseri Hücrelerinde Nobiletin Flavonoidinin TLR4 ve TLR9 Reseptörleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Program Kodu: 1002

Proje No: 116S102

**Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Süleyman KALELİ**

Araştırmacı(lar):

Asuman DEVECİ ÖZKAN
Dr. Aysel KALYCI YİĞİN
Prof. Dr. Mehmet AKDOĞAN

Bursiyer:

Eylül Ece İŞLEK

ÖNSÖZ

Prostat kanserinde immün cevap; tümör oluşumu, radyasyon terapisi ve kemoterapide önemli bir rol oynamaktadır. Klinik öncesi ve klinik çalışmalar prostat kanserine karşı TLR'leri hedefleyen tedavi geliştirme potansiyelinin bulunduğunu göstermiştir. Bu nedenle TLR'ler ve doğal bağışıklığın rolünün gösterilmesi, prostat kanserinin moleküler mekanizmasını anlamamıza yardımcı olacaktır. Prostat kanserine karşı kemoterapi ve radyoterapiyi de içine alan tedaviler, hayatta kalma şansını arttırmaktadır. Ancak çoğu hasta ölümlerle sonuçlanan metastaz ve ataklara dayanmak zorunda kalmaktadır. Bu tedaviler kanser hücreleri gibi aynı zamanda normal hücreleri de tahrip etmektedir. Bu nedenle daha etkili ve daha az yan etkiye sahip yeni tedavilerin keşfine ihtiyaç vardır. İmmünoterapinin kanser gelişiminin önlenmesi ve iyileştirilmesi için kullanılabilecek umut vadeden bir tedavidir. İmmün yanıtı arttırabilmesi ama daha az yan etkisinin olması TLR'leri kanser tedavisi için iyi bir hedef yapmaktadır. Nobiletin turunçgil kabuklarında bulunan bir O-metillenmiş flavonoiddir. Yapılan çalışmalar Nobiletin flavonoidinin anti-inflamatuvar ve tümör invazyonunu, proliferasyonunu ve metastazını engelleyici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu proje ile Nobiletin flavonoidinin TLR4 ve TLR9 aracılı sinyal üzerindeki etkinliği araştırılmış, prostat kanserinde önemli rol oynayan tümör inhibisyonu ve matriks metalloproteinazların analizi ile metastaz için bir tedavi geliştirme potansiyeli üzerinde durulmuştur. Sonrasında bu çalışma ile tedavi yaklaşımları konusunda laboratuvar düzeyinde elde edilen verilerin daha ileri çalışmaları desteklemesi beklenmektedir. Projeden elde edilen bulgular ile mevcut durumdaki tedavi stratejilerine ek olarak Nobiletinin yeni tedavi molekülü olarak belirlenme potansiyeli TLR4 ve TLR9 aracılı başlayan immün yanıt için ilk defa değerlendirilmiştir ve kanserde immünoterapinin etkinliği ile ilgili veriler elde edilmiştir.

Projemizi "1002-Hızlı Destek Programı" kapsamında "116S102" proje numarası ile maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimizi bir borç biliriz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLOLAR VE ŞEKİLLER LİSTESİ	iii
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	7
3.1 Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Optimizasyonu	7
3.2 WST-1 Hücre Canlılık Testi	8
3.3 Ligand ve/veya Nobiletin'in Hücelere Muamelesi	8
3.4 Hücrelerden Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	9
3.4.1 RNA İzolasyonu	9
3.4.2 cDNA Sentezi	10
3.5 qRT-PCR	10
3.6 INF- α ve INF- β Analizi	10
3.7 Total Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	11
3.8 SDS-PAGE ve Western Blotlama	12
3.8.1 SDS-PAGE	13
3.8.2 Western Blotlama	14
3.9 Jelatin Zimografi	15
3.10 İstatistiksel Analizler	17
4. BULGULAR	18
4.1 WST-1 Hücre Canlılık Analizi Bulguları	18
4.2 RNA ve cDNA Analizi	19
4.3 qRT-PCR Analizi Bulguları	21
4.4 Sitokin Analizi Bulguları	23
4.5 Protein Analizi Bulguları	26
4.5.1 Protein Miktar Tayini Bulguları	26
4.5.2 Western Blotlama Bulguları	27
4.6 Jelatin Zimografi Bulguları	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	36

TABLolar VE ŞEKİLLER LİSTESİ

TABLolar

Tablo 1. SDS-PAGE ve western blotlama analizlerinde kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları.....	12
Tablo 2. SDS-PAGE içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları	13
Tablo 3. Western blotlama analizinde kullanılan primer (1°) ve sekonder (2°) antikörlerin listesi	14
Tablo 4. Jelatin zimografi jel içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları.....	15
Tablo 5. Jelatin zimografi analizi için gerekli tamponların içeriği ve hazırlanışları	16
Tablo 6. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi	19
Tablo 7. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi	19
Tablo 8. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi.....	20
Tablo 9. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi.....	20
Tablo 10. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi	20
Tablo 11. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi.....	20
Tablo 12. qPCR deneylerinde kullanılan gene özgül primer çiftleri	21

ŞEKİLLER

Şekil 1. Toll-benzeri reseptörler ve TLR-aracılıklı sinyal yolağı.....	5
Şekil 2. Toll-benzeri reseptörler ve prostat kanseri arasındaki ilişki.....	6
Şekil 3. LNCaP, PC-3 ve HUVEC hücre hattında Nobiletin'in hücre canlılığı üzerine etkisi...18	18
Şekil 4. LNCaP, PC-3 ve HUVEC hücre hattında LPS'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.....18	18
Şekil 5. LNCaP, PC-3 ve HUVEC hücre hattında CpG-ODN'nin hücre canlılığı üzerine etkisi	19
Şekil 6. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının TLR4 mRNA miktarı üzerine etkisi.....	22
Şekil 7. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının TLR9 mRNA miktarı üzerine etkisi.....	22
Şekil 8. INF- α miktarı hesaplanan standart eğri grafiği.....	23

Şekil 9. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının INF- α miktarı üzerine etkisi.....	24
Şekil 10. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının INF- α miktarı üzerine etkisi.....	24
Şekil 11. INF- β miktarı hesaplanan standart eğri grafiği.....	25
Şekil 12. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının INF- β miktarı üzerine etkisi.....	25
Şekil 13. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının INF- β miktarı üzerine etkisi.....	26
Şekil 14. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının TLR9 total protein miktarı üzerine etkisi.....	27
Şekil 15. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının TLR9 total protein miktarı üzerine etkisi.....	27
Şekil 16. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulaması sonrası TLR4 ve IRF3 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	28
Şekil 17. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulaması sonrası TLR4 ve IRF3 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	29
Şekil 18. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulaması sonrası TLR4 ve IRF3 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	29
Şekil 19. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulaması sonrası TLR9 ve IRF7 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	30
Şekil 20. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulaması sonrası TLR9 ve IRF7 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	31
Şekil 21. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulaması sonrası TLR9 ve IRF7 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri.....	31
Şekil 22. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi.....	32
Şekil 23. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi.....	32
Şekil 24. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi.....	32
Şekil 25. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi.....	33
Şekil 26. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi.....	33
Şekil 27. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi.....	33
Şekil 28. PC-3 ve LNCaP hücrelerinde Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının MMP-9 enzim aktivitesi üzerine relatif etkisi.....	34

Şekil 29. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerinde Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının MMP-2 enzim aktivitesi üzerine relatif etkisi.....	34
Şekil 30. PC-3 ve LNCaP hücrelerinde Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının MMP-9 enzim aktivitesi üzerine relatif etkisi.....	35
Şekil 31. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerinde Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının MMP-2 enzim aktivitesi üzerine relatif etkisi.....	35

ÖZET

Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) epitelyal, immün ve kanser hücrelerinde eksprese edilen iyi bilinen bir patern tanıma reseptörü ailesidir. Nobiletin, kanser karşıtı özelliklere sahip ve prostat kanseri riskini azalttığı bildirilen bir O-metillenmiş flavonoiddir. Bu çalışmada Nobiletinin etkileri TLR4 ve TLR9 üzerinde PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında araştırılmıştır. LPS (lipopolisakkarit) ve CpG-ODN (CpG oligodeoksinükleotid) sırasıyla TLR4 ve TLR9 sitümlasyonu için kullanılmıştır. Hücre canlılığı WST-1 ile analiz edilmiştir. Nobiletinin inhibe edici konsantrasyonu (IC_{50}) LNCaP için 20 μ M, PC-3 ve HUVEC için 40 μ M olarak bulunmuştur ($p<0.05$). JElatinaz aktivitesi ve protein ekspresyonu sırasıyla zimografi ve western blot ile analiz edilmiştir. MMP-2 ve MMP-9 jelatinaz aktivitesi PC-3 ve LNCaP için düşük bulunmuştur. MMP-2 aktivitesi HUVEC için yüksek bulunmasına rağmen, MMP-9 aktivitesi gözlenmemiştir ($p<0.05$). Aynı zamanda Nobiletinin TLR4 ve IRF3 protein miktarını azalttığı bulunmuştur ($p<0.05$). TLR4 ve TLR9 gen ekspresyonu Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile analiz edilmiştir. Nobiletin'in TLR4 ve TLR9 gen ekspresyonunu azalttığı LNCaP hücrelerinde gözlenmiştir ($p<0.05$). Sitokinler (INF- α ve INF- β) Enzim bağılı immünosorbent deneyi (ELISA) ile analiz edilmiştir. Nobiletinin INF- α ve INF- β miktarını LNCaP hücrelerinde azalttığı bulunmuştur ($p<0.05$). TLR4 ve TLR9 sinyal yollarını Nobiletinin özellikle LNCaP hücrelerinde baskıladığı gözlenmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, Nobiletinin etkisinin AR- bağımlıdır ve TLR4 ve TLR9 sinyal yolları üzerinde baskılayıcı bir etki göstermektedir. Araştırmamız büyük potansiyeli olan TLR4 ve TLR9 sinyal yollarının yeni tedavi yaklaşımları için önemli olduğunu göstermiştir ve çalışmamız yeni projeler için prostat kanseri, Nobiletin ve TLR'ler arasındaki ilişkide moleküler mekanizmanın varlığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri, TLR4, TLR9, Flavonoid, Nobiletin

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) are a well-known family of pattern recognition receptors that expressed in epithelial, immune and cancer cells. Nobiletin is an O-methylated flavonoid that possesses anti-cancer properties and has been reported to reduce the risk of prostate cancer. In this study we investigated the effects of nobiletin on TLR4 and TLR9 in LNCaP, PC-3 and HUVEC cell lines. Lipopolysaccharide (LPS) and CpG-ODN (CpG-oligodinükleotid) were used for TLR4 and TLR9 stimulation, respectively. Cell viability was analyzed with WST-1 assay. Inhibitory concentrations (IC_{50}) of Nobiletin were found 20 μ M for LNCaP and 40 μ M for PC-3 and HUVEC ($p < 0.05$). Gelatinase activity and protein expression were examined by zymography and western blotting, respectively. Gelatinase activity of MMP-9 and MMP-2 was found low in PC-3 and LNCaP, although there was high MMP-2 activity in HUVEC, MMP-9 activity was not observed ($p < 0.05$). Also it was found that Nobiletin reduced TLR4 and IRF3 protein levels in LNCaP and PC-3 ($p < 0.05$). TLR4 and TLR9 gene expression was examined by Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). It was observed that Nobiletin decreased TLR4 and TLR9 gene expression in LNCaP ($p < 0.05$). Cytokines (INF- α and INF- β) were analyzed with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). It was found that Nobiletin reduced the amount of INF- α and INF- β in LNCaP ($p < 0.05$). It is observed that TLR4 and TLR9 signaling pathway is suppressed by Nobiletin especially LNCaP cells. When all the results are evaluated together; the effect of Nobiletin is AR-dependent and shows a reducing effect on TLR4 and TLR9 signaling pathway. Our research showed that TLR4 and TLR9-dependent signaling pathway with great potential is important for new therapeutic approaches and our research demonstrated that molecular mechanism of the relationship between prostate cancer, Nobiletin and TLRs for prospective projects.

Keywords: Prostate Cancer, TLR4, TLR9, Flavonoides, Nobiletin

1. GİRİŞ

Prostat kanserine karşı kemoterapi ve radyoterapiyi de içine alan tedaviler, hayatta kalma şansını arttırmaktadır. Ancak çoğu hasta ölümlü sonuçlanan metastaz ve ataklara dayanmak zorunda kalmaktadır. Bu tedaviler kanser hücreleri gibi aynı zamanda normal hücreleri de tahrip etmektedir. Bu nedenle daha etkili ve daha az yan etkiye sahip yeni tedavilerin keşfine ihtiyaç vardır.

İmmünoterapinin kanser gelişiminin önlenmesi ve iyileştirilmesi için kullanılabilecek umut vadeden bir tedavi olabileceği düşünülmektedir. Kanser hücreleri çok çeşitli mekanizmalar yoluyla bağışıklık sistemi hücrelerinin saldırısından kaçabilmektedir. Tehlikede olan bir immün sistem ve kronik inflamasyon kanser gelişim insidansını arttırmaktadır. İnflamasyon kanserin yedinci ayırt edici özelliği olarak önerilmektedir. Kanserle mücadele için konakçının immün sistemini kullanan immünoterapi, özgünlüğü, daha az yan etkisinin bulunması ve daha az direnç oluşturması gibi bazı avantajlarıyla son zamanlarda ortaya çıkmıştır. İmmünoterapi yönteminde; kanser hücrelerine saldırmak için immün sistemi uyarma ya da kanserde immün sistemin inhibitör araçlarını uzaklaştırmak hedeflenmektedir.

İmmün sistemi düzenlemek için potansiyel bir yaklaşım olarak; aralarında çok iyi çalışılmış olan TLR'leri de içeren doğal bağışıklık sistemindeki PRR'leri hedeflemek önerilmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, tümörlerde TLR'lerin aşırı eksprese edildiklerini ve fonksiyonel olarak görev aldıklarını göstermiştir. Tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen TLR'lerin gerek tümör hücre proliferasyonuna gerekse apoptozise direnci arttırdığı gösterilmiştir. TLR'ler aynı zamanda tümör metastazını da arttırmaları. Bu nedenle, TLR'ler kanser tedavisinde önemli hedefler olarak görülmektedirler. Ayrıca immün yanıtı arttırabilmesi ama daha az yan etkisinin olması TLR'leri kanser tedavisi için iyi bir hedef yapmaktadır.

TLR'ler tümör progresyonunda iki zıt görev üstlenmektedirler. Bir yandan tümör büyümesini ve epitel hücrelerin malignant transformasyonunu teşvik ederken; diğer yandan apoptozisi indükleyip tümör gelişimini baskılamaktadırlar. Bu durum TLR'lerin aktivasyonu ve tümör mikroçevresiyle tetiklenen kompleks sinyal yollarına bağlı olmaktadır. Bu nedenle TLR'lerin aktive olması tümör progresyonunda "iki ucu keskin kılıç" şeklinde ifade edilmektedir. Bu özellikleri göz önüne alındığında, TLR'ler üzerine immünoterapötik bir molekül olma potansiyeli olan moleküllerin etkinliğinin araştırılması önem kazanmaktadır. Nobiletin, antikanser, antiviral ve anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olan turunçgillerden bir polimetoksi flavanoiddir. Son bulgular, nobiletinin bir hücre farklılaşması modülatörü olarak belirlemiştir. Hücre farklılaşması anjiyogenezde çok önemli bir adımdır ve bu yüzden de nobiletinin tümör büyümesi ve metastazı etkileyebilme potansiyeli bulunmaktadır.

Bu projede TLR sinyal yolağında Nobiletin flavonoidinin etkinliği ilk defa değerlendirilmiştir. Özellikle TLR4'ün başlattığı sinyal ile hem tümör büyümesine hem de tümör inhibisyonuna katkı sağlandığı gibi bir ikili görüş mevcuttur. Bu proje ile birlikte bu görüşü netleştirecek veriler elde edilmesi ve TLR4 aracılı başlayan sinyal üzerine immünoterapotik bir molekül olma potansiyeli olan Nobiletin flavonoidinin etkisi araştırılmıştır. TLR4 ligandıyla uyarıldıktan sonra ya MyD88 adaptör proteini bağımlı yolu ya da TRIF adaptör proteini bağımlı yolu izlemektedir. TRIF bağımlı yolu izlediğinde aktifleşen sinyal yolu sonunda Tip 1 interferonların transkripsiyonu geręekleřmektedir. MyD88 bağımlı yol yapılan araştırmalarda çok fazla incelenmiştir. Bu projede ise TLR4 için daha az çalışılmış olan TRIF bağımlı yol üzerinde analizler geręekleřtirilmiř ve literatürde bulunan bu eksikliğin giderilmesi amalanmmıştır.

Nobiletinin prostat kanseri riskini azalttığı rapor edilmiştir ancak mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bu projede Nobiletin flavonoidinin TLR9 aracılı sinyal üzerindeki etkinliği araştırılmış, prostat kanserinde önemli rol oynayan metastaz için bir tedavi geliştirme potansiyeli üzerinde durulmuştur.

Bu projeye birlikte hem prostat kanserinde TLR4 ve TLR9 reseptörlerinin rolleri, hem de bu rol üzerinde tedaviye yönelik olarak immünoterapötik bir molekül olma potansiyeline sahip Nobiletin flavonoidinin etkinliği değerlendirilmiştir. Sonrasında tedavi yaklaşımları konusunda laboratuvar düzeyinde edinilen verilerin daha ileri çalışmaları desteklemesi beklenmektedir. Elde edilen bulgular ile mevcut durumdaki tedavi stratejilerine ek olarak Nobiletin'in yeni tedavi molekülü olarak belirlenme potansiyeli TLR4 ve TLR9 aracılı başlayan immün yanıt için ilk defa değerlendirilmiş ve kanserde immunoterapinin etkinliği ile ilgili veriler elde edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin ikinci büyük nedeni olmaktadır. Meta-analizler de dahil olmak üzere çeşitli çalışmalar, inflamasyonun prostat kanseri patogeneğinde önemli bir rol oynamakta olduğunu göstermektedir (Mishina vd., 1985; Dennis ve Dawson, 2002; Dennis vd., 2002; Roberts vd., 2004; Platz ve Marzo, 2004). Birçok vaka-kontrollü çalışma cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ile prostat kanseri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu belirtmektedir (Patel vd., 2005; Fernández vd., 2005). İlerlemiş ve hormona dayanıklı prostat kanserine sahip erkeklerle yapılan çalışmalarda, IL-6, IL-8, IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin, tümör nekroz faktör a (TNF- α)'nın ve interferon gamma (IFN- γ)'nın yüksek plazma düzeyi rapor edilmektedir (Maggio vd., 2006; Wise vd., 2000). Prostatitise neden olan mikroorganizmaların kronik inflamasyon aracılığıyla hücresel hasara, hücresel hiperproliferasyona ve sitokinlerin yapımının artmasına sebep olarak hücreleri kanserleşmeye teşvik ettiği ortaya konulmaktadır (Coussens ve Werb, 2002). Sitokinler hasarlı hücreleri, anjiyogenez ve doku onarımını değiştirerek doku hasarını sınırlamak için gerekli olsa da, kontrolsüz sitokin yanıtı iyi huylu prostatitisten intraepitelyal neoplazi (PIN) ve kansere gelişimi teşvik etmektedir (De Marzo vd., 1999; Putzi ve Marzo, 2000). Bu nedenle inflamasyonun önlenmesi veya azaltılması prostat kanserinin kimyasal olarak önlenmesinde ilgi çekici bir mekanizma olarak hizmet edeceği düşünülmektedir.

Prostat kanseri riski ve yaşam tarzı arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar son 10 yıldır prostat kanseri vaka sayısının artmasından dolayı son yıllarda daha yaygın hale gelmektedir (Mohile ve Shelke, 2011). Ancak bu hastalığa neden olan özel bir karsinogen bilinmediği için prostat kanseri etiyolojisi hala açık değildir. (Bosland, 2000). Araştırmalarda gelişmekte olan prostat kanseri olasılığı ile ilişkili; artan yaş, etnik köken ve pozitif aile hikayesi gibi bazı risk faktörleri olduğu bulunmuştur (Crawford, 2003). Ancak araştırmalar prostat kanserinin sadece genetik faktörlere bağlı olmadığını, aynı zamanda yaşam tarzı, beslenme ve çevresel faktörlerle de ilişkili olduğunu göstermektedir (Crawford,2003; Gronberg, 2003; Whittemore vd., 1995). Şuanda bütün kanserlerin %90-95'ine yaşam tarzının neden olduğu düşünülmektedir (Gupta vd., 2010).

Flavonoidler, meyvelerde, sebzelerde, çayda ve şarapta bulunan fitokimyasallardır. Flavonoidler *in vitro* şartlarda anti-karsinojenik karakter sergilerler ve cinsiyet hormonlarının seviyesini değiştirerek, hücreleri oksidasyon ya da inflamasyondan koruyarak, anjiyogenez ya da hücre çoğalmasını azaltarak ve apoptozisi düzenleyerek kanser riskini azaltmaktadırlar (Gates vd., 2009). Turunçgillerden gelen flavonoidler bakımından zengin doğal ürünlerin beslenme ile alınımının kanserinin önlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (Meiyanto vd., 2012). Tangeretin, nobiletin, hesperetin, hesperidin, naringenin, and naringin

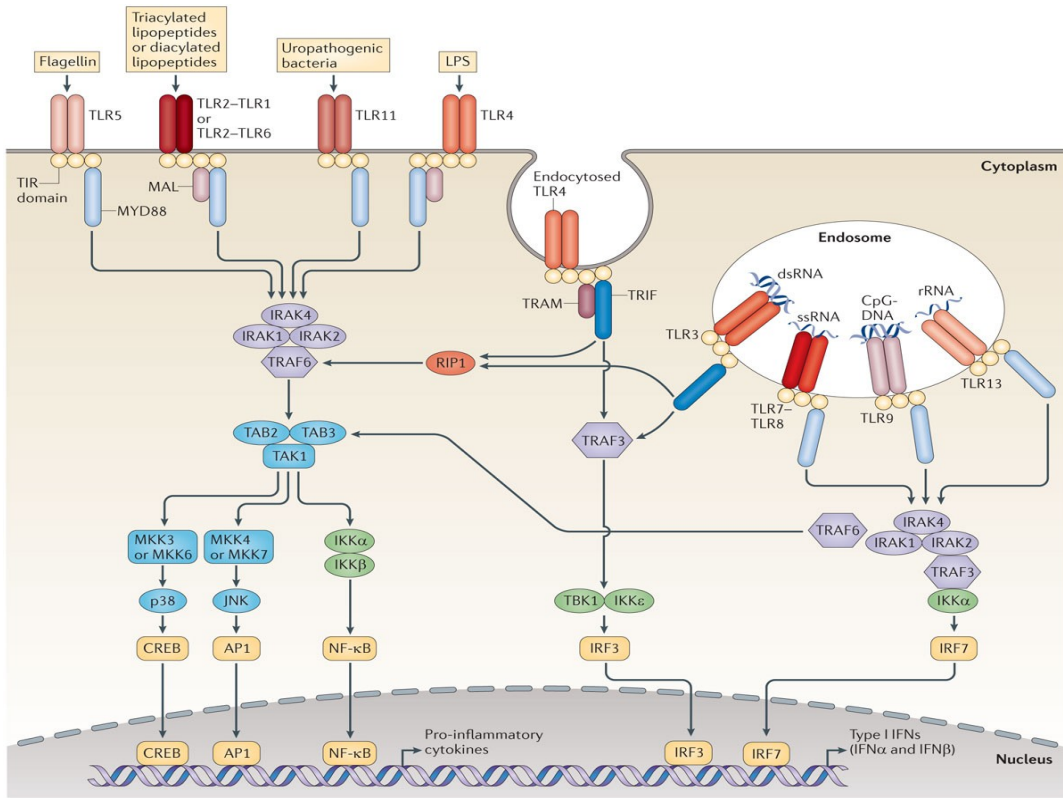
kemoterapötik ajan olarak kullanılmaya potansiyeline sahip turunçgil flavonoidlerinden sadece birkaç tanesidir. Araştırmalar bu flavonoidlerin çeşitli mekanizmalar yoluyla bazı kanser hücrelerinin büyümesini engelleyici etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Meiyanto vd., 2012).

Yiyecek kaynaklarımızda 400'den fazla flavonoid bulunmaktadır (McCann vd., 2003). Nobiletin turunçgil kabuklarında bulunan $C_{21}H_{22}O_8$ kimyasal formülüne ve 402.39 kd moleküler ağırlığına sahip bir O-metillenmiş flavonoiddir (Bernini vd., 2011). Yapılan çalışmalar nobiletin flavonoidinin anti-inflamatuar etkiye ve tümör invazyonunu, proliferasyonunu ve metastazını engelleyici etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Knekt vd., 1997; Li vd., 2006). Daha özel olarak ise, son bulgular, nobiletinin bir hücre farklılaşması düzenleyicisi olarak belirtilmektedir. Hücre farklılaşması anjiyogenezde çok önemli bir adımdır ve bu yüzden de tümör büyümesi ve metastazı etkileyebilmektedir (Kunimasa vd., 2010). Araştırmalar aynı zamanda flavonoidlerce zengin bir beslenmenin bazı kanserlerde önemli bir başlangıç aşaması olan DNA'ya karşı oksidatif stresi bloklayarak azalttığını göstermektedir. Bu bulgular nobiletinin inflamasyon ilişkili tümör oluşumunda fonksiyonel olarak eşsiz ve muhtemel bir kemopreventif ajan olma önerisini desteklemektedir (Murakami vd., 2000).

Toll-benzeri reseptörler (TLR) doğal bağışıklıkta anahtar rol oynayan bir transmembran reseptör ailesidir. TLR'ler doğal immün sistemde, patern tanıyan reseptörler (PRR) olarak görev yapan bir reseptör ailesidir. Bu reseptörler yüksek olarak korunmuş yapılar olan bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi patojen ile ilişkili moleküler yapıları (PAMP) tanıyarak ve bir dizi hücre içi sinyal basamağı oluşturarak immün sistemi aktive etmektedirler (Takeda vd., 2003). Ayrıca farklı bozukluklar ve kanser gibi hastalıklarda endojenik olarak oluşan hasar ilişkili moleküler yapıları da (DAMPs) tanıyabilmektedirler (Takeda vd., 2003). Günümüzde insanda 10 TLR tanımlanmaktadır. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR6 hücre yüzeyinde ifade edilmektedir ancak TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 endozomal reseptörler olarak bulunmaktadır (Şekil 1). Farklı TLR'ler ligandlarını tanımak için özgünlük göstermektedir. TLR2 bakteriyel lipopolisakkaritleri, TLR3 çift zincirli RNA/ Poly (I:C), TLR4 bakteriyel lipopolisakkaritleri (LPS), TLR5 flajellini, TLR7 tek zincirli RNA'yı, ve TLR9 DNA'daki metillenmemiş CpG'leri (CpG-ODN) tanımaktadır (Poltorak vd., 1998; Aliprantis vd., 1999; Hemmi vd., 2000; Alexopoulou vd., 2001; Hayashi vd., 2001; Heil vd., 2004).

TLR'lerin aktivasyonunu takiben sinyalin bir ya da daha fazla adaptör protein (MyD88, TICAM1, TIRAP ve TICAM2) aracılığıyla aktarımı gerçekleşmektedir. Tüm TLR'ler (TLR3 hariç) ve IL-1 reseptör ailesi üyeleri MyD88 aracılığıyla sinyali aktarmaktadır. TLR3 sinyali TRIF yolağıyla aktarır. TLR4 ise hem MyD88 hem de TRIF yolağını kullanarak sinyal iletimini gerçekleştirmektedir (Takeda vd., 2003). TLR'lerin uyarılması inflamatuvar sitokinlerin

yapımıyla sonuçlanan NF- κ B, MAPK'lar, Jun N-terminal kinazlar (JNKs), p38, ERK ve interferon düzenleyici faktörler (IRF3, IRF5, and IRF7) sinyal yollarının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Lee ve Kim, 2007). Antijen sunan hücrelerde (APC) TLR'lerin aktivasyonu kazanılmış bağışıklığı da tetikleyebilmektedir. TLR'lerin hücre ölümünü düzenlediği ve anti apoptotik proteinler olan Bcl- 2-ilişkili protein A1 (BCL2A1), cIAP1, cIAP2, XIAP ve Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadenenmesini arttırdığı gösterilmektedir (Salaun vd., 2007).

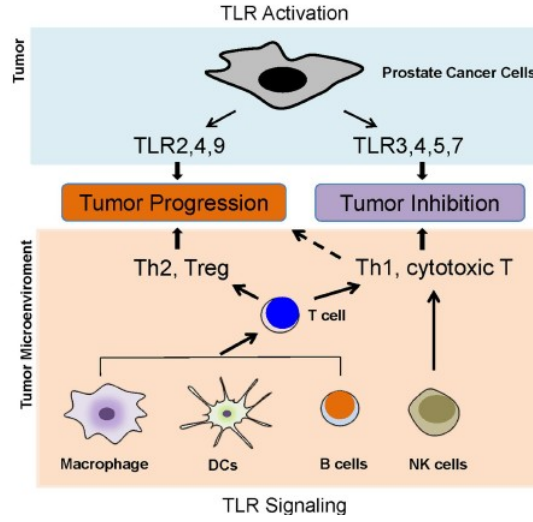


Nature Reviews | Immunology

Şekil 1. Toll-benzeri reseptörler ve TLR-aracılıklı sinyal yolağı (Luke vd., 2013)

Toll-benzeri reseptörler ağırlıklı olarak dentritik hücreler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler (NK) gibi doğal bağışıklık hücrelerinde ifade edilmektedirler. TLR'lerin bu hücrelerde aktive olması doğal bağışıklığın aktivasyonuna sebep olmaktadır ve pro-inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve adhezyon moleküllerinin yapımıyla sonuçlanmaktadır ve sonrasında da kazanılmış bağışıklığın aktivasyonunu kolaylaştırmaktadır (Iwasaki ve Medzhitov, 2004). Artan kanıtlar TLR'lerin tümör hücrelerinde de ifade edildiğini göstermektedir. Tümör hücrelerinde TLR'lerin aktive olması ve tipik doğal bağışıklık hücrelerinin tümör mikroçevresinde aktive olmaları kompleks bir senaryoyla

sonuçlanmaktadır (Şekil 2). Bu yüzden TLR'lerin aktive olması tümör progresyonunda "iki ucu keskin kılıç" rolü oynamaktadır. TLR'lerin dentritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri gibi antijen sunan hücrelerde aktive olması ya Th1 ve T sitotoksik yanıtla ya da Th2 ve Treg yanıtla sonuçlanmaktadır. Prostat kanserinde ise TLR2, TLR4 ve TLR9 aktivasyonunun tümör büyümesini teşvik ettiği, ancak TLR3, TLR4, TLR5 ve TLR7'nin aktivasyonunun prostat kanserini inhibe etmekte olduğu gözükmemektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Toll-benzeri reseptörler ve prostat kanseri arasındaki ilişki (Zhao vd., 2014)

TLR4'ün DU145 hücrelerinde LPS ile uyarılması MyD88-bağımlı yolak aracılığıyla pro-inflamatuar sitokinlerin yapımıyla sonuçlanan NF- κ B sinyal yolağını aktive etmektedir (Gatti vd., 2009). Buna ek olarak PC3 hücrelerinde TLR4 aktivasyonu tümör gelişmesini teşvik eden VEGF ve TGF- β 'nin ekspresyonunu arttırmaktadır (Pei vd., 2008). Aynı zamanda PC3 hücrelerinde siRNA kullanılarak TLR4'ün inaktifleştirilmesi tümör hücrelerinin göçünü ve invazyonunu azaltmaktadır (Hua vd., 2009). TLR9'un CpG-ODN ile uyarılması prostat kanseri invazyonunda önemli rol oynamaktadır (Di vd., 2010). Prostat kanseri hücrelerinde TLR9 ekspresyonunun benzer olarak invazifliği MMP-9'ü indükleme yoluyla arttırdığı *in vitro* olarak da gösterilmektedir (Ilvesaro vd., 2007). Her iki çalışmada da CpG-ODN sitümlasyonu TLR9 sinyalinin kanser progresyonu ve metastazda rol oynadığını gösterecek şekilde hücresel proliferasyona etki etmediği anlaşılmaktadır.

Bu projede prostat kanserinde inflamasyonun rolünü değerlendirmek ve kemoterapötik bir ajan olarak Nobiletin'in kullanım potansiyelini belirlemek üzere; TLR4 ve TLR9'un ifadenmesi, reseptör proteinlerin miktarı, başlattıkları sinyal yolağındaki bazı proteinlerdeki değişimler, sinyal yolağıının sonunda yapımı gerçekleşen pro-inflamatuar sitokinlerin miktarı

ve ayrıca tümör invazyonundaki rolü üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için matriks metalloproteinazların miktarındaki değişimler prostat kanseri hücre hatları LNCaP ve PC3 ve kontrol hücre hattı olan HUVEC hücre hattında incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Optimizasyonu

Prostat kanseri hücre hatları olarak LNCaP (p53 fonksiyonel, AR bağımlı), PC-3 (p53 null, AR bağımsız) ve kontrol hücre hattı olarak HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücreleri) kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları Kocaeli Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKART)'nde gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü steril laminar hava akımlı kabinde gerçekleştirilmiştir. Sıvı azot tankında depolanan hücreler çalışma sırasında bu tanklardan alınarak 37 °C su banyosunda çözülerek, hücre dondurma solüsyonundan arındırıldıktan sonra uygun besiyeri bulunan 60 mm hücre kültürü petri kaplarına ekilmiştir. Maksimum miktarda hücre elde etmek için hücreler 60 mm petri kabında çoğaltıldıktan sonra 100 mm petri kaplarına aktarılmıştır ve bu işlem yaklaşık 5-6 pasaj olacak şekilde uygulanmıştır.

LNCaP ve PC-3 hücre hatları petri kaplarında %10 FBS içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium), kontrol grubu olan HUVEC hücre hattı ECGM (Endothelial Cell Growth Medium with Low Serum Growth Supplement)_besiyerinde 2 mM L-glutamin, 50 IU/mL penisilin ve 50 mg/mL streptomisin eklendikten sonra 37°C' de (% 5 CO₂) kültüre edildi.

TLR4 hücre yüzeyinde eksprese olup bakteriyal LPS'yi tanıırken, TLR9 hücre içi veziküllerde bulunur ve metillenmemiş CpG dinükleotid motifleri içeren omurgalı ve bakteriyal DNA'yı tanıır. LNCaP, PC3 ve HUVEC hücre hatlarına uygun hücre kültürü şartları altında TLR4 reseptör uyarımı için LPS (Lipopolisakkarit), TLR9 reseptör uyarımı için CpG-ODN muamelesi yapılmış ve bunu takiben belirli doz (IC₅₀) ve saatlerde (6 ve 24 saat) Nobiletin flavanoidiyle muamele edilmiştir.

LPS, CpG-ODN ve Nobiletin flavanoidi saf halde ticari olarak temin edilmiştir. Analizlerin yapılması aşamasında kullanılmak üzere hücreler PBS ile yıkandıktan sonra trypsin-EDTA (% 0.25 trypsin/ 1mM EDTA) solüsyonu kullanılarak hücrelerin flasklardan kaldırılmaları sağlanmıştır.

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak ependorf tüpe alınmıştır ve üzerine eşit miktarda tripan mavisi boyası konarak iyice karışması sağlanmıştır. Bu karışımdan 12 µl alınarak Thoma lamına (Marienfeld, Almanya) konmuş ve yavaşça sayım alanına pipetle verilmiştir. Binoküler ışık mikroskobuna Thoma lamı yerleştirildikten sonra mikroskobun 10x objektifinde renksiz (canlı) ve renkli (ölü) hücreler ayrı ayrı sayılmıştır.

3.2 WST-1 Hücre Canlılık Testi

Nobiletin flavonoidinin IC₅₀ (inhibe edici konsantrasyon) değeri WST-1 (Roche Applied Science) testi ile belirlenmiştir. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatları için 96 kuyulu mikropalakaya her kuyuya 100 µl besiyeri ile 5× 10³ hücre ekilerek 100 µl besiyeri ile 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur ve %80 konfluent hale gelmesi sağlanmıştır. Phenol redsiz besiyeri ile besiyeri yenilenecek farklı konsantrasyonlarda Nobiletin flavonoidi (0-5-10-20-40-80-160 µM) eklenerek 6, 24 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

LPS ve CpG-ODN'nin hücre canlılığına etkisini görebilmek için aynı şekilde WST-1 testi ile PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatları için 96 kuyulu mikropalakaya her kuyuya 100 µl besiyeri ile 5× 10³ hücre ekilerek 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur ve %80 konfluent hale gelmesi sağlanmıştır. Phenol redsiz besiyeri ile kuyular yenilenecek farklı konsantrasyonlarda LPS ve CpG-ODN (1 ve 5 µM) eklenerek 6, 24 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süreleri sonunda 10 µl WST-1 boyası her kuyuya eklenerek 4 saat beklenmiştir. 4 saat sonunda ELISA okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan™ FC Microplate Photometer) 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Ölçümler sonucunda her hücre hattı için ayrı olarak ortalama IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Bu değerler göz önüne alınarak belirli zaman aralıklarında hücre hatlarına Nobiletin ve/veya ligand uygulaması sonrasında diğer moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.

3.3 Ligand ve/veya Nobiletin'in Hücrelere Muamelesi

TLR4 hücre yüzeyinde eksprese olup bakteriyal LPS'yi tanıırken, TLR9 hücre içi veziküllerde bulunur ve metillenmemiş CpG dinükleotid motifleri içeren omurgalı ve bakteriyal DNA'yı tanıır. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarına uygun hücre kültürü şartları altında moleküler analizler öncesinde TLR4 reseptör uyarımı için LPS, TLR9 reseptör uyarımı için CpG-ODN muamelesi yapılmıştır. TLR4 ve TLR9 reseptörlerinin ligandlarına özgül olması, çalışmamızın sonuçlarının özgünlüğünü arttırması beklendiği için kültür şartlarında hücreler büyütülürken TLR4 reseptör uyarımı için ortama sadece LPS, TLR9 reseptör uyarımı için ortama sadece CpG-ODN eklenmiştir ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Böylelikle diğer TLR reseptörlerinin uyarımı ile sinyal yolunun aktifleşmesinin engellenmesi hedeflenmiştir. Reseptör stimülasyonuna takiben Nobiletin flavonoidinin çeşitli kombinasyonlarda muamelesi birlikte veya yalnız olarak yapılmıştır.

3.4 Hücrelerden Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

3.4.1 RNA İzolasyonu

TLR4 ve TLR9 reseptörünün gen ekspresyon seviyesini belirlemek için PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatları 10mm hücre kültürü petri kaplarına 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Phenol redsiz ve serumsuz besiyeri ile değiştirilerek 24 saat ligand muamelesini takiben her hücre hattı için belirlenen doz ve sürelerde çeşitli ligand ve Nobiletin kombinasyonları uygulanmıştır. Uygulama süreleri sonrasında total RNA, RNA izolasyon kiti (Vivantis, GF-1) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre izole edilmiştir. Elde edilen RNA'lar her hücre hattı için spektrofotometrede (Thermo Scientific, NanoDrop 3300) 260,280 ve 230 nm dalga boylarında ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlenmiştir.

Üretici firmanın önerdiği protokole göre RNA izolasyonunda izlenen yol aşağıdaki gibidir:

- Hücreler 10mm petri kaplarından hücre kazıyıcı ile toplanarak $1000 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Pellet üzerine 350 μ l Buffer TR eklendi ve vorteksenerek karıştırıldı.
- Lizat Homogenization column'a aktararak maksimum hızda 2 dakika santrifüjlendi.
- Collection tüpe geçen sıvıya 350 μ l %80 etanol eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı.
- 650 μ l örnek RNA Binding Column'a transfer edildi ve $10000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı.
- 500 μ l Wash Buffer eklendi ve maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi. Alta geçen sıvı atıldı.
- 70 μ l DNase I Digestion Mix RNA Binding Column'a pipetlendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda 500 μ l Inhibitor Removal Buffer eklendi ve maksimum hızda 1 dakika santrifüjlendi. Alta geçen sıvı atıldı.
- 500 μ l Wash Buffer eklendi ve $10000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi. Alta geçen sıvı atıldı.
- 500 μ l Wash Buffer ile yıkama tekrarlandı ve $10000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi. Alta geçen sıvı atıldı.
- Filtreyi arta kalan bufferdan temizlemek için $10000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi. Alta geçen sıvı atıldı.
- Filtreyi yeni mikrosantrifüj tüpüne geçirildi. Membranın üzerine direk olarak 40-60 μ l RNase-free su eklendi ve 1 dakika beklendi. $10000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi.

- Alta geçen sıvı -20 °C'de saklandı.

3.4.2 cDNA Sentezi

RNA izolasyon aşamasından elde edilen 250 µg RNA, Revers Transkriptaz (Vivantis, RTPL12) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak cDNA'ya çevrimi gerçekleştirilmiştir.

Üretici firmanın önerdiği protokole göre RNA izolasyonunda izlenen yol aşağıdaki gibidir:

- RNA- Primer mix hazırlandı. (Her örnek için 10 µg RNA, Oligo d(T) (40 µM), Random Hexamers (50 ng/µl), dNTP mix (10 µM) ve nuclease-free su).
- Bu karışım 65 °C'de 5 dakika bekletildi ve sonrasında buzda 2 dakika soğutuldu.
- cDNA sentez mix hazırlandı (10X Buffer M-MuLV, 100 ünit M-MuLV Reverse Rranskriptaz ve nuclease-free su).
- 10 µl cDNA sente mix ile 10 µl RNA-primer mix karıştırıldı.
- Karışım 25 °C'de 10 dakika bekletildi. Ardından 42 °C'de 60 dakika bekletildi.
- Ardından 85 °C'de 5 dakika bekletildi ve buzda 1-2 dakika soğutularak reaksiyon sonlandırıldı.
- Real-Time PCR analizinde kullanılmak üzere cDNA'lar -80 °C'de saklandı.

3.5 qRT-PCR

Sentezlenen cDNA'lar kullanılarak ilgilenilen genlere ait mRNA seviyeleri, 3 tekrarlı olmak üzere her bir reaksiyon için 96'lık PCR plakaları kullanılarak belirlenmiştir. Her bir kuyucuk için 5 µl SYBR Green çözeltisi (2X), 0.3 µM ileri primer, 0.3 µM geri primer ve 2 µl kalıp cDNA (1:20) buz üstünde karıştırılarak kit içerisindeki H₂O ile son hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. qPCR reaksiyonları CFX Connect sisteminde (Bio-Rad), 95 °C'de 20 saniye, 40 döngü olarak 95 °C'de 1 saniye ve 60 °C'de 20 saniye şeklinde gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak β-gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanılırken, deney gruplarının normalizasyonu kontrol grubuna göre yapılmıştır. PCR reaksiyonlarında kontaminasyon kaynaklı olası hataların belirlenmesi amacı ile kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol grupları da kuyucuklara eklenmiştir. PCR reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin özgün olup olmadığının belirlenmesi için de bu reaksiyonlara ait erime eğrileri analiz edilmiştir. qPCR sonuçları REST programı ile analiz edilmiştir. ΔΔCT değerleri kullanılarak gen ifadelerindeki göreceli değişim hesaplanarak grafikleri çizilmiştir.

3.6 INF-α ve INF-β Analizi

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatları 10mm hücre kültürü petri kaplarına 1×10⁶ hücre/petri olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon

sonrası Phenol redsiz ve serumsuz besiyeri ile değiştirilerek 24 saat ligand muamelesini takiben her hücre hattı için belirlenen doz ve sürelerde çeşitli ligand ve Nobiletin kombinasyonları uygulanmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda kültür ortamındaki besiyeri toplanarak INF- α ve INF- β miktarı INF- α ve INF- β ELISA kiti (Elabscience) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Üretici firmanın önerdiği protokole göre izlenen yol aşağıdaki gibidir:

- Her kuyuya 100 μ L standart ya da örnek eklendi. 90 dakika 37 °C inkübe edildi.
- Sıvı kısım uzaklaştırıldı. 100 μ L biyotinlenmiş tespit edici antibadi eklendi. 1 saat 37 °C inkübe edildi.
- Aspire edildi ve 3 kez yıkandı.
- 100 μ L HRP konjugatı eklendi. 30 dakika 37 °C inkübe edildi.
- Aspire edildi ve 5 kez yıkandı.
- 90 μ L substrat çözeltisi eklendi. 15 dakika 37 °C inkübe edildi.
- 50 μ L durdurucu çözelti eklendi. Hemen 450nm'de okundu.
- Sonuçlar hesaplandı.

3.7 Total Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Total protein miktarını belirlemek için PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatları 10mm hücre kültürü petri kaplarına 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Phenol redsiz ve serumsuz besiyeri ile değiştirilerek 24 saat ligand muamelesini takiben her hücre hattı için belirlenen doz ve sürelerde çeşitli ligand ve Nobiletin kombinasyonları uygulanmıştır. Uygulama süreleri sonrasında total protein RIPA Lysis Buffer (Thermo Scientific) kullanılarak izole edilmiştir. Hücreler petrilere kazınarak toplanmıştır ve santrifüj edilerek elde edilen pellet soğuk lizis buffer ile resüspanse edilmiştir. 10 dakika santrifüj edilen üst sıvı alınarak miktar tayini için kullanılmıştır. Sonrasında örnekler daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Miktar tayini için Bradford Assay (Bradford, 1976) yöntemi kullanılmıştır. Ölçülecek protein özütünden 1 μ l alınarak 19 μ l standart tamponu ile karıştırılmıştır. Karışım üzerine 1ml 1X Bradford Reagent (Bio-Rad, ABD) eklenerek vortexlenmiştir ve karanlıkta 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) ile 595 nm'de ölçülmüştür. Örneklerin ölçülen protein konsantrasyonları daha önce 595 nm'ye göre hazırlanmış BSA standart eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Her örnek için ölçümler 3 defa tekrarlanmıştır ve bu tekrarların ortalamalarından elde edilen sonuçlar protein örneklerinin konsantrasyonları olarak kabul edilmiştir.

3.8 SDS-PAGE ve Western Blotlama

Analizlerde kullanılan tampon çözeltiler Tablo 1'de verildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 1. SDS-PAGE ve western blotlama analizlerinde kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları.

Tampon Çözelti Adı	Konsantrasyonu ve Miktarı	Hazırlanışı
Tris.HCl pH 8.8	1,5 M 100 ml	18,15 g Tris tartılarak 80ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 8.8'e ayarlandı ve 100ml'ye tamamlandı.
Tris.HCl pH 6.8	0,5 M 100 ml	6 g Tris tartılarak 80 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 6.8'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
Sodyum Asetat	3 M 10 ml	2,46 g Sodyum Asetat 1 ml distile suda çözüldü.
SDS	% 10 10 ml	1 g SDS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
Amonyum Persülfat (APS)	% 10 10 ml	1 g APS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4°C'de saklandı.
6X Yükleme boyası (6 X Loading Dye)	0,5 M Tris-HCl pH 6.8, Glycerol (% 99,7), % 10 SDS, β-Mercaptoethanol, % 0,5 (w/v) Bromphenol blue	1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 2 ml Glycerol (% 99,7), 1,6 ml % 10 SDS, 0,4 ml β-Mercaptoethanol, 0,4 ml % 0,5 (w/v) Bromphenol blue 2,6 ml distile su ilave edildi.
Akrilamid/Bisakrilamid	% 30 100 ml	29,2 g Akrilamid, 0,8 g Bisakrilamid tartılıp 100 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı.
SDS-PAGE Yürütme Tamponu	5X, 300 ml	4,5 g Tris, 21,6 g Glisin ve 1,5 g SDS distile suda çözülerek 5X tampon 1X 'e seyreltildi.
SDS-PAGE Sabitleştirici Solüsyon (Fiksatif)	% 40 Metanol, % 10 Asetik asit, 100 ml	40 ml Metanol ve 10 ml Asetik Asit karıştırılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı
Western Blot Transfer Tamponu	100 ml	0,58 gr Tris, 0,29 gr Glisin, 0,025 gr SDS (0,375 ml % 10 SDS'den) tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.
TBS-T pH 7.6	25 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2 % 0,1 Tween20 1L	2,42 gr Tris, 8 gr NaCl, 1 ml Tween20 900 ml distile suda çözüldü. pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra 1L'ye tamamlandı. 1ml Tween20 eklendi.
Ponceau S Boyama Solüsyonu	% 0.1 (w/v)	0.1gr Ponceau S ve 0.5 ml Asetik Asit karıştırılarak 100 ml distile suda çözüldü.

Bloklama Tamponu (Western Blot)	% 5 10 ml	5 g süt tozu (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk (Bio-Rad, ABD)), 10 mL TBST içinde çözüldü ve filtre kâğıdından geçirilerek kullanıldı.
--	-----------	---

3.8.1 SDS-PAGE

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kesintili SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. Yükleme ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşan bu jel sistemi Tablo 2’de verilen kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 2. SDS-PAGE içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları.

Kullanılan Kimyasallar	Ayırma Jeli (% 12)	Yükleme Jeli (% 4)
dd H₂O	3.3 ml	3 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	2.5 ml	-
0.5 M Tris pH 6.8	-	1.25 ml
% 10 SDS	100 µl	50 µl
% 30 Akrilamid/BisAk	4 ml	670 µl
%10 APS	100 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Toplam	10 ml	5 ml

Ayırma jeli hazırlandıktan sonra kendinden 1 mm aralıklı (spacer) kalın ve ince camlar arasına dökülmüştür ve üzerine izopropanol (300 µl) konularak jelin yüzeyinin düzleşmesi sağlanmıştır. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra izopropanol dökülerek jelin yüzeyi saf su ile yıkanmıştır. Jel üzerinde cam plakalar arasında kalan su kurutma kağıdı yardımıyla tamamen uzaklaştırılmıştır. Yükleme jeli hazırlanarak polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine dökülmüştür ve cam plakalara uygun 1 mm genişliğindeki teflon tarak yerleştirilmiştir. SDS jeller yürütüleceği zaman cam plakalar elektrotların bulunduğu Tetracell elektroforez (BioRad, USA) tanklarına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankları uygun seviyeye kadar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu konularak yürümeye hazır hale getirilmiştir.

Eşit miktarda yüklenmek istenen protein özütlerinin üzerlerine 6X yükleme tamponundan (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, Glycerol % 99.7), % 10 SDS, β-Mercaptoethanol, % 0.5 (w/v) Bromphenol blue, dH₂O) 1X olacak şekilde eklenerek 95°C’deki su banyosunda 4 dakika kaynatılarak proteinlerin ileri denatürasyonları sağlanmıştır. Kaynatma süresi sonunda örnekler buza alınmıştır ve kısa bir santrifüj sonrası mikropipet yardımıyla jel içerisindeki kuyucuklara yüklenmiştir. Molekül ağırlığı markırı olarak ilk yükleme kuyusuna PageRuler plus prestained protein ladder (Bio-Rad) yüklenmiştir. Jel, 180V akım verilerek 60 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürümesi tamamlanan jel camlar arasından çıkarılarak western blotlama analizi için kullanılmıştır.

3.8.2 Western Blotlama

Protein örnekleri SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır ve nitroselüloz membrana transfer edilerek hedef proteine özgü antikorlarla analiz edilmiştir. Western transferi için yarı kuru sistem olan Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanılmıştır.

SDS-PAGE jeli cam plakalar arasından transfer tamponun içerisine alınarak yaklaşık 10 dakika bekletilmiştir. Bekleme esnasında nitroselüloz membran ve Whatman kağıtları da transfer tamponunda ıslatılmıştır. Süre sonunda transfer cihazının demir levhaları arasına alttan üste doğru sırasıyla 2 kat Whatman kağıdı, nitroselüloz membran, jel, 2 kat Whatman kağıdı olmak üzere (-) ve (+) kutuplara dikkat edilerek katmanlar halinde yerleştirilmiştir. Katlar arasında hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek 25 V sabit akımda 30 dakika boyunca transfer gerçekleştirilmiştir. Transferin ardından membran proteinleri boyayan Ponceau S boyası ile boyanarak western transferinin kalitesi kontrol edilmiştir.

Protein bantları gözlemlenildikten sonra boya saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır ve membran % 5 TBS-T bloklama tamponu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bloklama tamponu uzaklaştırılarak sırasıyla 15, 5, 5 dakika olmak üzere 3 kez TBS-T ile yıkanmıştır. Üreticinin tavsiye ettiği dilüsyonda birincil antikor (Tablo 3) TBS-T içerisinde hazırlanmıştır ve membran bu tampon içerisinde +4°C'de gece boyu nazikçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün önceki yapılan TBS-T ile yıkama işlemi tekrarlanmıştır ve üreticinin tavsiye ettiği ikincil antikor (Tablo 3) TBS-T içerisinde seyreltilerek membran bu tampon içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi tekrarlanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır. Görüntüleme yüksek duyarlılıkta sinyal üretebilen kemilüminesans (Biorad, ABD) kullanılmıştır. Kemilüminesans görüntüleme için Immun-Star HRP Peroxide çözeltisi ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak membran yüzeyine konulmuştur ve yüzeyin tamamının çözelti karışımı ile temas etmesi sağlanmıştır. Membran görüntüleme cihazı ile görüntülenmiş ve western blot bantlarının analizi gerçekleştirilmiştir

Tablo 3. Western blotlama analizinde kullanılan primer (1°) ve sekonder (2°) antikorların listesi.

1° Antikor	2° Antikor
β-Actin Mouse (Santa Cruz, ABD) (1:1000)	Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate (Biorad, ABD) (1:20000)

TLR3, Mouse, sc-32232 (Santa Cruz, ABD) (1:1000)	Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate (Biorad, ABD) (1:20000)
TICAM-1, Mouse, sc-514384 (Santa Cruz, ABD) (1:1000)	Goat IgG Anti-Mouse HRP Conjugate (Biorad, ABD) (1:20000)

3.9 Jelatin Zimografi

Nobiletinin TLR'lerin tümör invazyonundaki rolü üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için jelatin zimografi yöntemiyle matriks metalloproteinazların (MMP-2 ve MMP-9) miktarındaki değişimler incelenmiştir.

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatları 10mm hücre kültürü petri kaplarına 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Phenol redsiz ve serumsuz besiyeri ile değiştirilerek 24 saat ligand muamelesini takiben her hücre hattı için belirlenen doz ve sürelerde çeşitli ligand ve Nobiletin kombinasyonları uygulanmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda kültür ortamındaki besiyeri toplanarak MMP-2 (72 kDa) ve MMP-9 (92 kDa) miktarındaki değişimler incelenmiştir. Ayırıcı jel % 7,5 olacak şekilde ve paketleyici jel % 4 olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 4). İlk olarak ayırıcı jel hazırlanarak yaklaşık 45 dakika polimerleşmesi beklenmiştir. Ardından paketleyici jel hazırlanarak ayırıcı jel üzerine dökülmüştür ve yaklaşık 30 dakika polimerleşmesi beklenmiştir.

Tablo 4. Jelatin zimografi jel içeriği ve kullanılan kimyasalların oranları.

Reaktif	% 7.5 Ayırıcı Jel	% 4 Paketleyici Jel
Distile su	7.7 mL	6.10 mL
10 mg/mL Jelatin substratı	2.0 mL	-----
% 30 Akrilamid	5.0 mL	1.3 mL
1.5 M Tris-HCl, pH:8.8	5.0 mL	-----
0.5 M Tris-HCl, pH; 6.8	-----	2.5 mL
% 10'luk SDS	200 µL	100 µL
% 10'luk APS	200 µL	100 µL
TEMED	20 µL	10 µL

Hazırlanan jeller vertikal elektroforez sistemine (Bio-Rad Mini-PROTEAN) yerleştirilerek içerisine yürütme tamponu eklenmiştir. Her kuyucukta 25 µg protein olacak şekilde homojenat ve örnek 5X yükleme tamponu ile 2X indükleyici ajan karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Molekül ağırlığı markırı olarak "PageRuler plus prestained protein ladder" kullanılmıştır. Elektroforez sistemi kapatılarak 60V sabit voltajda oda sıcaklığında yaklaşık 3 saat elektroforez işlemi uygulanmıştır.

Elektroforezden sonra jeller ikişer defa 30 dakika süreyle % 2,5 Triton X-100 renatürasyon tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra jeller, 37°C'de bir gece boyunca

aktivasyon tamponunda (jel inkübasyon tamponu) inkübe edilmiştir. Ertesi gün inkübasyondan alınan jeller, boyama çözeltisi ile 2 saat boyunca boyanarak fazla boyadan arındırma amacıyla yıkama çözeltisi ile yıkama yapılmıştır. Yıkanan jeller, görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile dijital olarak görüntülenmiştir ve elde edilen görüntüler ImageJ (ImageJ 1.46r, National Institutes of Health, ABD) yazılımı ile analiz edilmiştir. Her bir bantın molekül ağırlığı, molekül ağırlığı markırı ile doğrulandıktan sonra her örnek için MMP'lere ait bant alanları ve optik dansiteleri (OD) belirlenmiştir. Substrat jelin lizis miktarı {alan (mm²) x optik dansite (OD / mm²)} formülünden hesaplanarak µg total protein başına elde edilen lizis birimi {(alan x dansite) / µg total protein} (rölatif proteinaz aktivitesi) olarak kantite edilmiştir. Gerekli solüsyonların hazırlanması Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Jelatin zimografi analizi için gerekli tamponların içeriği ve hazırlanışları.

SOLÜSYON/ TAMPON	İÇERİK	HAZIRLANIŞI
Aktivasyon tamponu (Developing/ Incubation Buffer)	50 mM Tris-HCl, pH 7.6 10 mM CaCl ₂ .2H ₂ O, 50 mM NaCl	6.06 g Tris, 1.47 g CaCl ₂ . 2,92 g NaCl, 1 L d H ₂ O içinde çözüldü (+4 °C 'de saklandı)
5X Yürütme Tamponu (Running Buffer)	125 mM Tris-HCl, pH 8.3 1.23 M Glisin % 0.5 SDS	15.1 g Tris, 94 g Glisin 5 g SDS 1 L d H ₂ O içinde çözüldü. (+4 °C'de saklandı)
Renatürasyon Çözeltisi (Triton X-100)	% 2.5'lik Triton X-100	25 mL Triton X-100 975 mL d H ₂ O
2X İndirgeyici olmayan Tampon (Non-Reducing Buffer)	1.0 mL 0.5 M Tris-HCL, pH:6.8 0.8 mL Gliserol 3.2 mL %10'luk SDS 0.2 mL % 0.2'lik Bromfenol Blue 2.8 mL d H ₂ O	Oda ısısında saklandı
% 30'luk Akrilamid Çözeltisi	29.2 g Akrilamid 0.8 g N'N'-bisakrilamid	(+4°C 'de karanlıkta saklandı)
Boyama Çözeltisi	%0.5'lik Coomassie Brilliant Blue R-250 %40 metanol %10 asetik asid	Taze hazırlandı
Yıkama Çözeltisi	%40 metanol %10 asetik asid	Taze hazırlandı

3.10 İstatistiksel Analizler

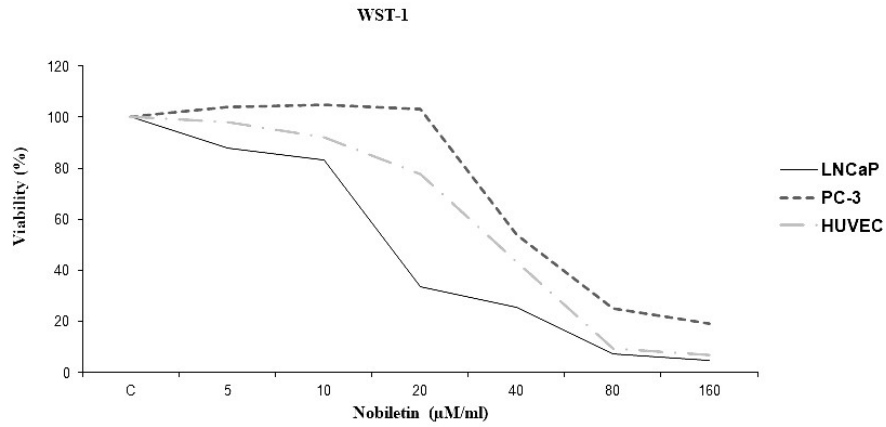
İstatistiksel analizler, ImageJ (Image Processing and Analysis in Java), SPSS version 22.0 for Windows (SPSS, Inc, Chicago, Illinois, USA) ve REST (2009 V2.0.13) software paket programları kullanılarak yapılmıştır.

Doza ve zamana bağılı olarak değişen, TLR4 ve TLR9 mRNA ifade düzeyindeki farklılıklar REST istatistik programı ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar (kontrol ve nobiletin uygulama grubu) post-hoc analizi için Duncan testini takiben tek-yönlü varyans analizi ile ölçülmüştür. ImageJ programı ile Jelatinaz Zimografi sonucunda elde edilen bantların yoğunlukları 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür. Bu veriler SPSS programında gruplar arasındaki farklılıklar karşılaştırmalı olarak T-testi kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

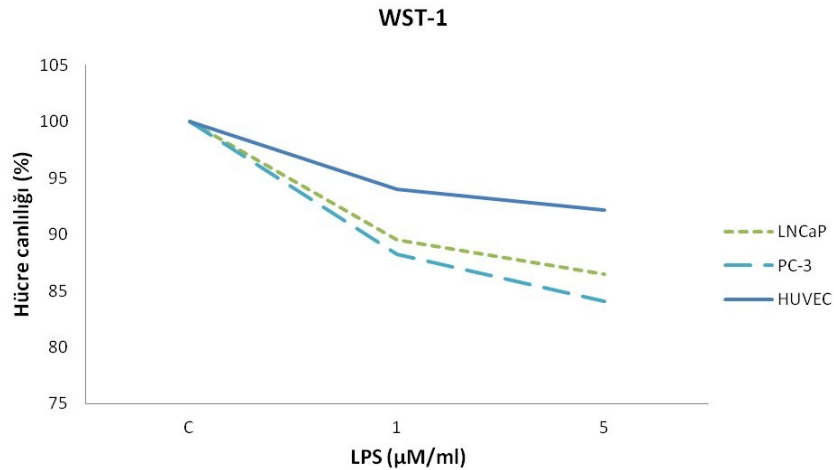
4.1 WST-1 Hücre Canlılık Analizi Bulguları

Nobiletin flavonoidinin IC₅₀ (inhibe edici konsantrasyon) değeri WST-1 (Roche Applied Science) testi ile belirlenmiştir. Bu değerler PC-3 ve HUVEC hücre hattı için 40 µM ve LNCaP hücre hattı için 20 µM olarak tespit edilmiştir (p<0.05) (Şekil 3).

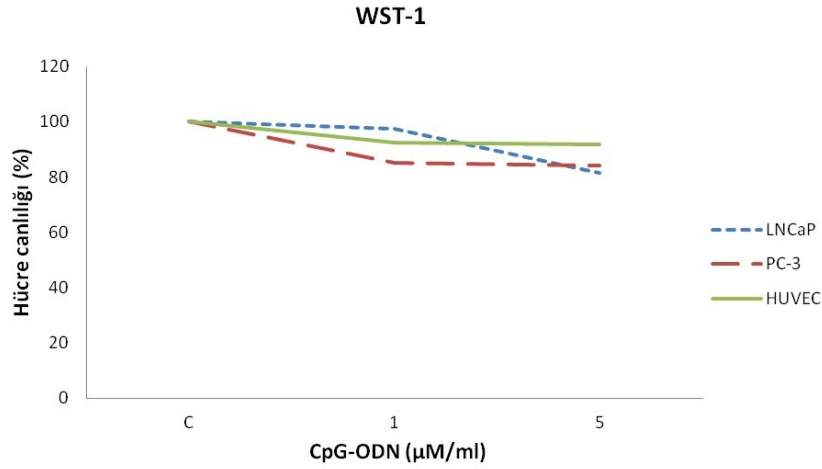


Şekil 3. LNCaP, PC-3 ve HUVEC hücre hattında Nobiletin'in hücre canlılığı üzerine etkisi.

LPS ve CpG-ODN muamelesi sonucunda 5 µM konsantrasyonun her iki ligand ve üç hücre hattı için de toksik olmadığı tespit edilmiştir (p<0.05) (Şekil 4-5). Bu değerler göz önüne alınarak belirli zaman aralıklarında (6 ve 24 saat) hücre hatlarına Nobiletin (20 ve 40 µM) ve ligand (5 µM) uygulaması sonrasında diğer moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. LNCaP, PC-3 ve HUVEC hücre hattında LPS'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 5. LNCaP, PC-3 ve HUVEC hücre hattında CpG-ODN'nin hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.2 RNA ve cDNA Analizi

TLR4 ve TLR9 reseptörünün gen ekspresyon seviyesini belirlemek için PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarına Nobiletin ve/veya ligand uygulamaları 6 ve 24 saat olmak üzere muamele edilmiştir. Muamele sonrası hücrelerden RNA izole edilerek miktarı belirlenmiştir (Tablo 6-11) ve sonrasında uygun miktar RNA alınarak cDNA'ya çevrimi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 6. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi (LPS: Lipopolisakkarit, N: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, ng: nanogram, ul: mikrolitre).

	6 Saat			24 Saat		
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
PC3						
Kontrol	321,74	2,06	1,06	399,92	2,08	1,83
LPS (+), N(+)	402,15	2,21	2,07	282,81	2,24	1,17
LPS (+), N(-)	362,72	2,05	1,31	351,42	2,29	2,14
LPS (-), N(+)	324,2	2,07	2,16	258,71	2,28	1,86

Tablo 7. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi. (LPS: Lipopolisakkarit, N: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, ng: nanogram, ul: mikrolitre).

	6 Saat			24 Saat		
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
LNCaP						
Kontrol	592,87	2,06	2,03	545,98	2,09	2
LPS (+), N(+)	404,54	2,07	1,85	420,09	2,03	1,73
LPS (+), N(-)	420,55	2,07	1,9	387,63	2,15	1,45

LPS (-), N(+)	375,1	2,05	2,23	447,98	2,08	2,13
----------------------	-------	------	------	--------	------	------

Tablo 8. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi. (LPS: Lipopolisakkarit, N: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, ng: nanogram, ul: mikrolitre).

HUVEC	6 Saat			24 Saat		
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
Kontrol	186,22	2,18	2,21	160,09	2,06	0,55
LPS (+), N(+)	133,71	2,23	0,99	135,91	2,19	1,18
LPS (+), N(-)	249,42	2,26	2,15	226,35	2,23	2,18
LPS (-), N(+)	288,55	2,06	1,21	247,64	2,04	0,75

Tablo 9. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi. (CpG-ODN: CpG oligodinükleotid, N: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, ng: nanogram, ul: mikrolitre).

PC-3	6 Saat			24 Saat		
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
KONTROL	321,74	2,06	1,06	399,92	2,08	1,83
ODN (+) N (+)	629,1	2,08	2,19	411,08	2,07	2,19
ODN (+) N (-)	348,54	2,05	0,95	334,77	2,12	1,48
ODN (-) N (+)	430,23	2,06	2,09	321,55	2,2	1,43

Tablo 10. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi. (CpG-ODN: CpG oligodinükleotid, N: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, ng: nanogram, ul: mikrolitre).

LNCaP	6 Saat			24 Saat		
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
KONTROL	592,87	2,06	2,03	545,98	2,09	2
ODN (+) N (+)	365,6	2,06	1,79	439,75	2,12	1,95
ODN (+) N (-)	369,15	2,11	2,06	462,68	2,1	2,06
ODN (-) N (+)	323,96	2,08	1,89	539,72	2,05	2,07

Tablo 11. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının RNA miktarı üzerine etkisi. (CpG-ODN: CpG oligodinükleotid, N: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, ng: nanogram, ul: mikrolitre).

HUVEC	6 Saat			24 Saat		
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
KONTROL	186,22	2,18	2,21	160,09	2,06	0,55
ODN (+) N (+)	178,34	2,39	2,19	236,1	2,28	2,02
ODN (+) N (-)	226,07	2,27	2,14	198,96	2,12	2,1
ODN (-) N (+)	226,02	2,35	2,26	159,47	2,37	2,01

4.3 qRT-PCR Analizi Bulguları

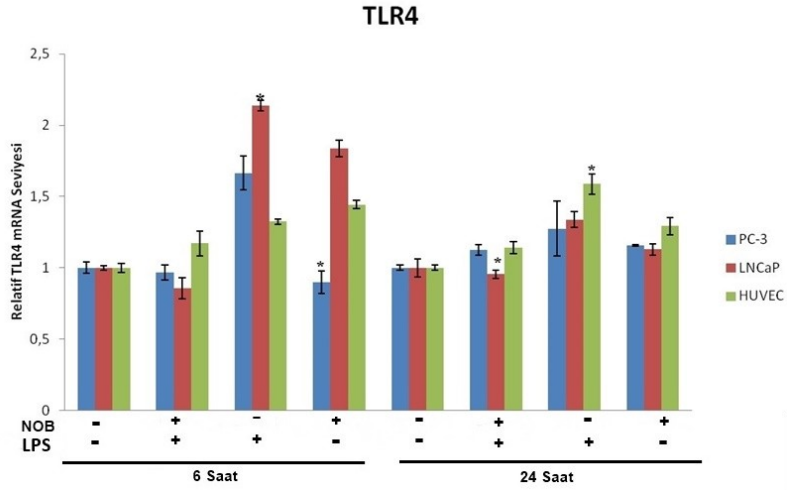
TLR3 geninin mRNA düzeyindeki değişimleri belirlemek amacıyla RNA izolasyonunun ardından sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak kantitatif-gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan gene özgül primer çiftleri Tablo 12'da gösterilmiştir.

Tablo 12. qPCR deneylerinde kullanılan gene özgül primer çiftleri.

Gen	İleri Primer	Geri Primer
TLR4	TAGCAGTCATCCAACAG AATCAT	AATCTTCTGAGTTGATTATGGGT AA
TLR9	AGTCCTCGACCTGGCAG GAA	GCGTTGGCGCTAAGGTTGA
GAPDH	CAACGGATTTGGTCGTA TTGG	GCAACAATATCCACTTTACCAGA GTAA

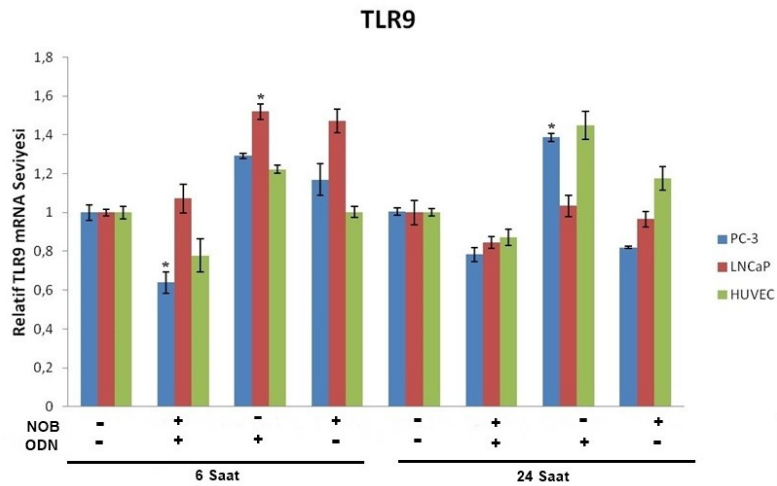
Her bir örnek üç tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Her bir örnekte hedef gen ekspresyonu referans gen (GAPDH) ekspresyonuna normalize edilmiştir. Elde edilen veriler REST (Relative Expression Software Tool) ile analiz edilerek grafikler çizilmiştir (Şekil 6-7).

PC-3 hücre hattı üzerinde Nobiletin muamelesi olmayan sadece ligand muamelesi olan uygulama grubunda TLR4 ekspresyonu artmıştır. Ligand ile birlikte Nobiletin ve sadece Nobiletin muamelesi TLR4 ekspresyonunu kontrol grubuna göre önemli oranda değiştirmemiştir ($p<0.05$) (Şekil 6). LNCaP hücre hattı üzerinde sadece ligand ve sadece Nobiletin uygulaması TLR4 ekspresyonunu ilk 6 saatte 2 kat arttırmış olmasına rağmen 24 saatlik muamele sonrası bu miktar düşmüştür. Sadece ligand uygulaması olan gruptan ilk 6 saat sonrası anlamlı bir artış elde edilmiştir ($p<0.05$). Ligand ve Nobiletin birlikte uygulaması kontrol grubuna göre ekspresyonu düşürmüştür (Şekil 6). HUVEC hücre hattında 24 saat sonunda sadece ligand uygulaması sonucu TLR4 ekspresyon seviyesinde 1,5 kat anlamlı bir artış elde edilmiştir ($p<0.05$). Her üç uygulama grubu TLR4 mRNA seviyesini kontrol grubuna göre arttırmıştır. Ancak Nobiletin ve ligand birlikte uygulandığında ekspresyondaki artış, tek başına uygulanmalarına göre daha az saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 6).



Şekil 6. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının TLR4 mRNA miktarı üzerine etkisi (*:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).

PC-3 hücre hattında Nobiletin ve ligand birlikte uygulaması kontrol grubuna göre TLR9 ekspresyonunu azaltmıştır. Sadece ligand uygulaması TLR9 ekspresyon miktarını anlamlı olarak 1,5 kat arttırmıştır ($p<0.05$) (Şekil 7). LNCaP hücre hattında ilk 6 saatlik uygulama sonrası Nobiletin ve ligandın tek başına uygulamaları TLR9 ekspresyonunu arttırırken, 24 saat sonunda ekspresyon azalmıştır. Ayrıca ligand ve Nobiletin birlikte uygulaması ekspresyonu azaltmıştır ($p<0.05$) (Şekil 7). HUVEC hücre hattında LNCaP hücre hattına benzer sonuçlar saptanmıştır. Ligand ve Nobiletin birlikte uygulaması ekspresyon azaltırken, ayrı ayrı uygulanması durumunda TLR9 ekspresyonunu 1,5 kata kadar arttırmıştır ($p<0.05$) (Şekil 7).

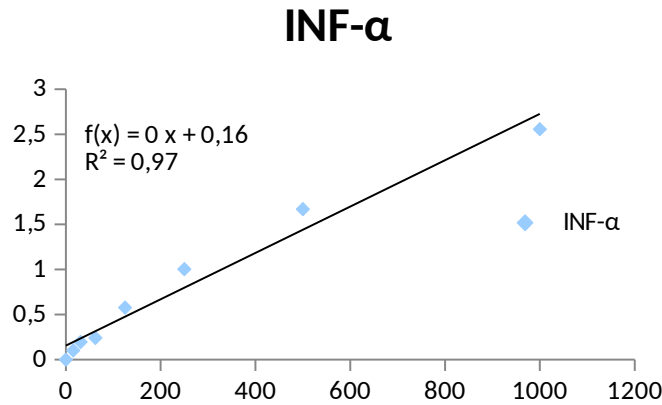


Şekil 7. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının TLR9 mRNA miktarı üzerine etkisi (*:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

$p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı, ODN: Oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).

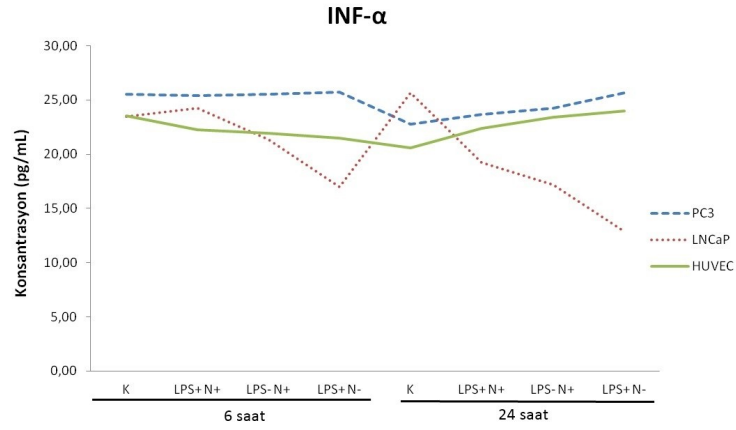
4.4 Sitokin Analizi Bulguları

İnterferon-alfa (INF- α) ve İnterferon-beta (INF- β) analizi için kullanılan kit Sandwich-ELISA metodunu temel almıştır. Analiz sonucunda Optik yoğunluk (OD) spektrofotometre ile $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ dalga boyunda ölçülmüştür. Örneklerin OD'si standart eğri (Şekil 8 ve Şekil 11) ile karşılaştırarak örneklerdeki INF- α ve INF- β konsantrasyonu hesaplanmıştır (Şekil 9-10 ve Şekil 12-13).



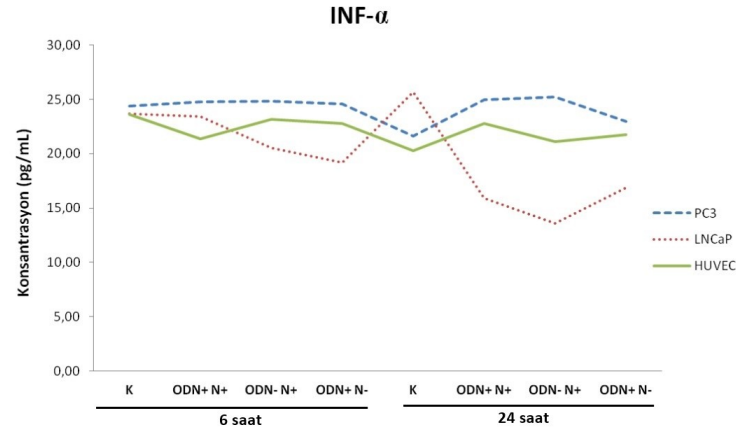
Şekil 8. INF- α miktarı hesaplanan standart eğri grafiği.

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında LPS ile uyarılan TLR4 sinyal yolağı sonunda yapımı gerçekleşen INF- α miktarına baktığımızda, PC-3 ve HUVEC hücre hattında ilk 6 saatte tüm uygulama gruplarında INF- α miktarı değişmezken, 24 saat sonunda Nobiletin ve ligand uygulaması INF- α miktarını azaltmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 9). LNCaP hücre hattında ise Nobiletin muamelesi INF- α miktarını 24 saat sonunda kontrol grubuna göre azaltmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 9).

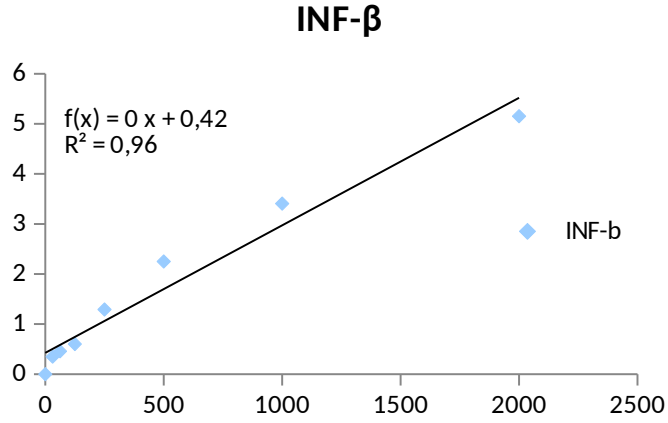


Şekil 9. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının INF- α miktarı üzerine etkisi. (LPS: Lipopolisakarit, N: Nobiletin, K: Kontrol, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında CpG-ODN ile uyarılan TLR9 sinyal yolağı sonunda yapımı gerçekleşen INF- α miktarı, PC-3 ve HUVEC hücre hattında Nobiletin muamelesi sonrası 24 saat sonunda anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p < 0.05$) (Şekil 10). LNCaP hücre hattında ise Nobiletin muamelesi INF- α miktarını 24 saat sonunda kontrol grubuna göre azaltmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 10).

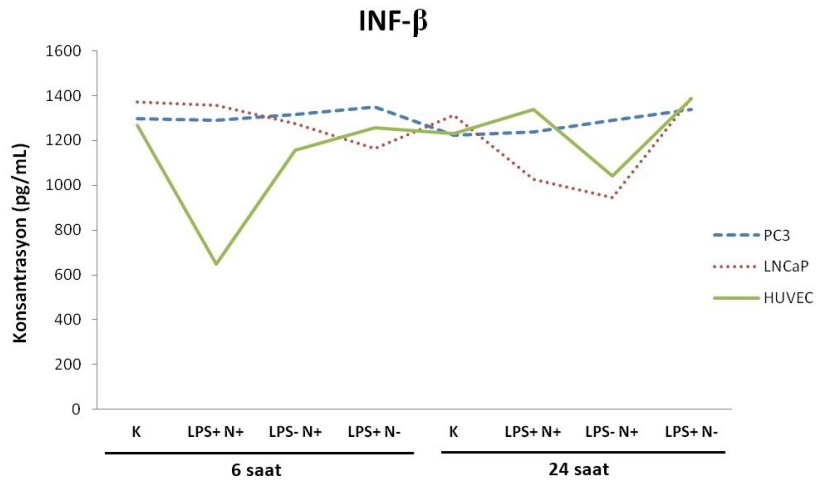


Şekil 10. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının INF- α miktarı üzerine etkisi (ODN: Oligodinükleotid, N: Nobiletin, K: Kontrol, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).



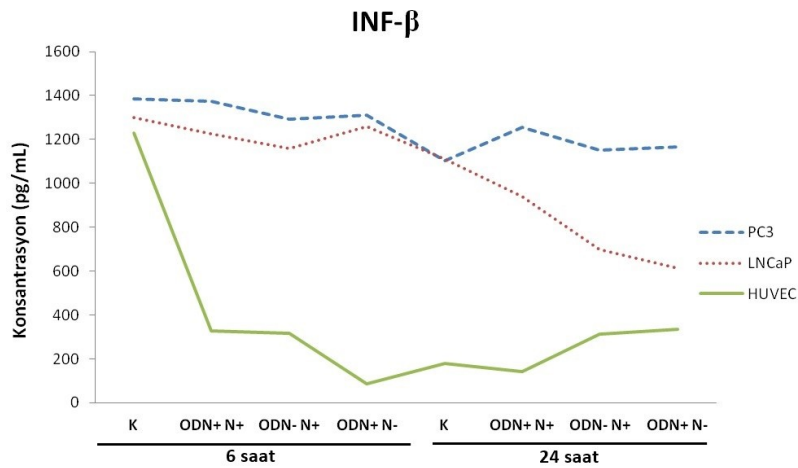
Şekil 11. INF-β miktarı hesaplanan standart eğri grafiği.

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında LPS ile uyarılan TLR4 sinyal yolağı sonunda yapımı gerçekleşen INF-β miktarı, PC-3 hücre hattında 24 saat sonunda miktarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p < 0.05$) (Şekil 12). HUVEC hücre hattında Nobiletin ve ligand birlikte uygulaması ilk 6 saatte miktarını azaltırken, 24 saat muamele sonrasında INF-β miktarı artmıştır ancak kontrol grubuna göre miktarı azalmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 12). LNCaP hücre hattında ise Nobiletin muamelesi INF-β miktarını 24 saat sonunda kontrol grubuna göre azaltmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 12).



Şekil 12. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının INF-β miktarı üzerine etkisi. (LPS: Lipopolisakkarit, N: Nobiletin, K: Kontrol, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında CpG-ODN ile uyarılan TLR9 sinyal yolağı sonunda yapımı gerçekleşen INF- β miktarı, PC-3 hücre hattında 24 saat sonunda Nobiletin ve ligand birlikte uygulanması ile kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 12). HUVEC hücre hattında Nobiletin muamelesi ile INF- β miktrında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ve ancak ligand uygulaması ile miktarı artmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 12). LNCaP hücre hattında ise Nobiletin muamelesi INF- β miktarını 24 saat sonunda kontrol grubuna göre azaltmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 12).



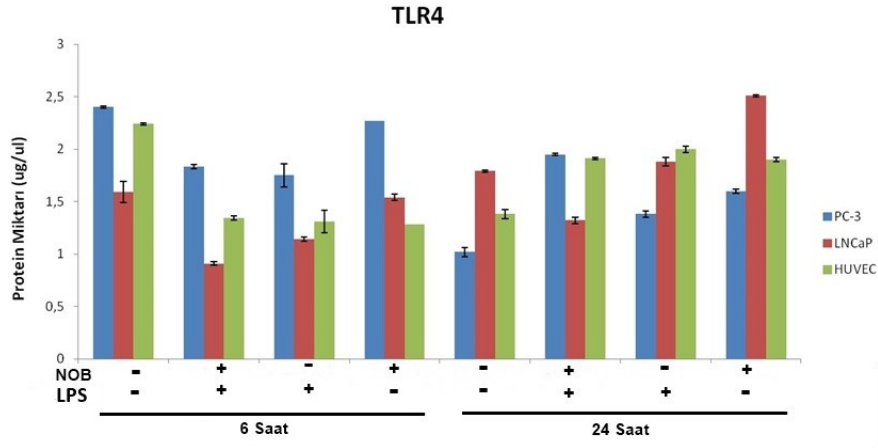
Şekil 13. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının INF- β miktarı üzerine etkisi (CpG-ODN: CpG oligodinükleotid, N: Nobiletin, K: Kontrol, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).

4.5 Protein Analizi Bulguları

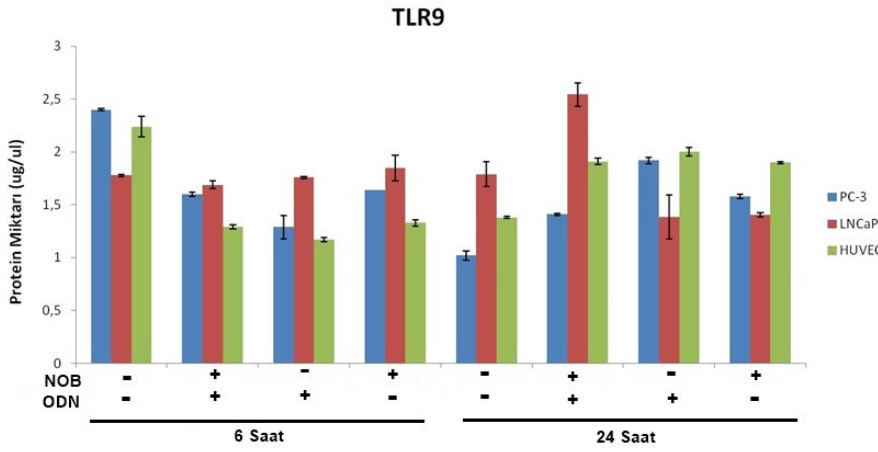
Protein seviyelerinde meydana gelen değişimleri karşılaştırabilmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve sonrasında da Western blotting uygulamaları yapılmıştır.

4.5.1 Protein Miktar Tayini Bulguları

PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarına Nobiletin ve/veya ligand uygulamaları 6 ve 24 saat olmak üzere muamele sonrası hücrelerden total protein izole edilerek miktarı belirlenmiştir (Şekil 14-15) ve sonrasında uygun miktar (20 μ g) protein alınarak SDS-PAGE ve western blot deneyleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 14. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının TLR9 total protein miktarı üzerine etkisi (LPS: Lipopolisakkarit, NOB: Nobiletin, ug: mikrogram, ul: mikrolitre, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).



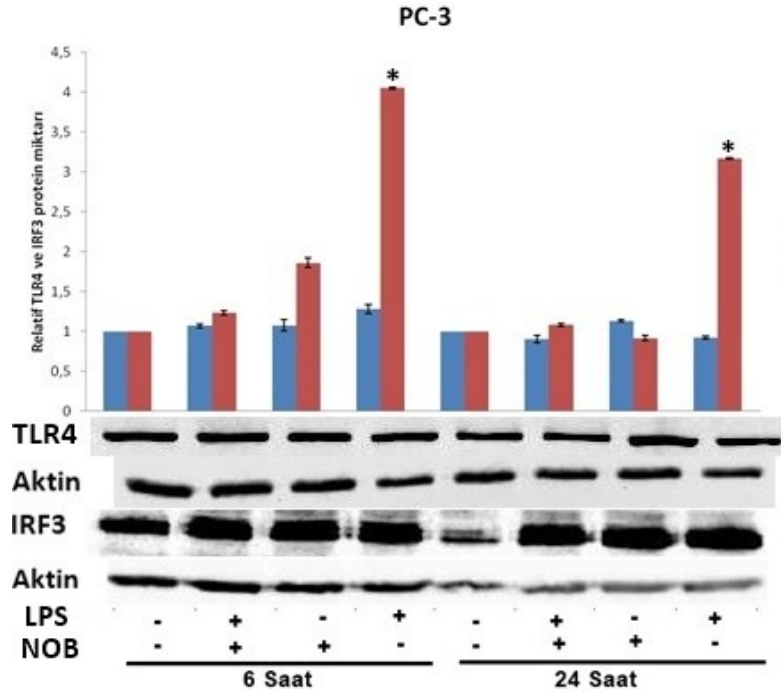
Şekil 15. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya CpG-ODN uygulamalarının TLR9 total protein miktarı üzerine etkisi (ODN: Oligodinükleotid, NOB: Nobiletin, ug: mikrogram, ul: mikrolitre, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).

4.5.2 Western Blotlama Bulguları

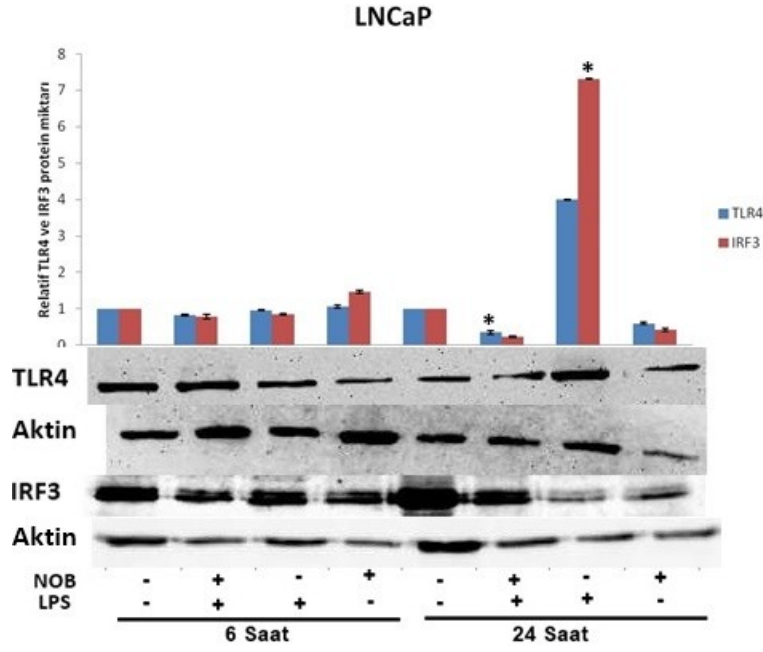
PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarına TLR4, TLR9, IRF3 ve IRF7 proteinlerinin miktarını belirlemek için Nobiletin ve/veya ligand uygulamaları 6 ve 24 saat olmak üzere gerçekleştirilmiştir. TLR4 reseptörünün uyarılmasıyla başlayan sinyal yolağında en son basamakta görev alan IRF3 ve TLR9 reseptörünün uyarılmasıyla başlayan sinyal yolağında en son basamakta görev alan IRF7 protein miktarı birlikte değerlendirilmiştir.

TLR4 sinyal yolağında Nobiletin ve/veya ligand uygulamalarına baktığımızda, PC-3 hücre hattında LPS ile Nobiletin birlikte uygulandığında TLR4 ve IRF3 protein miktarı kontrol

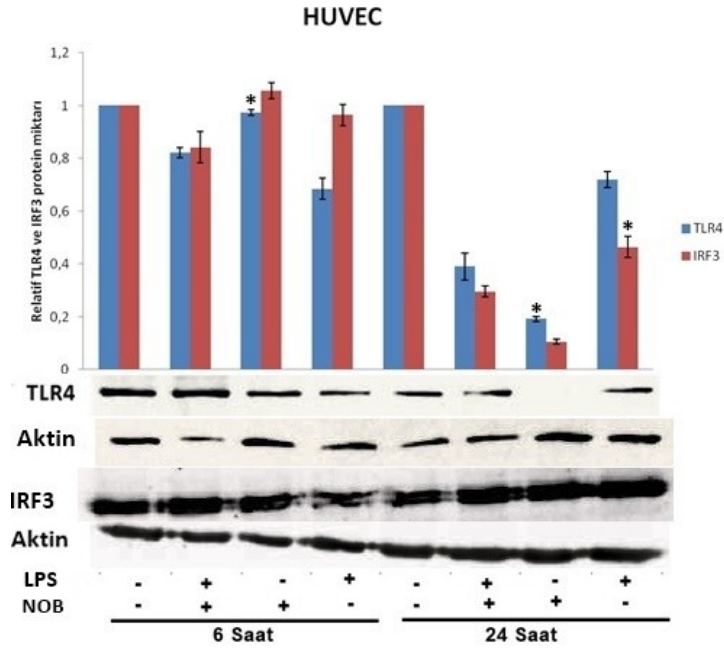
grubuna göre artış göstermezken, yalnız TLR4 proteini Nobiletin olmayan uygulama grubunda artış göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 16). LNCaP ve HUVEC hücre hattında Nobiletin olan uygulama gruplarında TLR4 ve IRF3 protein miktarları kontrol grubuna göre azalırken, 24 saat sonunda Nobiletin olmayan uygulama grubunda TLR4 ve IRF3 protein miktarları LNCaP hücre hattında kontrol grubundan daha fazla artarken, HUVEC hücre hattında bu artış kontrol grubundan daha azdır ($p<0.05$) (Şekil 17-18).



Şekil 16. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulaması sonrası TLR4 ve IRF3 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı).

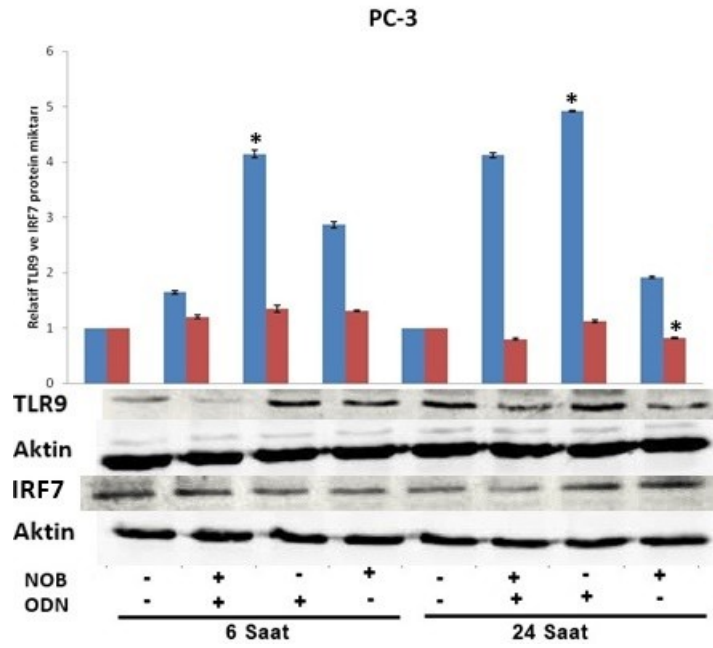


Şekil 17. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulaması sonrası TLR4 ve IRF3 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı).

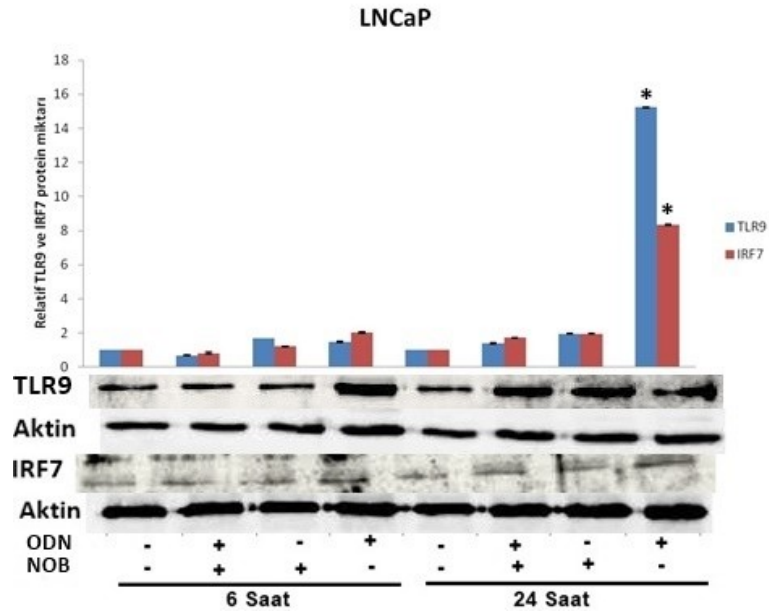


Şekil 18. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulaması sonrası TLR4 ve IRF3 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı).

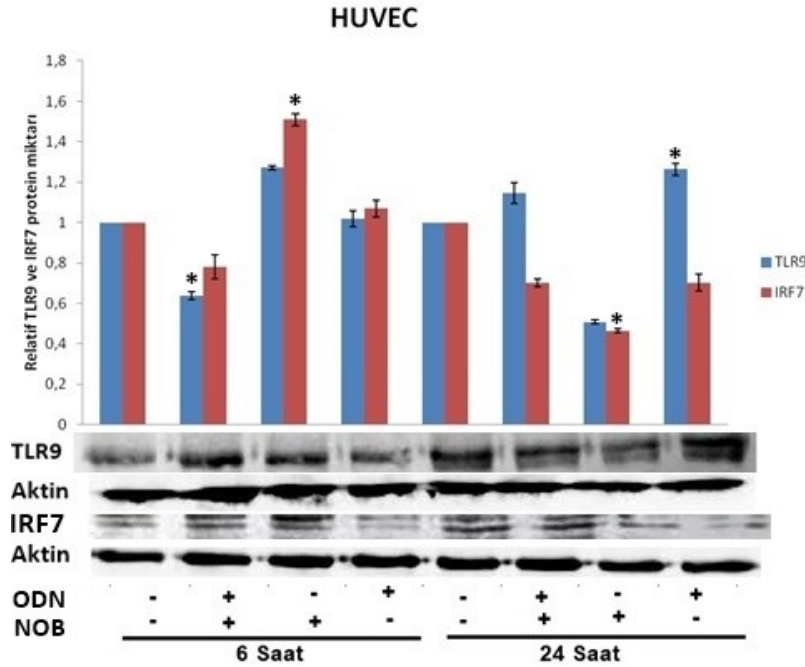
TLR9 sinyal yolağında Nobiletin ve/veya ligand uygulamalarına baktığımızda, PC-3 hücre hattında TLR9 proteini ligand olan gruplarda kontrol grubuna göre artış göstermiştir ve ligand yokluğunda sadece Nobiletin muamelesi TLR9 protein miktarını düşürmüştür ancak IRF7 protein miktarında bir değişiklik olmamıştır ($p<0.05$) (Şekil 19). LNCaP hücre hattında 24 saatlik muamele sonrasında TLR9 ve IRF7 miktarı sadece ligand uygulaması olan grupta kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 20). HUVEC hücre hattında ise, sadece Nobiletin muamelesi TLR9 ve IRF7 miktarını 24 saat sonunda azaltmıştır ($p<0.05$) (Şekil 21).



Şekil 19. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulaması sonrası TLR9 ve IRF7 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı).



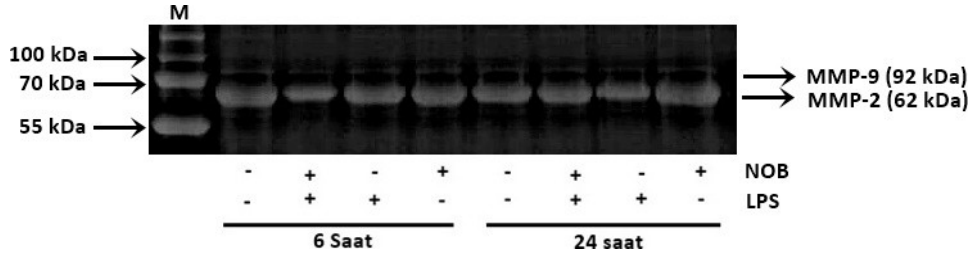
Şekil 20. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulaması sonrası TLR9 ve IRF7 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı).



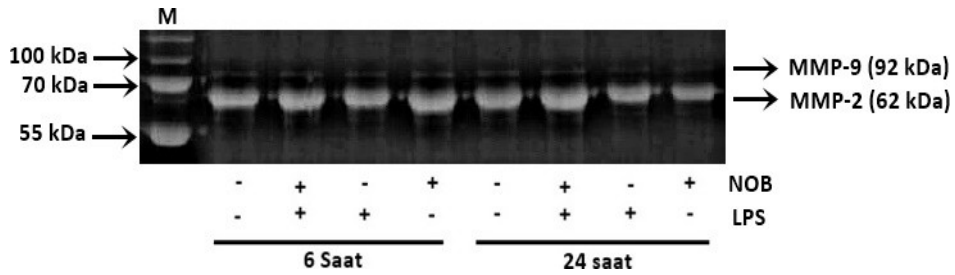
Şekil 21. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulaması sonrası TLR9 ve IRF7 relatif protein düzeyleri ve western blot görüntüleri (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklı).

4.6 Jelatin Zimografi Bulguları

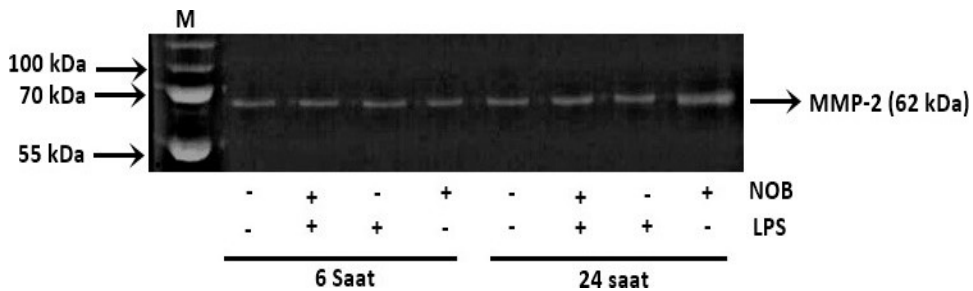
PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarına Nobiletin ve/veya ligand 6 ve 24 saat olmak üzere muamele edilmiş ve sonrasında hücrelerin kültür üst sıvısından jelatin zimografi yöntemiyle matriks metalloproteinazların (MMP-2 ve MMP-9) jel görüntüleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 22-27) ve miktarı belirlenmiştir (Şekil 28-31).



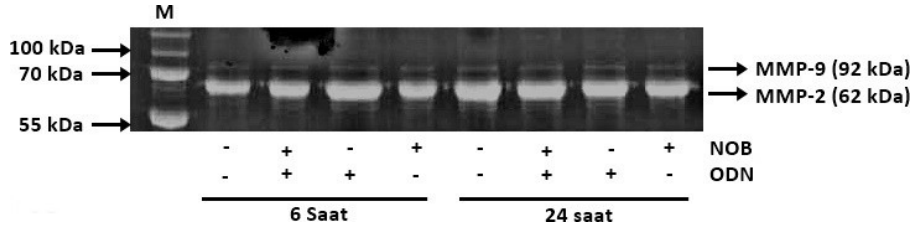
Şekil 22. PC-3 hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi (M: Marker, NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, kDa; kilodalton).



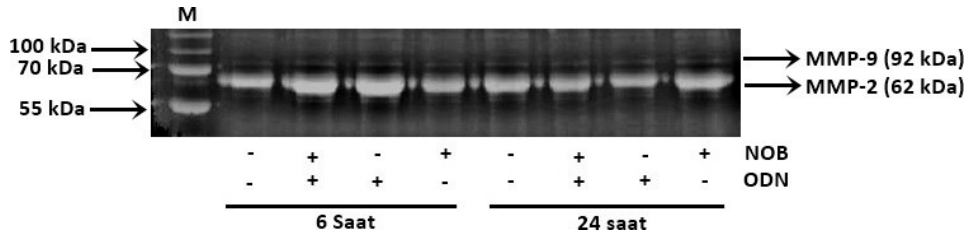
Şekil 23. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi (M: Marker, NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, kDa; kilodalton).



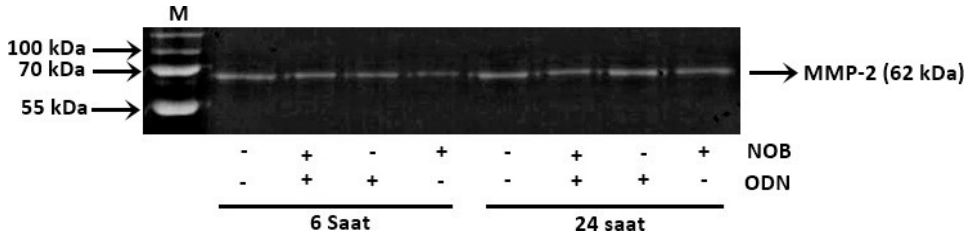
Şekil 24. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi (M: Marker, NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit (+): uygulama var, (-): uygulama yok, kDa; kilodalton).



Şekil 25. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi (M: Marker, NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, kDa; kilodalton).

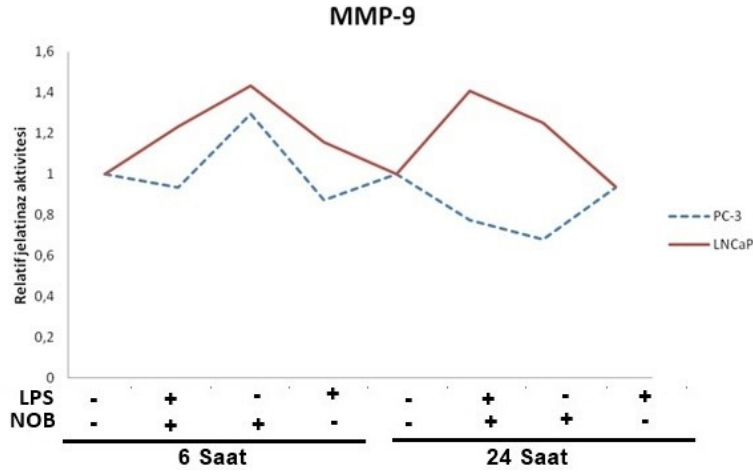


Şekil 26. LNCaP hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi (M: Marker, NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, kDa; kilodalton).

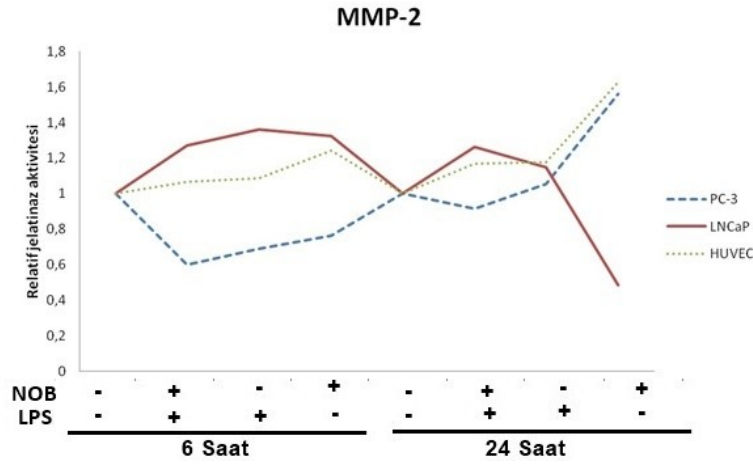


Şekil 27. HUVEC hücre hattında Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının jelatinaz (MMP-2) ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi (M: Marker, NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok, kDa; kilodalton).

PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında Nobiletin ve/veya LPS uygulaması sonrası MMP-9 aktivitesi gözlenirken, HUVEC hücre hattında MMP-9 aktivitesine rastlanmamıştır ($p<0.05$) (Şekil 28). PC-3 ve LNCaP hücre hattında Nobiletinin tek başına muamelesi 24 saat sonunda MMP-9 aktivitesini azaltmıştır ($p<0.05$) (Şekil 28). MMP-2 aktivitesi ise Nobiletinin tek başına muamelesi sonrasında LNCP hücre hattında 24 saat sonunda azalırken, PC-3 ve HUVEC hücre hattında artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 29).

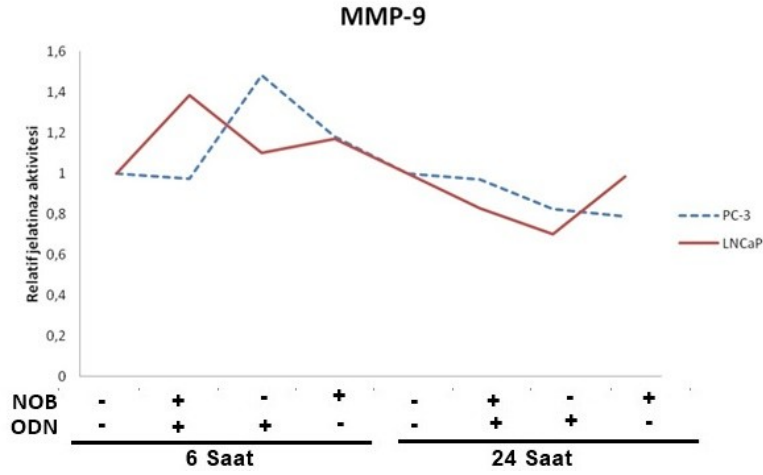


Şekil 28. PC-3 ve LNCaP hücrelerinde Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının MMP-9 enzim aktivitesi üzerine relatif etkisi (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).

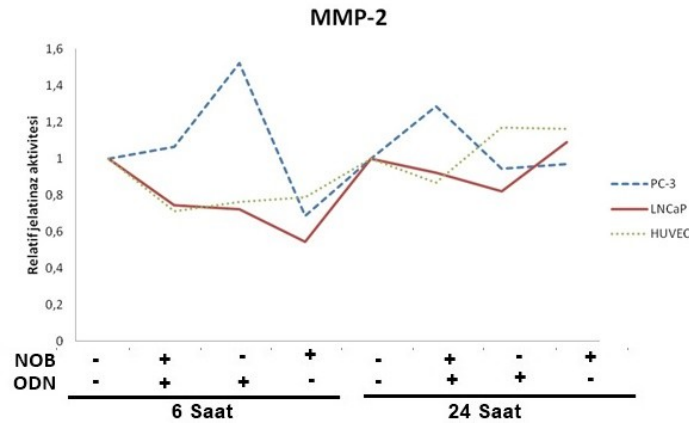


Şekil 29. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerinde Nobiletin ve/veya LPS uygulamalarının MMP-2 enzim aktivitesi üzerine relatif etkisi (NOB: Nobiletin, LPS: Lipopolisakkarit, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).

PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında Nobiletin ve/veya ODN uygulaması sonrası MMP-9 aktivitesi gözlenirken, HUVEC hücre hattında MMP-9 aktivitesine rastlanmamıştır ($p<0.05$) (Şekil 30). PC-3 ve LNCaP hücre hattında Nobiletinin tek başına muamelesi 24 saat sonunda MMP-9 aktivitesini azaltmıştır ($p<0.05$) (Şekil 30). MMP-2 aktivitesi ise Nobiletinin tek başına muamelesi sonrasında LNCP, PC-3 ve HUVEC hücre hattında artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 29).



Şekil 30. PC-3 ve LNCaP hücrelerinde Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının MMP-9 enzim aktivitesi üzerine relatif etkisi (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).



Şekil 31. PC-3, LNCaP ve HUVEC hücrelerinde Nobiletin ve/veya ODN uygulamalarının MMP-2 enzim aktivitesi üzerine relatif etkisi (NOB: Nobiletin, ODN: Oligodinükleotid, (+): uygulama var, (-): uygulama yok).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda insan prostat kanseri hücreleri olan PC-3 ve LNCaP hücre kültüründe LPS VE CpG-ODN indüksiyonu ve antikanser, antiviral ve anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olan turunçgillerden bir polimetoksi flavanoid olan Nobiletin'in TLR4 ve TLR9 sinyalizasyonundaki rolü ve bu sinyal yolları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Nobiletin flavonoidinin prostat kanserinde immünoregülatör rolünün belirlenmesine yönelik olarak özellikle TLR4'ün başlattığı sinyal ile hem tümör büyümesine hem de tümör inhibisyonuna katkı sağlandığı gibi bir ikili görüş mevcuttur. Ayrıca Nobiletin flavonoidinin TLR9 aracılı sinyalin prostat kanserinde önemli olan metastazda rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çalışmayla birlikte TLR4 ve TLR9 aracılı başlayan sinyal üzerine immünoterapötik bir molekül olma potansiyeli olan Nobiletin flavonoidinin hücre proliferasyonu, TLR4 ve TLR9 gen ekspresyonu, sinyal yolağının aktifliği, TLR4 ve TLR9 sinyal yolu proteinleri (TLR4, TLR9, IRF3 ve IRF7) ve TLR4 ve TLR9 sinyalinin MMP'ler (MMP-2 ve MMP-9) üzerine etkisi araştırılmıştır.

TLR'ler kanseri de içine alan pek çok organda kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (El-Omar vd., 2008). Yapılan son çalışmalar prostat kanserini de içine alan insan tümörlerinde TLR'lerin eksprese edildiğini rapor etmekle beraber, fonksiyonel rolleri ile ilgili karşıt görüşler öne sürmektedir (Droemann vd., 2005, Xie vd., 2009, Schmausser vd., 2005). Enfeksiyon ya da yaralanmaya bağlı inflamasyonun tümörögenezi desteklediğini, bir yandan da apoptozisi indükleyip tümör gelişimini baskıladığı rapor edilmiştir (Colotta vd., 2009). Tüm analizlerde TLR4 ve TLR9 sinyal yolu sadece ligandları (LPS ve ODN) ile muamele edilen hücre hattı uygulama grupları oluşturulmuştur. Böyle bir rol üzerinde yine antitümoral etkisi bilinen Nobiletin'in nasıl bir etkisi olduğunu anlayabilmek için ligand muamelesi ile birlikte Nobiletin muamelesi de yapılmıştır. Ayrıca ligand muamelesi yapılmadan sadece Nobiletin muamelesi uygulanarak antitümoral etki üzerinde Nobiletin'in rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

TLR'ler sadece doğal immün sistem hücrelerinde değil; kanser hücrelerini de içine alan immün olmayan hücrelerde de eksprese edilmektedir (Paone vd., 2008). TLR4 ve TLR9'un LNCaP ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında ekspresyonu ve TLR4 ve TLR9'un, tümör büyümesini durdurduğu ayrıca TLR4'ün tümör büyümesine katkı sağladığı gibi ikili rolü bildirilmiştir (Zhao vd., 2014). Çalışmamızda TLR4 ve TLR9 reseptör ekspresyonu üzerinde Nobiletin'in etkisi araştırılmış ve bu genlerin ekspresyonu ile tümör agresivitesinin klinik parametreleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. TLR4 ve TLR9 reseptörünün ekspresyonları PC-3 ve LNCaP hücrelerinde Nobiletin muamelesiyle birlikte azalmasının yanında HUVEC hücrelerinde ekspresyonun artması Nobiletinin kanser hücreleri üzerinde gen ekspresyonunu baskılayıcı bir etki gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır. Bu durum bize TLR'leri hedef

olarak kullanan terapötik müdahalelerin çoğaltılması gerektiği, gen düzeyinde meydana gelen bu etkinin farklı durumlardan kaynaklanabileceği fikrine açıklık getirmek için daha ileri araştırmaların yapılması gerektiği sonucunu ortaya koymuştur.

TLR'lerin uyarılması inflamatuvar sitokinlerin yapımıyla sonuçlanan NF- κ B, MAPK'lar, Jun N-terminal kinazlar (JNKs), p38, ERK ve interferon düzenleyici faktörler (IRF3, IRF5, and IRF7) sinyal yollarının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Lee ve Kim, 2007). LNCaP hücre hattında aktive olan TLR4 sinyal yolağı sonunda yapımı gerçekleşen INF- α ve INF- β miktarının Nobiletin muamelesiyle azalmasının yanı sıra PC-3 hücre hattında miktarı değişmezken, HUVEC hücre hattında bu sitokinlerin miktarı artmıştır. Ayrıca TLR9 sinyal yolağı incelendiğinde PC-3 hücre hattında bu sitokinlerin miktarı Nobiletin muamelesiyle artmıştır. Bu durum bize aktive olan TLR4 sinyal yolağı üzerinde AR-bağımlı LNCaP hücre hattının Nobiletine daha duyarlı olduğunu ve Nobiletin'in sinyal yolağını baskıladığını göstermiştir. AR-bağımsız olan PC-3 hücre hattında ve HUVEC hücre hattında, Nobiletin'in bu baskılayıcı etkisinin olmaması, Nobiletin'in prostat kanseri üzerindeki etkisinin AR ile bağlantılı olabileceğini ortaya koymaktadır.

TLR4 bakteriyel lipopolisakkaritleri (LPS), TLR9 DNA'daki metillenmemiş CpG'leri (CpG-ODN) tanımaktadır (Poltorak vd., 1998). Ligandı ile aktifleşen reseptör bir dizi proteinin aşağı yönlü aktifleşmesiyle gerçekleşen sinyal iletimini başlatır ve bu yolak mitojen-aktiviteli protein kinazların (MAPKs), nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ve TLR4 sinyal yolağı için interferon düzenleyici faktör-3 (IRF3)'ün, TLR9 sinyal yolağı için interferon düzenleyici faktör-7 (IRF7) aktive olmasıyla sonuçlanır (Kawai vd. 2006). Bu nedenle TLR4 ve TLR9'un başlattığı sinyal yollarında IRF3 ve IRF9 proteininin ve reseptör proteinlerin (TLR4 ve TLR9) miktarı analiz edilerek Nobiletin uygulamaları sonrası sinyal yollarının aktif olup olmadığı ve Nobiletinin bu yollar üzerine etkisi belirlenmiştir. TLR4 reseptörü ile başlayan sinyal yolağında, PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında TLR4 ve IRF3 proteini miktarının Nobiletin yokluğunda artarak Nobiletin varlığında artmaması, Nobiletinin sinyal yolağı üzerinde baskılayıcı bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca kontrol hücre hattında Nobiletinin TLR4 ve IRF3 miktarını azaltırken, Nobiletin yokluğunda bu proteinlerin miktarının kontrol grubuna göre değişmemesi, Nobiletinin sinyal yolağını baskıladığını kanıtlamaktadır. TLR9 reseptörü ile başlayan sinyal yolağında, PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında TLR9 ve IRF7 proteini miktarının Nobiletin yokluğunda artarak Nobiletin varlığında artmaması, Nobiletinin sinyal yolağı üzerinde baskılayıcı bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca kontrol hücre hattında Nobiletinin TLR9 ve IRF7 miktarını azaltırken, Nobiletin yokluğunda bu proteinlerin miktarının kontrol grubuna göre değişmemesi, Nobiletinin sinyal yolağını baskıladığını kanıtlamaktadır. TLR4 ve TLR9 sinyal yolları üzerinde Nobiletinin benzer etkisinin görülmesi ve kanser hücrelerinde baskılayıcı bir etki göstermesi, bu flavonoidin

antitümoral bir etkiye sahip olabileceği fikrini desteklemektedir. Ayrıca diğer TLR sinyal iletim yolları için de Nobiletin flavonoidinin etkilerinin incelenmesi gerektiğini göz önüne sermektedir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) elastin, kollajen ve proteoglikanlar gibi ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerini yıkıma uğratan, 24 farklı endopeptidazdan oluşan bir enzim ailesidir (Nagase vd. 1999, Reel, 2006). Jelatinaz A (MMP-2) latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa molekül ağırlığındadır (Sethi vd., 2000). MMP-2 ekspresyonunun kolon (Sundov vd., 2008), pankreas (Evans vd., 1997), meme (Talvensaari vd. 1998), over (Perigny vd. 2008), prostat (Trudel vd. 2008) ve akciğer (Leinonen vd., 2008) tümör dokusunda arttığı saptanmış ve söz konusu MMP kötü prognoz faktörü olarak değerlendirilmiştir. Jelatinaz B (MMP-9) ise latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa molekül ağırlığındadır (Evans vd., 1997). Prostat kanserli dokularda inflamasyon sürecinde rol oynayan enzimlerin rolüyle ilgili bir çalışmada, bu dokulardan izole edilen proteinlerde MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonlarının belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (Konig vd., 2004). Çalışmamızda da benzer şekilde kontrol hücre hattına göre jelatinaz aktivitesinin özellikle MMP-2 aktivitesinin prostat kanseri hücre hatlarında çok fazla olduğu gözlenmiştir. 2001'de Dong ve arkadaşları özellikle MMP-2 (jelatinaz-A) ve MMP-9 (jelatinaz-B)'un prostat kanserinde ekspresyon düzeyinin arttığını belirtmiştir (Dong vd., 2001). Metastaz yapma kapasitesi olan invaziv yapıdaki prostat kanser hücrelerinin de yine yakınlarındaki stromal hücreler ile etkileşim içinde çalışarak birlikte ürettikleri MMP'ler aracılığıyla ekstraselüler matriksin yıkımından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Dong vd., 2001). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre; TLR4 ve TLR9 sinyal yolağı uyarılmış hücrelerde MMP-2 miktarı üzerine Nobiletin uygulaması zamana bağlı olarak jelatinaz aktivitesini PC-3 ve HUVEC hücre hattında arttırmış ancak LNCaP hücre hattında azaltmıştır. Bu durum bize aktive olan TLR4 ve TLR9 sinyal yollarında Nobiletinin de MMP-2 miktarını arttırmada metastatik bir faktör olarak davrandığını göstermiştir. Ayrıca kontrol hücre hattı ile birlikte AR duyarlı olan PC-3 hücre hattı ve HUVEC hücre hattında bu modülatör etkinin artıp, AR duyarlı olan LNCaP hücrelerinde azalma yönlü bir etkisinin olması, AR duyarlılığının MMP-2 aktivitesi üzerine rol oynadığını göstermiştir. MMP-9 aktivitesi için ise, Nobiletin muamelesi ile jelatinaz aktivitesinin baskılanarak kanser hücrelerinin metastatik karakterini azaltabileceği gözlenmiştir. Kontrol hücre hattında MMP-9 aktivitesinin gözlenmemesi, Nobiletinin kanser hücre hattında kullanıldığında anti-metastatik bir modülatör olabileceği ihtimalinin olduğu yargısına ulaşılmıştır. Kanser hücre hatlarında farklı sonuçlar elde etmemiz daha ileri analizler yaparak AR-duyarlılığı, Nobiletin ve metastaz arasındaki ilişkinin araştırılması gerektiği sonucuna varmamıza neden olmuştur.

Sonuç olarak, Nobiletinin anti-tümoral ve anti-metastatik etkisinin varlığı hem TLR4 hem TLR9 sinyal iletim yolu için gösterilmiştir. Prostat kanseri hücre hatlarından AR-duyarlı LNCaP hücre hattının Nobiletine karşı daha duyarlı olması, AR-duyarlılığının prostat kanserinde teröpatik moleküllere karşı yanıtta önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu bulgulara ek olarak Nobiletinin reseptör gen ekspresyonlarını baskılaması bu flavonoidin terapötik molekül olarak gen düzeyinde etkili olduğunu göstermiştir. Kontrol hücre hattında ise Nobiletinin böyle bir etkisinin gözlenmemesi kanser hücre hatlarında bu yolağın aktivitesinin duyarlılığının fazla olduğunu ve daha kolay manupule edilebileceği fikrini öne sürmektedir. Ancak Nobiletinin TLR4 ve TLR9 sinyal yolları üzerindeki bu etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar hala belirsizdir. Nobiletinin bu projede belirlenen anti-tümoral, anti-metastatik ve gen düzeyindeki baskılayıcı etkilerinin altında yatan mekanizmaların neler olduğunun belirlenmesi için daha ileri moleküler teknikler kullanılarak yeni projelerin geliştirilmesi gerekliliği bu araştırmanın sonuçları olarak öne çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

Alexopoulou, L., Holt A. C., Medzhitov R., Flavell R. A. 2001. "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by toll-like receptor 3", *Nature*, 413, (6857), 732–8.

Aliprantis, A. O., Yang R. B., Mark M. R., Suggett S., Devaux B., Radolf J. D., Klimpel G. R., Godowski P., Zychlinsky A. 1999. "Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2", *Science*, 285, (5428), 736–9.

Bernini, R., Crisante F., Ginnasi M. C. 2011. "A convenient and safe O-methylation of flavonoids with dimethyl carbonate (DMC)", *Molecules*, 16, 1418-1425.

Bosland, M. C. 2000. "The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis", *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 27, 39–66.

Colotta, F., P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, and A. Mantovani. 2009. "Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability", *Carcinogenesis*, 30, 1073–1081.

Coussens, L. M., Werb Z. 2002. "Inflammation and cancer", *Nature*, 420, (6917), 860–867.

Crawford, E. 2003. "Epidemiology of prostate cancer", *Urology*, 62, 3–12.

Dennis, L. K., Dawson D. V. 2002. "Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer", *Epidemiology*, 13, (1), 72-79.

Dennis, L. K., Lynch C. F., Torner J. C. 2002. "Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer", *Urology*, 60, (1), 78-83.

De Marzo, A. M., Marchi V. L., Epstein J. I., Nelson W. G. 1999. "Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis", *American Journal of Pathology*, 155, (6), 1985–1992.

Di, J. M., Pang J., Sun Q. P., Zhang Y., Fang Y. Q., Liu X. P., Zhou J. H., Ruan X. X., Gao X. 2010. "Toll-like receptor 9 agonists up-regulates the expression of cyclooxygenase-2 via activation of NF-kappaB in prostate cancer cells", *Molecular Biology Reports*, 37, (4), 1849-55.

Droemann, D., D. Albrecht, J. Gerdes, A. J. Ulmer, D. Branscheid, E. Vollmer, K. Dalhoff, P. Zabel, and T. Goldmann. 2005. "Human lung cancer cells Express functionally active Toll-like receptor 9", *Respiratory Research*, 4, 6, 1.

Dong, Z., Nemeth, J. A., Cher, M. L., Palmer, K. C., Bright, R.C., Fridman, R. 2001. "Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells", *International Journal of Cancer*, 93, 507-515.

El-Omar, E. M., M. T. Ng, and G. L. Hold. 2008. "Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer", *Oncogene*, 27, 244–252.

Evans, J. D., Ghaneh, P., Kawesha, A., Neoptolemos, J. P. 1997. "Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer", *Digestion*, 58, 520-528.

Fernández, L., Galán Y., Jiménez R., Gutiérrez A., Guerra M., Pereda C., Alonso C., Riboli E., Agudo A., González C. 2005. "Sexual behaviour, history of sexually transmitted diseases, and the risk of prostate cancer: a case-control study in Cuba", *International Journal of Epidemiology*, 34, (1), 193–197.

Gates, M., Vitonis A., Tworoger S., Rosner B., Titus-Ernstoff L., Hankinson S., Cramer H. 2009. "Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population based case-control study", *International Journal of Cancer*, 124, 1918-1925.

Gatti, G., Quintar A. A., Andreani V., Nicola J. P., Maldonado C. A., Masini-Repiso A. M., Rivero V. E., Maccioni M. 2009. "Expression of Toll-like receptor 4 in the prostate gland and its association with the severity of prostate cancer", *Prostate*, 69, (13), 1387-97.

Gronberg, H. 2003. "Prostate cancer epidemiology", *Lancet*, 361, 859–864.

Gupta, S., Kim J. , Prasad S., Aggarwal B. 2010. "Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals", *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 405–434.

Hayashi, F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A. 2001. "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5", *Nature*, 410, (6832), 1099-103.

Heil, F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S. 2004. "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8", *Science*, 303, (5663), 1526-9.

Hemmi, H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. I. 2000. "A toll-like receptor recognizes bacterial DNA", *Nature*, 408, (6813), 740–5.

Hua, D., Liu M.Y., Cheng Z. D., Qin X. J., Zhang H. M., Chen Y. Qinc G., Liang G., Li J. N., Hane X. F., Liu D. X. 2009. "Small interfering RNA-directed targeting of toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival and tumorigenicity", *Molecular Immunology*, 46, (15), 2876–84.

Ilvesaro, J. M., Merrell M. A., Swain T. M., Davidson J., Zayzafoon M., Harris K. W., Selander K. S. 2007. "Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro", *Prostate*, 67, (7), 774-81.

Iwasaki A., Medzhitov R. 2004. "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses", *Nature Immunology*, 5, (10), 987–95.

Kawai T, Akira S. 2006. "Innate immune recognition of viral infection", *Nature Immunology*, 7, (2), 131-137.

Knekt, P., Järvinen R., Seppänen R., Heliövaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A. 1997. "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms", *American Journal Epidemiology*, 146, 223–230.

Konig, J. E., Senge, T., Allhoff, E.P., Konig, W.. 2004. "Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer", *Prostate*, 58, 121-129.

Kunimasa, K., Ikekita M., Sato M., Ohta T., Yamori Y., Ikeda M., Kuranuki S., Oikawa T. 2010. "Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo", *Cancer Science*, 101, 2462-2469.

Lee, M. S., Kim Y. J. 2007. "Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk", *Annual Review of Biochemistry*, 76, 447-80.

Leinonen, T., Pirinen, R., Bohm, J., Johansson, R., Kosma, V. M. 2008. "Increased expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer", *Histology and Histopathology*, 23, 693-700.

Li, S., Yu H., Ho C. T. 2006. "Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract", *Biomed Chromatography*, 20, 133-138.

Maggio, M., Blackford A., Taub D., Carducci M., Ble A., Metter E. J., Braga-Basaria M., Dobs A., Basaria S. 2006. "Circulating inflammatory cytokine expression in men with prostate cancer undergoing androgen deprivation therapy", *Journal of Andrology*, 27, (6), 725-728.

McCann, S., Freudenheim J., Marshall J., Saxon G. 2003. "Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups", *Journal of Nutrition*, 133, 1937-1942.

Meiyanto, E., Hermawan A., Anindyajati 2012. "Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents", *Asian Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 427-436.

Mishina, T., Watanabe H., Araki H., Nakao M. 1985. "Epidemiological study of prostatic cancer by matched-pair analysis", *Prostate*, 6, (4), 423-436.

Mohile, S. G., Shelke A. R. 2011. "Treating prostate cancer in elderly men: how does aging affect the outcome?", *Current Treatment Options in Oncology*, 12, 263–275.

Murakami, A., Nakamura Y., Torikai K., Tanaka T., Koshihara T., Koshimizu K., Kuwahara S., Takahashi Y., Ogawa K., Yano M., Tokuda H., Nishino H., Mimaki Y., Sashida Y., Kitanaka S., Ohigashi H. 2000. "Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress and tumor promotion in mice", *Cancer Research*, 60, 5059–5066.

O'Neill, L. A., Golenbock D., Bowie A. G. 2013. "The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity", *Nature Reviews Immunology*, 13, 453–460.

Patel, D. A., Bock C. H., Schwartz K., Wenzlaff A. S., Demers R. Y., Severson R. K. 2005. "Sexually transmitted diseases and other urogenital conditions as risk factors for prostate cancer: a case – control study in Wayne County, Michigan", *Cancer Causes Control*, 16, (3), 263-273.

Paone, A., Starace, D., Galli, R., Padula, F., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E., Riccioli, A. 2008. "Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism", *Carcinogenesis*, 29, (7), 1334-42.

Pei, Z., Lin, D., Song, X., Li, H., Yao, H. 2008. "TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGFbeta1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide", *Cell Immunology*, 254, (1), 20-7.

Perigny, M., Bairati. I., Harvey, I. 2008. "Role of immunohistochemical overexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-11 in the prognosis of death by ovarian cancer", *American Journal of Clinical Pathology*, 129, 226-231.

Platz, E. A., De Marzo A. M. 2004. "Epidemiology of inflammation and prostate cancer", *Journal of Urology*, 171, (2), 36-40.

Platz, E. A., De Marzo A. M., Giovannucci E. 2004. "Prostate cancer association studies: pitfalls and solutions to cancer misclassification in the PSA era", *Journal of Cell Biochemistry*, 91, (3), 553–571.

Poltorak, A., He X., Smirnova I., Liu M. Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. 1998. "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene", *Science*, 282, (5396), 2085-8

Putzi, M.J, De Marzo A. M. 2000. "Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia", *Urology*, 56, (5), 828–832.

Roberts, R. O., Bergstralh E. J., Bass S. E., Lieber M. M., Jacobsen S. J. 2004. "Prostatitis as a risk factor for prostate cancer", *Epidemiology*, 15, (1), 93-99.

Salaun, B., Romero P., Lebecque S. 2007. "Toll-like receptors 'two-edgeds word: when immunity meets apoptosis", *European Journal of Immunology*, 37, (12), 3311–8.

Schmausser, B., M. Andrulis, S. Endrich, H. K. Müller-Hermelink, and M. Eck. 2005. "Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*", *International Journal of Medical Microbiology* 295, 179–185.

Sethi, C. S., Bailey, T. A., Luthert, P. J., Chong, N. H. 2000. "Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders", *British Journal of Ophthalmology*, 84, 654-666.

Sundov, Z., Tomic, S., Vilovic, K., Kunac, N., Kalebic, M., Bezic, J. 2008. "Immunohistochemically detected high expression of matrix metalloproteinase-2 as predictor of poor prognosis in Duke's B colon cancer", *Croatian Medical Journal*, 49, 636-642.

Takeda, K., Kaisho T., Akira S. 2003. "Toll-like receptors", *Annual Review of Immunology*, 21, 335–76.

Talvensaari-Mattila, A., Paakko, P., Hoyhtya, M., Blanco-Sequeiros, G., Turpeenniemi-Hujanen, T. 1998. "Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma", *Cancer*, 83, 1153-1162.

Trudel, D., Fradet, Y., Meyer, F., Harel, F., Tetu, B. 2008. "Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry", *Human Pathology*, 39, 731-73.

Whittemore, A. S., Kolonel L. N., Wu A. H., John E. M., Gallagher R. P., Howe G. R. 1995. "Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada", *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 652–661.

Wise, G. J., Marella, V. K., Talluri, G., Shirazian, D. 2000. "Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer", *Journal of Urology*, 164, (3), 722–725.

Xie, W., Y. Wang, Y. Huang, H. Yang, J. Wang, and Z. Hu. 2009. "Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF-kappaB in MDA-MB-231 breast cancer cells", *Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 1027–1032.

Zhao, S., Zhang Y., Zhang Q., Wang F., Zhang D. 2014. "Toll-like receptors and prostate cancer", *Frontiers Immunology*, 23, 5-352.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. SÜLEYMAN KALELİ
Proje No:	116S102
Proje Başlığı:	Prostat Kanseri Hücrelerinde Nobiletin Flavonoidinin TLR4 Ve TLR9 Reseptörleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	AYSEL KALAYCI YİĞİN, MEHMET AKDOĞAN, ASUMAN DEVECİ ÖZKAN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	SAKARYA Ü. TIP F. TEMEL TIP BİLİMLERİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2017 - 15/04/2018
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29949.82
Öz:	<p>Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) epitelyal, immün ve kanser hücrelerinde eksprese edilen iyi bilinen bir patern tanıma reseptörü ailesidir. Nobiletin, kanser karşıtı özelliklere sahip ve prostat kanseri riskini azalttığı bildirilen bir O-metillenmiş flavonoiddir. Bu çalışmada Nobiletinin etkileri TLR4 ve TLR9 üzerinde PC-3, LNCaP ve HUVEC hücre hatlarında araştırılmıştır. LPS (lipopolisakkarit) ve CpG-ODN (CpG oligodeoksiniükleotid) sırasıyla TLR4 ve TLR9 sitümülasyonu için kullanılmıştır. Hücre canlılığı WST-1 ile analiz edilmiştir. Nobiletinin inhibe edici konsantrasyonu (IC50) LNCaP için 20 µM, PC-3 ve HUVEC için 40 µM olarak bulunmuştur. JElatinaz aktivitesi ve protein ekspresyonu sırasıyla zimografi ve western blot ile analiz edilmiştir. MMP-2 ve MMP-9 jelatinaz aktivitesi PC-3 ve LNCaP için düşük bulunmuştur. MMP-2 aktivitesi HUVEC için yüksek bulunmasına rağmen, MMP-9 aktivitesi gözlenmemiştir. Aynı zamanda Nobiletinin TLR4 ve IRF3 protein miktarını azalttığı bulunmuştur. TLR4 ve TLR9 gen ekspresyonu Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile analiz edilmiştir. Nobiletin'in TLR4 ve TLR9 gen ekspresyonunu azalttığı LNCaP hücrelerinde gözlenmiştir. Sitokinler (INF-? ve INF-?) Enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) ile analiz edilmiştir. Nobiletinin INF-? ve INF-? miktarını LNCaP hücrelerinde azalttığı bulunmuştur. TLR4 ve TLR9 sinyal yollarını Nobiletinin özellikle LNCaP hücrelerinde baskıladığı gözlenmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, Nobiletinin etkisinin AR- bağımlıdır ve TLR4 ve TLR9 sinyal yolları üzerinde baskılayıcı bir etki göstermektedir. Araştırmamız büyük potansiyeli olan TLR4 ve TLR9 sinyal yollarının yeni tedavi yaklaşımları için önemli olduğunu göstermiştir ve çalışmamız yeni projeler için prostat kanseri, Nobiletin ve TLR?ler arasındaki ilişkide moleküler mekanizmanın varlığını göstermiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Prostat Kanseri, TLR4, TLR9, Flavonoid, Nobiletin
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır