



**Prostat Kanseri Gelişiminde Hippo Sinyal İletim Sistemi  
Üyesi YAP (Yes Associated Protein)'ın Rolünün  
Araştırılması**

**Program Kodu: 3501**

**Proje No: 114S419**

**Proje Yürütücüsü:  
Yrd. Doç. Dr. Filiz KISAAYAK ÇOLLAK**

Araştırmacı:

Yrd. Doç. Dr. Şeyma ÖZKANLI

Bursiyer:

Araştırma Görevlisi Fatma SAĞIR

ARALIK 2016  
İSTANBUL

## Önsöz

Prostat kanseri dünyada akciğer kanserinden sonra erkeklerde en sık görülen kanserdir. Kanser tedavisinde etkili ilaçların geliştirilebilmesi için kanserin başlamasına, gelişmesine ve metastazına neden olan mekanizmaların anlaşılması gerekmektedir. Prostat kanseri tümörögenezinde, Hippo-YAP sinyal iletim sistemi ile kanser ilişkisini araştırdığımız ve YAP'ın etki mekanizmasını aydınlatmaya çalıştığımız 'Prostat Kanseri Gelişiminde Hippo Sinyal İletim Sistemi Üyesi YAP (Yes Associated Protein)'ın Rolünün Araştırılması' isimli 114S419 projemiz TÜBİTAK 3501 Kariyer Geliştirme Programı tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmada önemli katkıları olan Araştırma Görevlisi Fatma Sağır'a ve Yrd. Doç. Dr. Şeyma Özkanlı'ya teşekkür ederim. Çalışmamızın başlangıcında danışman olarak görev alan Yrd. Doç. Dr. Esra Kürüm'e ve bursiyer olarak görev alan ve sonrasında da gönüllü araştırmacı olarak devam eden Yrd. Doç. Dr. Ümmühan Demir'e de desteklerinden ötürü teşekkür ederim. İstanbul Medeniyet Üniversitesi personeline projenin yürütülmesi esnasındaki bürokratik işlemlerdeki yardımları için teşekkür ederim.

Yrd. Doç Dr. Filiz Kısaayak Çollak

## ÖZET

YAP (Yes associated protein) transkripsiyonu ko-aktif edici bir protein olup, insanda 11q22 kromozomunda yer alan *Yap* geni tarafından kodlanmaktadır. YAP, Hippo sinyal iletim sisteminde yer alan proteinlerden bir tanesidir. Hippo sinyal iletim sistemi tümör baskılayıcı bir sistem olup, hücrelerin çoğalması, büyüme, rejenerasyon gibi fizyolojik fonksiyonlarda da rolü gösterilmiştir.

Hippo sinyal iletim sisteminin aktif olduğu durumda, YAP proteini fosforile edilmekte ve sitoplazmada 14-3-3 bağlama proteinleri tarafından bağlanmakta ya da parçalanmaktadır. Böylece YAP'ın çekirdeğe geçişi ve hücre çoğalmasını sağlayacak genlerin transkripsiyonu engellenmektedir. Hippo sinyal iletim sistemindeki düzensizlikler prostat kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserin tümörögenezi ve metastazıyla ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamızda prostat kanseri hücre modelleri ve insan prostat tümör dokusu kullanılmıştır. YAP proteinin ekspresyonu susturularak ya da doğal ve mutant formu over ekspres edilerek hücrenin canlılığına, koloni oluşturma kapasitesine, ankraj bağımsız büyümesine olan etkisi incelenmiştir. Ayrıca over eksprese edildiği koşullarda sispilin ve bicalutamide kullanımının hücrenin canlılığına olan etkisi ve tedaviye karşı direnç oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. YAP ve androjen reseptörü (AR) arasındaki etkileşim ko-immüno çöktürme ve ChIP metodları ile tetkik edilmiştir. İnsan prostat kanseri dokularında YAP ve fosforlanmış YAP'ın ekspresyonuna immünohistokimya ile bakılıp klinikopatolojik özellikler ile YAP'ın boyanma kuvveti arasındaki ilişki istatistiksel yöntemler ile karşılaştırılmıştır.

YAP'ın ekspresyonu AR- PC3 hücrelerinde AR+ LNCaP hücrelerine göre daha fazla tespit edilmiştir. YAP'ın fonksiyon kaybı deneyleri hücre canlılığını ve hücre dönüşmesini (klonojenite ve soft agar koloni oluşumu) azaltmış, fonksiyon kazanımı deneylerinde fosfo mutant YAPS127A'nin ekspresyonu hücre canlılığını arttırmıştır. Bu durum prostat kanserinde YAP'ın tümörögenez de rolü olabileceğini düşündürmektedir. YAP ile AR protein kompleksi oluşturmakta ve YAP AR-kromatin kompleks oluşumunda yer almaktadır. İnsan prostat kanseri doku örneklerinde YAP'ın ekspresyonu kansere komşu normal dokuda kanser dokusuna göre daha fazla görülmüştür. Klinikopatolojik özelliklerden yalnızca ekstraprostatik yayılım ile ilişkili bulunmuştur. YAP'ın ekspresyonunun çok olduğu durumlarda ekstraprostatik yayılım daha fazla görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Prostat kanseri, Tümörögenez, YAP (Yes associated protein), androjen reseptörü, Hippo sinyal iletim sistem

## ABSTRACT

YAP (Yes associated protein) is a transcription co-activator encoded by *Yap* gene in human chromosome 11q22. YAP is one of the member proteins in the Hippo Pathway. Hippo is known as a tumor suppressor pathway and studies have shown that it also regulates cell proliferation, growth and regeneration.

When the Hippo pathway is on YAP is phosphorylated and is either bound by the 14-3-3 binding proteins or degraded in the cytoplasm. As a result YAP can not enter to the nucleus and the transcription of genes responsible for the proliferation is inhibited. Deregulation of the pathway has been related with tumorigenesis and metastasis of various cancer types including prostate cancer.

In our study, we used prostate cancer cell models as well as human prostate cancer tissue samples. By loss of function (knock down of YAP) and gain of function (overexpression of wild type and mutant YAP) experiments the effects of YAP on cell viability, colony formation and anchorage independent growth were investigated. Furthermore, the effect of over expression on cell viability when cells were treated with cisplatin and bicalutamide were determined as to understand whether the YAP expression has a role in drug resistance. YAP and androgen receptor (AR) interaction were analyzed by co-immunoprecipitation and ChIP methods. Immunohistochemical analysis was performed to see the expression of YAP and phospho YAP in human prostate tissue samples. The relation of expression level with the clinicopathological properties were analyzed by statistical methods.

The expression of YAP was higher in AR- PC3 cells compared to AR+ LNCaP. Loss of function experiments diminished the cell viability and cellular transformation (clonogenicity and soft agar colony formation) whereas in gain of function experiments the expression of phosphomutant YAP (YAPS127A) increased the cell viability. These results showed that YAP might have a function in prostate cancer tumorigenesis. YAP and AR formed protein complex and was in the AR-chromatin complex. The expression of YAP was higher in tumor adjacent normal tissues compared to tumor in human prostate cancer tissues. Extraprostatic extension was correlated with YAP expression. When the expression of YAP was high extraprostatic extension was observed more.

**Keywords:** Prostate cancer, tumorigenesis, YAP (Yes associated protein), androgen receptor, Hippo pathway

## İçindekiler

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 GİRİŞ .....                                                                                | 1  |
| 2 LİTERATÜR ÖZETİ.....                                                                       | 4  |
| 3 GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                       | 7  |
| 3.1 İNSAN PROSTAT KANSERİ DOKU ÖRNEKLERİNDE ANALİZLER .....                                  | 8  |
| 3.1.1 İmmunohistokimyasal boyama: .....                                                      | 8  |
| 3.1.2 İstatistiksel analiz: .....                                                            | 8  |
| 3.2 PROSTAT KANSERİ HÜCRE MODELLERİNDE ANALİZLER.....                                        | 9  |
| 3.2.1 YAP ve pYAP proteinlerinin ekspresyon ve lokalizasyon analizleri: .....                | 9  |
| 3.2.2 YAP'ın ekspresyonunun susturulması ve fonksiyonel analizler: .....                     | 9  |
| 3.2.3 YAP ve YAPS127A'nin overekspres edilmesi ve fonksiyonel analizler: .....               | 10 |
| 3.2.4 YAP ve androjen reseptörü (AR) arasındaki ilişkinin araştırılması .....                | 12 |
| 4 BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                                                 | 13 |
| 4.1 İNSAN PROSTAT KANSERİ DOKU ÖRNEKLERİNDE ANALİZLER .....                                  | 13 |
| 4.1.1 İmmunohistokimyasal boyama .....                                                       | 13 |
| 4.1.2 İstatistiksel Analiz .....                                                             | 13 |
| 4.2 PROSTAT KANSERİ HÜCRE MODELLERİNDE ANALİZLER.....                                        | 17 |
| 4.2.1 YAP ve pYAP proteinlerinin ekspresyon ve lokalizasyon analizleri: .....                | 17 |
| 4.2.2 YAP'ın ekspresyonunun susturulması (knockdown edilmesi) ve fonksiyonel analizler:..... | 20 |
| 4.2.3 YAP ve YAPS127A'nin overekspres edilmesi ve fonksiyonel analizler: .....               | 23 |
| 4.2.4 YAP ve androjen reseptörü (AR) arasındaki ilişkinin araştırılması: .....               | 29 |
| 5 SONUÇ .....                                                                                | 30 |

## Şekiller

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Hippo sinyal iletim sisteminde yer alan proteinler ve hücrede Panel A) Büyüme Sinyali Panel B) Büyüme İnhibe Edici Sinyal varlığında sinyal iletim mekanizması. .... | 5  |
| Şekil 2. Projede izlenen yöntemlerin şematik özeti .....                                                                                                                      | 7  |
| Şekil 3. Prostat kanseri doku örneklerinin YAP (10X büyütme oranı) ve pYAP (20X büyütme oranı) antikorları ile immünohistokimyasal boyanması.....                             | 13 |
| Şekil 4. PrePEC, LNCap ve PC3 hücrelerinden elde edilen tüm hücre lizatlarında YAP ve pYAP protein seviyeleri. ....                                                           | 18 |
| Şekil 5. YAP ve pYAP'ın, PrePEC, LNCaP ve PC3 hücrelerindeki sitoplazmik (sito) ve nükleer (nük) ekspresyonunun westernblot ile analizi.....                                  | 18 |
| Şekil 6. YAP ve pYAP için immünofloresan boyama. ....                                                                                                                         | 20 |
| Şekil 7. YAP'a spesifik siRNA ile LNCaP ve PC3 hücrelerinde YAP'ın ekspresyonun susturulmasının westernblot analizi. ....                                                     | 20 |
| Şekil 8. YAP siRNA'nın LNCaP ve PC3 hücrelerinde proliferasyona olan etkisinin MTS ajanı kullanılarak ölçülmesi. ....                                                         | 22 |
| Şekil 9. YAP siRNA'nın PC3 hücrelerinin klonojenitesine olan etkisi. Koloniler sabitlenerek, kristal viole boyası ile boyanmıştır. ....                                       | 22 |
| Şekil 10. Koloni formasyonunun ölçüm grafiği. ....                                                                                                                            | 22 |
| Şekil 11. Soft agar koloni oluşumu. ....                                                                                                                                      | 23 |
| Şekil 12. Western blot ile YAP ve YAPS127A'nın overekspresyonlarının gösterilmesi. ....                                                                                       | 24 |
| Şekil 13. YAP veya YAPS127A'nın 48 saat overekspresyonundan sonra MTS ile hücre canlılığının belirlenmesi. ....                                                               | 24 |
| Şekil 14. YAP ve YAP S127A'nın overekspresyondan sonra hücre içindeki lokalizasyonlarının western blot ile gösterilmesi. ....                                                 | 25 |
| Şekil 15. FLAG-YAP veya FLAG-YAP S127A'nın overekspresyonunun monolayer koloni oluşumuna etkisi. ....                                                                         | 26 |
| Şekil 16. FLAG-YAP veya FLAG-YAP S127A'nın overekspresyonunun LNCaP hücrelerinde soft agar koloni oluşumuna etkisi. ....                                                      | 26 |
| Şekil 17. FLAG-YAP veya FLAG-YAP S127A'nın overekspresyonunun PC3 hücrelerinde soft agar koloni oluşumuna etkisi. ....                                                        | 27 |
| Şekil 18. Prostat kanseri hücrelerinin sisplatin ile muamele edilmesi ve YAP overekspresyonunun sisplatin muamelesine etkisi. ....                                            | 28 |
| Şekil 19. Prostat kanseri hücrelerinin bicalutamide ile muamele edilmesi.....                                                                                                 | 28 |
| Şekil 20. AR ve YAP proteinlerinin LNCaP hücrelerinde koimmünopresipitasyonu. ....                                                                                            | 29 |
| Şekil 21. LNCaP hücrelerinde ARE1 genomik bölgesine YAP ve AR'ın bağlanmasının ChIP yöntemiyle gösterilmesi. ....                                                             | 29 |

## Tablolar

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. YAP'ın farklı kanserlerdeki ekspresyonu ve fonksiyonu .....                                 | 6  |
| Tablo 2. YAP'ın farklı örneklerde (benign, PIN, tümör) ve hücrel yapılar da boyanma dağılımı .....   | 15 |
| Tablo 3. pYAP'ın farklı örneklerde (benign, PIN, kanser) ve hücrel yapılar da boyanma dağılımı ..... | 16 |
| Tablo 4. YAP ve pYAP'ın boyanma dağılımının karşılaştırılması .....                                  | 16 |
| Tablo 5. İmmünohistokimyasal boyama yapılan doku örneklerinin klinikopatolojik özellikleri           | 17 |

## 1. GİRİŞ

Bu projenin amacı, Hippo sinyal iletim sisteminin nükleer efektör üyesi YAP (Yes associated protein)'in prostat kanserindeki rolünün araştırılmasıdır. Hippo sinyal iletim sistemi hücre büyümesinin kontrol sistemi olup, drosofiladan memelilere kadar korunmuştur. Hücre çoğalması, apoptoz ve organ büyüklüğünün düzenlenmesi gibi pek çok hücresel olayda fonksiyonu bulunmakla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda kök hücre fonksiyonu, rejenerasyon ve tümör baskılamada da rolleri olduğu gösterilmiştir. Hippo sinyal iletim sisteminde birçok protein görev almaktadır. Bu sistemde, sinyal iletiminin en sonunda yer alan ve bir transkripsiyonel koaktivatör olan YAP proteininin nükleusa geçmesi engellenerek hücre büyümesi sınırlandırılır. YAP 11q22 amplikonunda yerleşmiştir ve birçok dokuda onkogen olarak davranmakla birlikte meme dokusunda tümör baskılayıcı olarak rapor edilmiştir. Farklı tip kanserlerde YAP'ın amplifikasyonu gösterilmiştir. Özellikle hücre çekirdeğinde ekspresyonunun artması birçok tümör tipinin gelişimi ve düşük hastalık iyileşmesi ile ilişkilendirilmiştir. Ancak buna neden olan mekanizmalar henüz tam aydınlatılamamıştır.

Prostat kanseri gelişmiş ülkelerde erkekler arasında en yaygın görülen kanser tipi olup, akciğer kanserinden sonra ölüme en çok neden olan ikinci kanserdir. Prostata yerleşik tümörlerde tedavi mümkündür ancak hastaların yaklaşık % 33'ü yerleşik tedaviye direnç geliştirmekte ve sonunda hastalık tedavi edilemez metastatik özellik kazanmaktadır. Terapilere karşı olan direnç mekanizmaları henüz tam anlaşılamamıştır. Prostat kanserinin gelişimi ve metastazında Hippo sinyal iletim sisteminin ve özellikle YAP'ın fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Literatürdeki araştırmalar YAP'ın özellikle göğüs, yumurtalık, kolon, karaciğer ve baş-boyun kanserlerindeki rolüne yoğunlaşmış olup YAP'ın prostat kanserindeki fonksiyonu ile ilgili araştırmalar oldukça az sayıda olup geçtiğimiz son iki yılda artmıştır.

Bu çalışmada Hippo sinyal iletim sistemi üyelerinden YAP'ın prostat kanserindeki rolü over-ekspresyon ve knockdown yöntemleri ile araştırılmıştır. YAP'ın özellikle prostat kanseri gelişimindeki fonksiyonu ve androjen reseptörü ile olan ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Radikal prostatektomi uygulanmış bireylerden alınan prostat dokusu örneklerinde, toplam YAP ve YAP'ın S127'de fosforlanmış formu pYAP proteininin ekspresyonu ve lokalizasyonu immünohistokimyasal boyama ile araştırılmıştır. Prostat kanseri ve kansere komşu normal prostat dokusundaki ekspresyonları karşılaştırılmıştır. YAP'ın down regülasyonunun metastatik olan ve olmayan prostat kanseri hücre modellerindeki fenotipik etkisine bakılmıştır. Bu amaçla kültüre edilmiş prostat kanseri hücrelerinde YAP siRNA kullanılarak

susturulmuş ve bunun proliferasyona, koloni oluşumuna ve ankraj bağımsız büyümeye olan etkileri analiz edilmiştir. YAP'ın serin 127 (S127) deki fosforilasyonunun bu proteinin sitoplazmada kalmasına ve daha sonra degrade olmasına neden olduğu yapılan önceki çalışmalarda gösterilmiştir. S127 de fosforile edilmiş olan YAP inaktif olup, prostat kanseri doku örnekleri ve prostat kanseri hücreleri S127 fosforilasyonu açısından immünohistokimyasal analiz ve westernblot yöntemi ile incelenmiş ve fosforilasyonun sitoplazma ya da nükleusa yerleşik olup olmadığı tespit edilmiştir. YAP'ın prostat kanserindeki rolünü kanıtlamak için, ayrıca YAP ve YAP'ın 127 nolu serin aminoasiti alanin (A) ile değiştirilmiş formu olan YAPS127A prostat kanseri hücrelerinde aşırı eksprese (overeksprese) edilerek hücrelerin çoğalmasına ve ankraj bağımsız büyümesine olan etkisi araştırılmıştır. Androjen reseptörü ve YAP arasındaki etkileşim ko-immünoçöktürme (co-IP) ve kromatin immünoçöktürme (ChIP) yöntemleri ile araştırılmıştır.

İncelenen prostat kanseri hücre hatlarının tüm hücre lizatlarında YAP'ın ekspresyonu, AR pozitif LNCaP'lerde AR negatif PC3'lere göre daha az görülmüştür. YAP1 hem sitoplazma hem de nükleusta yerleşiktir, pYAP1 ise sitoplazmada tespit edilmiştir. İmmünofloresans görüntülemeye YAP LNCaP'de YAP daha çok nükleer lokalizasyon gösterirken, PC3'de ve PrePec'de ise hem sitoplazmik hem de nükleer dağılım göstermiştir. pYAP'ın de PC3 ve LNCaP'de hem sitoplazmik hem de nükleer lokalizasyon gösterdiği belirlenmiştir. Hücrelerde YAP1 proteininin ekspresyonu YAP1 mRNA'sına özgül siRNAlar kullanılarak susturulup hücre canlılığına MTS ile bakıldığında hem LNCaP hem de PC3 hücrelerinde kontrol grubuna göre azalma görülmüştür. Ayrıca siRNA uygulamasından sonra PC3 hücrelerinin sayısı kontrol grubuna göre azalmıştır. Koloni formasyon ve soft agar koloni formasyon fonksiyonel analizlerinde oluşan kolonilerin sayısı azalmış ve boyutu küçülmüştür.

LNCaP ve PC3 hücreleri, FLAG-kontrol, FLAG-YAP ve FLAG-YAPS127A plazmidleri ile transfekte edilmiştir. Bu hücrelerden nükleer ve sitoplazmik lizatlar elde edilerek proteinlerin ektopik ekspresyonu FLAG antikoru kullanılarak westernblot analizi ile tespit edilmiştir. LNCaP ve PC3 hücrelerinde ekspresyon sonucuna göre FLAG işaretli proteinler daha çok sitoplazmada yer almakta olup, nükleusa az bir miktarının geçebildiği görülmüştür. Hem PC3 hem de LNCaP için YAPS127A overeksprese edildiğinde hücre canlılığında artma olduğu görülmektedir. Bu da YAP'ın aktif olmasının kanser hücrelerinin çoğalmasına sebep olduğuna işaret etmektedir. FLAG-YAP ve FLAG-YAPS127A ekspresyonu yapılan LNCaP hücrelerinde monolayer koloni oluşumu gözlenmemiştir. PC3 hücrelerinde FLAG-YAP ve FLAG-YAPS127A ekspresyonu yapılan hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde fazla koloni sayılmıştır. Ayrıca FLAG-YAPS127A mutantının koloni oluşumunu daha fazla arttırdığı gözlenmiş olup, literatürle uyumlu bir şekilde YAP'ın fosforile olamadığı için nükleusa

geçtiğini ve transkripsiyonu aktive ettiğini düşündürmektedir. Soft agar koloni formasyon analizinde, LNCaP hücrelerinde FLAG-YAP overeksprese edildiğinde kontrol vektörü ekspres edilen hücrelere göre oluşan kolonilerin daha küçük olduğu gözlenmiştir. Bu durum sitoplazmada yer alan YAP'ın AR pozitif hücrelerde hücre transformasyonunu engellediği sonucunu düşündürebilir. FLAG-YAPS127A overekspresyonu yapılan hücrelerde oluşan koloni büyüklüğünün kontrol grubu ekspresyonu yapılan hücrelerdeki koloni büyüklüğü ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç YAPS127A'nin hücre transformasyonunu etkilemediğini düşündürmektedir.

LNCaP ve PC3 hücreleri sisplatin ve bicalutamide ile muamele edilerek IC50 değerleri tespit edilmiştir. LNCaP hücre hattı için sisplatin IC50 değeri 100  $\mu$ M ve PC3 için 150  $\mu$ M olarak bulunmuştur. Ancak bu değer literatürdeki değerin çok üstündedir. Çalışmamızda sisplatin hazırlarken %0.9 NaCl kullanılmıştır. Literatürdeki çalışmalarda DMSO çözücü olarak kullanılmış olup bu durum sisplatinin NaCl'de yeterince iyi çözünmediğini düşündürmektedir. Uygulanan bicalutamide LNCaP'in hücre canlılığında herhangi bir etkiye neden olmamıştır. LNCaP hücrelerinde FLAG-YAPS127A ekspresyonu sonrasında sisplatin uygulaması hücre canlılığını azaltmıştır. YAP'ın nükleusta ekspres olması, ilaç dirençliliğini engellediğini düşündürmektedir.

LNCaP hücrelerinin tüm hücre lizatlarında co-IP deneyleri YAP1 ve AR'ın protein kompleksi oluşturduğunu göstermiştir. AR-kromatin kompleksinde YAP1'in rolünü araştırdığımız ChIP ve semi kantitatif PCR deneylerinde, PSA promotörünün ARE1 kor bölgesine bağlanan ChIP kompleksinde YAP1'in yer aldığını göstermiştir.

Yapılan bu çalışma YAP'ın prostat kanserinin gelişmesinde rol oynadığını göstermekle birlikte en önemli etkisinin prostat kanserinin yayılmasında (invazyon/metastaz) olduğunu düşündürmektedir. Klinikten elde edilen hasta örneklerinde YAP1 ekspresyonu ve ekstraprostatik yayılım arasındaki ilişki de bunu doğrulayıcı niteliktedir. YAP1'in ekspresyonunun fazla olduğu durumda ekstraprostatik yayılım da artmıştır.

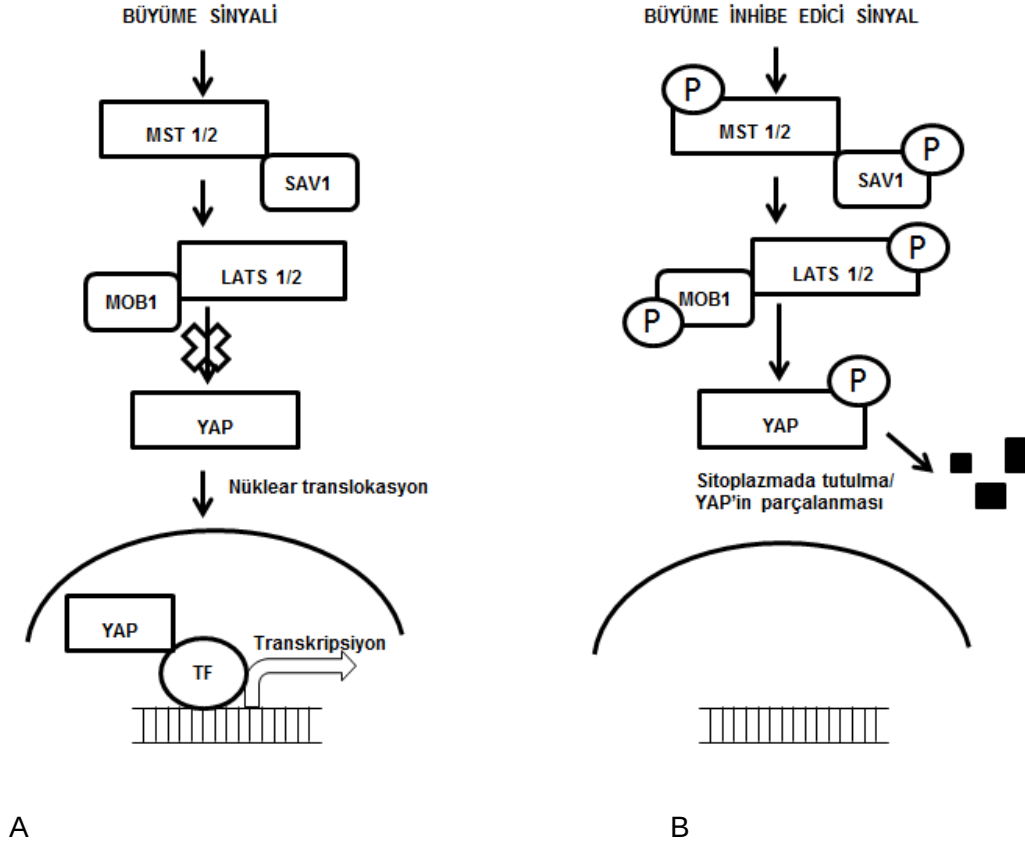
## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Prostat kanseri, erkekler arasında görülen en yaygın neoplazidir (Jemal vd., 2010; Maluf vd., 2012; Mullins ve Loeb, 2012). Popülasyon büyümesindeki eğilime dayanarak, prostat kanseri vakalarına 2030 yılına kadar 1.7 milyonluk yeni vakaların ekleneceği tahmin edilmektedir (Center vd., 2012). Prostat kanseri hücreleri büyümek ve yaşamlarını sürdürmek için androjen reseptörüne ihtiyaç duyarlar. Tedavi sırasında, luteinleyici hormon analogları (LHRH) ya da orşiektomi (cerrahi kastrasyon) kullanılarak androjen ortamdan uzaklaştırılır. Genellikle bu yöntem başlangıçta kanserin yayılmasının kontrolünde etkili olmakta ancak daha sonra kaçınılmaz bir şekilde kanser androjene-duyarlı formdan androjene duyarsız yani diğer bir ifade ile kastrasyona dirençli (CRPC- castration resistant prostate cancer) hale gelmektedir (Sarker vd., 2009). Bu aşamada etkili tedavi ilk onaylanan ilaç docataxel ile birlikte son yıllarda onaylanan cabazitaxel, sipuleucel-T, denosumab ve abiraterone asetat ile sınırlı olup, prostat kanseri karsinogenezini ve kastrasyona dirençli hale gelmesini etkileyen moleküler olayların anlaşılması tedavide elde edilecek sonucun iyileştirilmesi için mutlaka gereklidir (Tannock vd., 2004; Agarwal vd., 2012).

Hippo sinyal iletim sistemi, ilk olarak drosofilada bulunmuş olup, organ büyüklüğünün düzenlenmesinde fonksiyonu olduğu gösterilmiştir (Halder ve Johnson, 2011). Bu sistem memelilerde korunmuş olup, tümör baskılanmasında önemli bir role sahiptir. Hippo sinyal iletim sistemi birçok proteinden oluşan bir sistemdir (Nishio vd., 2013). Birçok katı tümörde regülasyonunda düzensizlik olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle sinyal iletim sisteminin nasıl işlediğinin anlaşılması yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi açısından önemlidir. Hippo sinyal iletim sistemi, hücreye gelen sinyallere bağlı olarak hücre büyümesini ve çoğalmasını aktive eder ya da durdurur. Sistemde yer alan proteinler (Zhao vd., 2011):

- 1- MST1 ve 2 (Mammalian sterile-like kinases 1,2),
- 2- LATS1 ve 2 (Large tumor suppressors 1,2)
- 3- MOB1 (Mps Once Binder Kinase activator-like)
- 4- YAP (Yes associated protein) olup hücrede gelişim sırasında MST1/2 ve LATS1/2 inaktiftir ve YAP'ın nükleusa geçmesine izin verirler. Böylece hücre büyümesinde ve yaşamasında görevli genler eksprese edilir (Şekil1, Panel A). Hücrelerin kontakt kurduğu durumlar gibi hücre büyümesinin engellendiği sinyal iletiminde, aktif olan MST1/2, LATS1/2'yi fosforile eder. Fosforile olmuş LATS1/2 de YAP'i Serin 127 amino asitinden fosforile eder.

Fosforlanmış YAP sitoplazmada kalır ve daha sonra degrade olur (Şekil1, Panel B) (Zeng ve Hong, 2008, Liu vd., 2012).



**Şekil 1.** Hippo sinyal iletim sisteminde yer alan proteinler ve hücrede Panel A) Büyüme Sinyali Panel B) Büyüme İnhibe Edici Sinyal varlığında sinyal iletim mekanizması.

YAP (Yes associated protein), Hippo sinyal ileti sisteminin en sonunda yer alan bir transkripsiyonel koaktivatördür (Zhang vd., 2011). DNA'ya bağlanma motifi olmadığı için tek başına transkripsiyon aktivitesi yoktur. Fakat karboksi terminal (COOH-terminal) ucunda potansiyel transaktivasyon domaini vardır (Yagi vd., 1999). Amino terminal (NH<sub>2</sub>- terminal) ucunda DNA'ya bağlanan protein ailesinden TEAD (TEA domain) proteinlerine bağlanma bölgesi vardır. Böylece TEAD transkripsiyon faktörleri ile etkileşir ve onların transkripsiyon aktivitelerini düzenler (Vassilev vd., 2001). YAP 11q22 amplikonunda yerleşmiştir (Overholtzer vd.,2006). YAP geninin karaciğer kanseri, meme kanseri ve medulloblastoma gibi kanserlerde amplifikasyonu gösterilmiştir (Zender vd., 2006; Overholtzer vd., 2006; Fernandez vd.,2009). Ayrıca YAP proteininin kolon, karaciğer, akciğer ve yumurtalık kanserlerinde fazla eksprese edildiği ve nükleusa yerleşik olduğu tespit edilmiştir ve birçoğunda düşük hastalık iyileşmesi ile ilişkilendirilmiştir (Zender vd., 2006, Zhao vd., 2007, Steinhardt vd., 2008). Ancak meme kanserinde tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gördüğü

de rapor edilmiştir (Yuan vd., 2008). Bütün bu sonuçlara dayanarak YAP'ın ekspresyonunun ve kanserdeki hücre büyümesini tetikleyici ya da inhibe edici dual fonksiyonunun hücre tipine ve hücrel olaylara bağlı olabileceği düşünülebilir (Wang vd., 2013). Literatür incelendiğinde, son yıllarda yapılan araştırmaların, YAP'ın özellikle göğüs, yumurtalık, kolon, karaciğer ve baş-boyun kanserlerindeki rolü üstünde yoğunlaşmış olduğunu göstermektedir. Bu kanserlerdeki YAP'ın ekspresyonu ve fonksiyonu aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

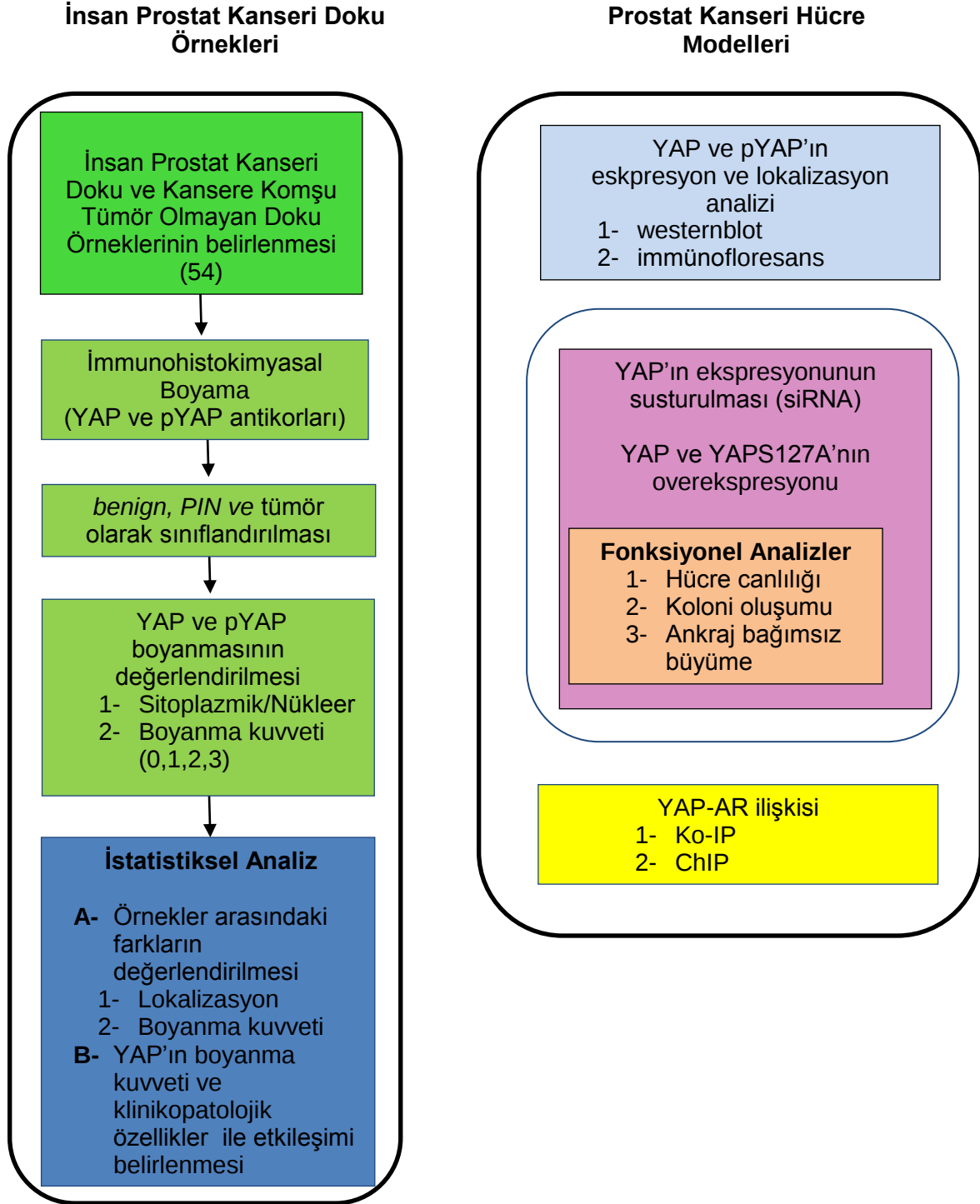
**Tablo 1.** YAP'ın farklı kanserlerdeki ekspresyonu ve fonksiyonu

| Kanser tipi                  | YAP ekspresyonu                                                                                                                                                                                | Kanserdeki fonksiyonu ve araştırma sonuçları                                                                               | Referans       |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Baş ve boyun sküamöz hücreli | İnsan doku örneklerinde YAP'ın tümörlerde arttığı ve özellikle invaziv özellikteki bölgede yerleştiği bulundu.                                                                                 | Metastazdan sorumludur.                                                                                                    | Ge vd., 2011   |
| Pankreas                     | Pankreatik tümör dokularında, YAP'ın sitoplazma ve nükleusta orta ve kuvvetli derecede boyandığı, komşu normal epitel hücrelerinin ise ya hiç boyanmadığı ya da zayıf boyandığı tespit edildi. | Pankreatik kanser hücrelerinin klonogenisitesinde ve büyümesinde potansiyel olarak önemli bir rol oynamaktadır.            | Diep vd., 2012 |
| Karaciğer                    | Hepatosellüler karsinom örneklerinde kuvvetli nükleer boyanma tespit edildi.                                                                                                                   | YAP'ın primer karaciğer tümör oluşumuna katkıda bulunmakta olduğu ileri sürülmektedir.                                     | Bai vd., 2012  |
| Beyin                        | İnsan meningiomalarında YAP nükleusta kuvvetli boyanmaktadır.                                                                                                                                  | Meningiomalarda onkogen olarak fonksiyon görmektedir.                                                                      | Baia vd., 2012 |
| Mide                         | Mide adenokarsinomlarında YAP'ın ekspresyonunun arttığı görüldü. YAP'ın nükleusta bulunması hastalıktan sağ kalım oranındaki                                                                   | Gastrik kanserlerde YAP onkogenik özellik göstermektedir.                                                                  | Kang vd., 2011 |
| Meme                         | İnvaziv özellikteki lobular meme kanserinde YAP nükleusa yerleşik olarak gösterildi.                                                                                                           | İnvaziv özellikteki lobular meme kanseri oluşumu ve ilerlemesi, YAP tarafından yönetilen transkripsiyon kaynaklı olabilir. | Vlug vd., 2013 |
| Yumurtalık                   | Ovaryum kanserlerinde yüksek nükleer YAP ve düşük seviyedeki sitoplazmik pYAP düşük yaşam oranı ile ilişkili bulundu                                                                           | YAP yumurtalık kanserlerinde onkogen olarak görev almaktadır.                                                              | Hall vd., 2010 |

Literatür incelendiğinde, YAP'ın prostat kanseri gelişimi ve metastazındaki fonksiyonu ile ilgili araştırmaların son iki yılda yoğunlaştığı görülmektedir. YAP'ın prostat kanserindeki ekspresyonunun derecesi, hücrel yerleşimi, fosforilasyon açısından durumu ve klinopatolojik özellikler ile ilişkisi hakkında detaylı çalışmalar çok fazla değildir. Yapılan bu çalışma ile YAP'ın prostat kanserindeki rolünü aydınlatıcı önemli sonuçlar elde edilmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Proje insan prostat kanseri doku örnekleri ve prostat kanseri hücre modelleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma projesi sırasında izlenen yöntemler Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Projede izlenen yöntemlerin şematik özeti

### 3.1 İNSAN PROSTAT KANSERİ DOKU ÖRNEKLERİNDE ANALİZLER

#### 3.1.1 İmmunohistokimyasal boyama:

Projede, deney grubunu belirlemek üzere İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilimdalı'na ait patoloji arşivinde radikal prostatektomi uygulanmış prostat kanseri olgularının kayıtları geriye dönük olarak incelenmiştir. İmmunohistokimyasal boyama için 54 prostat dokusu kullanılmıştır. Bu çalışma için Etik Kurul Onayı, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Dokularda öncelikle YAP ve pYAP antikoru (Cell signaling) kullanılarak immün boyama gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla parafine gömülü doku kesitleri standart protokole bağlı olarak ksilen ve farklı alkol serilerinden geçirilerek deparafinize ve hidrate edilmişlerdir. Prostat kanseri dokuları ve normal prostat dokuları YAP ve 127 nolu serin aminoasiti fosforlanmış pYAP (fosfo YAP) antikorları kullanılarak immün boyama ile boyanmıştır. İmmün boyamada antijen uzaklaştırması 5 dakikalık basınçlı-pişirme tekniği ile gerçekleştirilmiş ve daha sonra lamalar 1 saatte oda sıcaklığına düşürülmüştür. Bloklama 10 dakikada çift endojen enzim bloklama ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra dokular primer YAP ve pYAP antikorları ile 4 derecede gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün örnekler horseradish peroksidaz ile 30 dakika inkübe edilmiştir. Sinyaller 3,3'-diaminobenzidine substrat hidrojen peroksit kullanılarak tespit edilmiş ve hematoksilin kullanılarak aykırı boyama yapılmıştır. En sonunda doku slideleri alkol ve xilen serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiş ve yapıştırıcı kullanarak üzerleri lamel ile kapatılmıştır. Patolojik incelemeyle normal (benign), PIN (prostatik intraepitelyal neoplazi) ve tümörlü bölgeler ayırt edilmiştir. Boyanmalar yoğunluklara bağlı olarak pataloglar tarafından 0, 1, 2 ve 3 olarak derecelendirilmiştir.

#### 3.1.2 İstatistiksel analiz:

Veriler istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Bu amaçla Kruskal Wallis H-test kullanılmıştır. Bu test 2 veya daha fazla bağımsız değişkenin, ordinal bir değişkene bağlı olarak test edilmesi prensibine dayanır. Bizim analizimizde ordinal bağımlı değişken hücrenin boyanması, bağımsız değişken de duruma bağlı olarak; protein türü (YAP veya pYAP), hücresel yapı (çekirdek veya sitoplazma), hücre türü (benign, PIN veya tümör) olmuştur. İki'den fazla grup karşılaştırılırken, Kruskal Wallis H-test kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğunda, birbirinden farklı grupların belirlenmesi için post-hoc ikili analizler gerçekleştirilmiştir.

Olgulara ait patoloji preparatları PNİ (perinöral invazyon), cerrahi sınır, Gleason skoru, ekstraprostatik yayılım ve seminal vezikül tutulumu açısından değerlendirilmiştir.

### **3.2 PROSTAT KANSERİ HÜCRE MODELLERİNDE ANALİZLER**

Bu projede androjene duyarlı, androjen reseptörü pozitif (AR+) LNCaP ve androjene duyarlı olmayan, androjen reseptörü negatif (AR-) PC3 prostat kanseri hücreleri kullanılmıştır. Hücreler DSMZ hücre bankasından satın alınmıştır. Ayrıca kontrol grubu olarak LONZA'dan temin edilen primer prostat epitel hücreleri (PrePEC) tercih edilmiştir. LNCaP ve PC3 hücreleri % 10 fetal bovin serum (Gibco) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Gibco) içeren RPMI 1640 (Gibco) besiyerinde, %5 CO<sub>2</sub> varlığında 37°C'de inkübe edilmişlerdir. PrePEC hücrelerinin büyütülmesi için özel bir besiyeri (PreEBM Basal Medium, LONZA) ve büyüme faktörlerinin yer aldığı bir kit (PrEGM SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors, LONZA) karışımı kullanılmıştır.

#### **3.2.1 YAP ve pYAP proteinlerinin ekspresyon ve lokalizasyon analizleri:**

Prostat kanseri hücre soylarında (LNCaP ve PC3) YAP'ın ve pYAP'ın protein seviyeleri tüm hücre lizatlarında ve sitoplazmik ve nükleer lizatlarda westernblot analizi ile incelenmiştir. Tüm hücre lizatı eldesi buzda soğutulmuş lizis solüsyonu kullanılarak (20 mM HEPES pH (7.4), 150mM NaCl, % 0.5 Nonidet P-40, 1mM EDTA, proteaz inhibitörleri ve fosfataz inhibitörleri) yapılmıştır. Sitoplazmik ve nükleer lizatlar, nükleer ekstraksiyon kiti (Affimetrix) ile üretici firmanın protokolü uygulanarak elde edilmiştir. Primer prostat epitel hücre (PrePEC) soyu kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.2 YAP'ın ekspresyonunun susturulması ve fonksiyonel analizler:**

YAP'a spesifik siRNA kullanılarak, prostat kanseri hücrelerinde (LNCaP ve PC3) YAP'ın ekspresyonu baskılanmıştır. Bu amaçla 10 ve 20 nM'lık siRNA (Dharmacon) hücrelere transfeksiyon solüsyonu (Dharmafect) kullanılarak transfekte edilmiş ve 72 saat sonra western blot analizi ile ekspresyon kontrol edilmiştir. Her iki konsantrasyonda da YAP ekspresyonunda mock (yalnızca transfeksiyon solüsyonu içeren örnek) ve kontrol grubu (scramble) siRNA'larına göre azalma görülmüştür. Fonksiyonel analizlere 20 nM konsantrasyonunda siRNA kullanılarak devam edilmiştir.

**Hücre canlılığına olan etkisinin incelenmesi:** Radyoaktif olmayan, hücre canlılığını ölçen MTS analizi ile incelenmiştir. Bunun için 96 kuyucuklu tabaklarda LNCaP (15000/kuyucuk) ve PC3 (5000/kuyucuk) hücreleri büyütülerek 20 nM YAP siRNA ve kontrol (scramble) siRNA Dharmafect 2 (Dharmacon) reaktifi kullanılarak transfekte edilmiştir. 72 saat sonra radyoaktif olmayan hücre çoğalmasını ölçmek için sıklıkla kullanılan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) (Promega) ile inkübasyona tabi tutulmuştur. Bir saat sonra mikroparka okuyucuda (Thermoscientific) 490 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Yalnızca transfeksiyon reaktifi içeren kuyucuklar mock (M) ve kontrol siRNA (scramble (K)) içeren kuyucuklar kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

**Monolayer koloni oluşumuna olan etkisinin incelenmesi:** Hücreler altı-kuyucuklu kültür tabaklarında kültüre edilmişlerdir. 20nM'lık siRNA ile transfekte edildikten iki gün sonra YAP siRNA uygulaması tekrar edilmiştir. İkinci uygulamadan 24 saat sonrasında hücreler (500-1000/kuyucuk) altı kuyucuklu ya da 10cm'lik tabaklara alınmıştır. 15 gün sonrasında oluşan koloniler formaldehit ile sabitlenmiş ve kristal viole boyası ile boyanmıştır. Bu deney üç kez tekrarlanmış ve oluşan koloniler sayılmıştır. Monolayer koloni oluşumu in vitro hücre yaşama analizi olup, tek bir hücrenin koloniye dönüşme yeteneğini gösterir (Franken vd., 2006). Bu yöntem ile YAP'ın ekspresyonunun durdurulmasının hücreye sağladığı canlılık açısından önemi araştırılmıştır.

**Soft agarda koloni oluşumuna olan etkisinin incelenmesi:** Hücreler altı-kuyucuklu kültür tabaklarında kültüre edilmişlerdir. 20 nM'lık siRNA ile ilk transfeksiyondan 48 saat sonra ikinci kez transfeksiyon yapılmıştır. İkinci transfeksiyondan 24 saat sonra, hücreler (5000 hücre/kuyucuk) tabanında %0.5'lik agaroz içeren altı-kuyucuklu kültür tabaklarına % 0.3'lük agaroz ve medium eşliğinde eklenerek soft agarda koloni oluşturma yetenekleri incelenmiştir. Hücreler 21 gün büyüdükten sonra, her bir hücre kültürü kaplarında oluşan kolonilerin büyüklüğü ve sayıları kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Soft agar koloni oluşumu ankraj bağımsız büyüme analizi olup, YAP'ın karsinogeneze olan etkisi konusunda bilgi sağlamıştır. Kontrol grubu olarak scramble siRNA'lar kullanılmıştır.

### **3.2.3 YAP ve YAPS127A'nin overekspres edilmesi ve fonksiyonel analizler:**

Bu amaçla, FLAG işaretli insan YAP1 proteinini ve 127 nolu serin amino asidi alanine dönüştürülmüş mutant YAPS127A proteinini kodlayan plazmidler (p2XFLAGhYAP1-17791 ve p2XFLAGhYAPS127A-17790 Addgene) kar gözetmeyen plazmid bankası firması olan Addgene'den satın alınmıştır. Kontrol vektörü için KpnI ve XbaI restriksiyon enzimleri (Takara) ile p2XFLAGhYAP1 plazmidinden FLAGhYAP1 kesilerek çıkartılmış ve blunt-end

ligasyonu gerçekleştirilmiştir. FLAG işaretli YAP ve YAPS127A proteinlerinin ekspres edilip edilmediğini görmek amacıyla, LNCaP (400000 hücre/kuyucuk) ve PC3 (300000 hücre/kuyucuk) prostat kanseri hücre soyları 6 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarına ekilerek büyütülmüştür. % 80 yoğunluğa ulaşan hücreler, FLAG işaretli YAP ve YAPS127A ekspres eden plazmidler ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyon için Lipofectamine 2000 (Thermoscientific) kullanılmıştır. 48 saatlik overekspresyon sonunda tüm hücre lizatları SDS page jellerde yürütülmüştür. FLAG antikoru kullanılarak westernblot ile native ve mutant YAP1'lerin ekspresyonu kanıtlanmıştır. Ayrıca 48 saatlik overekspresyon sonrasında sitoplazmik ve nükleer ekstraksiyon yapılmış ve ekspresyonların hücresel lokalizasyonuna FLAG antikoru kullanılarak westernblot ile bakılmıştır.

**Hücre canlılığına olan etkisinin incelenmesi:** LNCaP (15000 hücre/kuyucuk) ve PC3 (6000 hücre/kuyucuk) prostat kanseri hücre soyları 96 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarına ekilerek büyütülmüştür. Lipofectamine 2000 transfeksiyon kimyasalı kullanılarak, FLAG işaretli YAP ve YAPS127A eksprese eden plazmidler hücrelere transfekte edilmiştir. 48 saat ektopik olarak ekspresyonu gerçekleştirilen YAP ve YAPS127A'nın hücre çoğalmasına olan etkisi MTS (Promega) kullanılarak ölçülmüştür. Bu amaçla MTS ile 1 saat muamele edilen hücrelerin 490 nm'deki absorbans değerleri mikropalakada belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol vektörü ile karşılaştırılmıştır.

**Monolayer koloni oluşumuna olan etkisinin incelenmesi:** Hücreler altı-kuyucuklu kültür tabaklarında kültüre edilmişlerdir. Overekspresyon için FLAG-YAP ve FLAG-YAPS127A plazmidleri hücrelere transfekte edildikten 72 saat sonra hücreler (500 ya da 1000 hücre) altı kuyucuklu ya da 10 cm'lik tabaklara alınmış ve iki hafta sonra oluşan koloniler formaldehit ile sabitlenmiş ve kristal viole boyası ile boyanmıştır. Bu deney üç kez tekrarlanmış ve oluşan koloniler sayılmıştır.

**Soft agarda koloni oluşumuna olan etkisinin incelenmesi:** Hücreler altı-kuyucuklu kültür tabaklarında kültüre edilmişlerdir. Overekspresyon için plazmidler transfekte edildikten 72 saat sonra, tabanında %0.5' lik agaroz içeren altı-kuyucuklu kültür tabaklarına % 0.3'lük agaroz ve medium eşliğinde (5000 hücre/kuyucuk) eklenerek soft agarda koloni oluşturma yetenekleri incelenmiştir. Hücreler 21 gün büyüdükten sonra, her bir hücre kültürü kaplarında oluşan kolonilerin büyüklüğü ve sayıları incelenmiştir. Sonuçlar birbirleri ve kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.

**Sisplatin ve bicalutamide ile muamele edilmesi:** LNCaP ve PC3 hücreleri apoptozu tetikleyen bir kemoterapötik ajan olan sisplatin ve prostat kanseri tedavisinde kullanılan anti-

androjen ajan olan bicalutamide ile muamele edilmişlerdir. Kontrol grubu olarak boş vektör transfekste edilmiş LNCaP ve PC3 hücreleri kullanılmıştır. Üçlü seriler halinde 96 kuyucuklu tabaklara ekilmiş hücrelere sisplatin, bicalutamide ve kontrol olarak DMSO ya da NaCl eklenmiştir. Sisplatin ve bicalutamide ile 72 saatlik inkübasyon sonunda, sisplatin ve bicalutamide'in IC50 değeri bulunmuştur. YAP ve YAPS127A overekspresyonu varlığında kullanılan ilaçların hücre canlılığına olan etkisine bakılmıştır.

### **3.2.4 YAP ve androjen reseptörü (AR) arasındaki ilişkinin araştırılması:**

**Protein kompleksi oluşumunun tespit edilmesi:** Hücrede endojen olarak ekspres edilen YAP ve endojen olarak eksprese edilen AR arasında protein kompleksinin oluşup oluşmadığı tespit edilmiştir. Ko-immüno çöktürme (co-IP) ve westernblot yöntemi kullanılmıştır. Bunun için hücre lizatları elde edilmiş, lizatlardaki proteinler anti-AR antikoru (tüm gece boyu) ve daha sonra protein-A/G sefaroze topçukları (sepharose beads) ile bir saat inkübe edilmişlerdir. YAP ve AR arasında protein kompleksinin oluşup oluşmadığı westernblot ile YAP antikoru kullanılarak tespit edilmiştir.

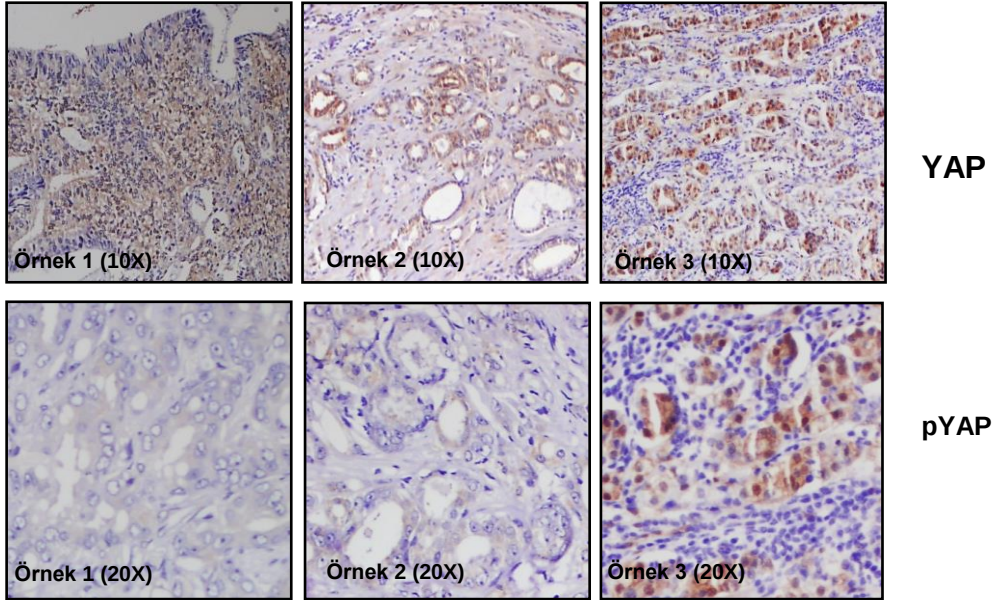
**ChIP (Kromatin immüno çöktürme) yöntemi ile genomik düzeyde tespit edilmesi:** YAP'ın androjen reseptörü transkripsiyon kompleksine yerleşip yerleşmediğini bulmak için kromatin immüno çöktürme (ChIP) yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla ChIP kiti kullanılmıştır (Pierce). Dihidrotestesteron (DHT) ile muamele edilen hücrelerden tüm hücre lizatı elde edilmiştir. Üretici firmanın protokolü takip edilerek anti-YAP, anti-AR ve negatif kontrol olarak IgG ile muamele edilmiştir. DNA-protein kompleksleri etanol çöktürme yöntemi ile çöktürülmüş ve sonrasında proteinaz K ile proteinler uzaklaştırılmıştır. Bu işleminden sonra da PSA proksimal promotörünün (ARE I) androjen cevaplı element (androgen responsive element) kor (AREc) bölgesine özel primerler kullanılarak semi kuantitatif PCR yapılmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 İNSAN PROSTAT KANSERİ DOKU ÖRNEKLERİNDE ANALİZLER

#### 4.1.1 İmmünohistokimyasal boyama

Prostat kanseri tümörögenезindeki YAP'ın rolünü anlamak için, 54 prostat dokusu örneğinde YAP1 ve pYAP1'in ekspresyonu immünohistokimyasal boyama ile araştırılmıştır. Farklı olgulardan alınan doku örneklerinde YAP1 ve pYAP1'in hem sitoplazmayı hem de nükleusu boyadığı görülmüştür (Şekil 3). Boyanmanın, farklı doku örneklerinde zayıftan kuvvetliye değişen farklı yoğunluğa sahip olduğu tespit edilmiştir. pYAP1'in genel olarak zayıf boyandığı izlenmiştir. Bu da YAP1 ve pYAP1'in homojen boyanma özelliği göstermediğini düşündürmektedir.



**Şekil 3.** Prostat kanseri doku örneklerinin YAP (10X büyütme oranı) ve pYAP (20X büyütme oranı) antikorları ile immünohistokimyasal boyanması.

#### 4.1.2 İstatistiksel Analiz

Patolojik incelemeyle dokularda normal (benign), PIN (prostatik intraepitelyal neoplazi) ve tümörlü bölgeler ayırt edilmiştir. YAP ve pYAP antikorları ile yapılan boyanmalar

yoğunluklara bağlı olarak 0, 1, 2 ve 3 olarak derecelendirilmiştir. Veriler istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Bu amaçla Kruskal Wallis H-test kullanılmıştır. Bu test 2 veya daha fazla bağımsız değişkenin, ordinal bir değişkene bağlı olarak test edilmesi prensibine dayanır. Bizim analizimizde ordinal bağımlı değişken hücrenin boyanması, bağımsız değişkende duruma bağlı olarak; protein türü (YAP veya pYAP), hücresel yapı (çekirdek veya sitoplazma), hücre türü (benign, PIN veya tümör) olabilir. İkiiden fazla grup karşılaştırılırken, Kruskal Wallis H-test kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğunda, birbirinden farklı grupların belirlenmesi için post-hoc ikili analizler gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizlerin özeti **Tablo 2, 3, 4 ve 5'te** verilmiştir.

**YAP'ın boyanma düzeyinin karşılaştırılması:** Tablo 2'de YAP'ın boyanmasının median değerleri ve p-değerleri verilmiştir.

**YAP'ın boyanmasının benign, PIN ve tümör hücrelerinin sitoplazmalarında karşılaştırılması:** 0.005 p-değeri ile YAP'ın boyanması benign, PIN ve tumor hücrelerinin sitoplazmalarında farklılık göstermektedir. Post-hoc ikili karşılaştırma analizleriyle; tümörlü ve PIN hücrelerin sitoplazmasında YAP'ın boyanmasının, benign hücrelerin sitoplazmasından daha az olduğu görülmüştür.

**YAP'ın boyanmasının benign, PIN ve tümör hücrelerinin çekirdeklerinde karşılaştırılması:** 0.004 p-değeri ile YAP'ın boyanması benign, PIN ve tümör hücrelerinin çekirdeklerinde farklılık göstermektedir. Post-hoc ikili karşılaştırma analizleriyle; tümörlü ve PIN hücrelerin çekirdeğinde YAP'ın boyanmasının, benign hücrelerin çekirdeğinden daha az olduğu görülmüştür.

**Tümör hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında YAP boyanmasının karşılaştırılması:** Tümör hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında YAP'ın boyanma miktarı açısından bir fark yoktur. (p-değeri:0.741)

**Benign hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında YAP boyanmasının karşılaştırılması:** Benign hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında YAP'ın boyanma miktarı açısından bir fark yoktur. (p-değeri:0.714)

**PIN hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında YAP boyanmasının karşılaştırılması:** PIN hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında YAP'ın boyanma miktarı açısından bir fark yoktur. (p-değeri:0.6819)

**Tablo 2.** YAP'ın farklı örneklerde (benign, PIN, tümör) ve hücresel yapılarda boyanma dağılımı

|          |             | Benign | PIN   | Tümör | p-değeri |
|----------|-------------|--------|-------|-------|----------|
| YAP      |             |        |       |       |          |
|          | Sitoplazmik | 3      | 2     | 2     | 0.005    |
|          | Nükleer     | 3      | 2     | 2     | 0.004    |
| p-değeri |             | 0.714  | 0.681 | 0.741 |          |

**pYAP'ın boyanma düzeyinin karşılaştırılması:** Tablo 3'de pYAP'ın boyanmasının median değerleri ve p-değerleri verilmiştir.

**pYAP'ın boyanmasının benign, PIN ve tümör hücrelerinin sitoplazmalarında karşılaştırılması:** 0.077 p-değeri ile benign, PIN ve tümör hücrelerinin sitoplazmalarında pYAP miktarı farklılık göstermemektedir.

**pYAP'ın boyanmasının benign, PIN ve tümör hücrelerinin çekirdeklerinde karşılaştırılması:** 0.5749 p-değeri ile pYAPın boyanması benign, PIN ve tümör hücrelerinin çekirdeklerinde farklılık göstermemektedir. Literatürle uyumlu şekilde pYAPın boyanma düzeyi 0 olarak belirlenmiştir ve çekirdekte bulunmamaktadır.

**Tümör hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında pYAP boyanmasının karşılaştırılması:** 0'a yakın bir p-değeri ile tümör hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında pYAPın boyanma miktarı önemli farklılık göstermektedir.

**Benign hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında pYAP boyanmasının karşılaştırılması:** 0'a yakın bir p-değeri ile benign hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında pYAP'ın boyanma miktarı önemli farklılık göstermektedir.

**PIN hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında pYAP boyanmasının karşılaştırılması:** 0'a yakın bir p-değeri ile PIN hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında YAP'ın boyanma miktarı açısından önemli bir fark göstermektedir.

**Tablo 3.** pYAP'ın farklı örneklerde (benign, PIN, kanser) ve hücresel yapılarda boyanma dağılımı

| pYAP            |                    | Benign | PIN | Tümör | p-değeri |
|-----------------|--------------------|--------|-----|-------|----------|
|                 | <b>Sitoplazmik</b> | 1      | 1   | 1     | 0.077    |
|                 | <b>Nükleer</b>     | 0      | 0   | 0     | 0.05749  |
| <b>p-değeri</b> |                    | 0.0    | 0.0 | 0.0   |          |

**pYAP ve YAP'ın boyanmasının karşılaştırılması:** Bütün hücre tipleri için (benign, PIN, tümör); hem sitoplazma hem de çekirdekte YAP ile pYAPın boyanma miktarları birbirinden farklılık göstermektedir. Tablo 4'te median boyanma değerleri ve p-değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 4.** YAP ve pYAP'ın boyanma dağılımının karşılaştırılması

|               |      | sitoplazmik | nükleer |
|---------------|------|-------------|---------|
| <b>benign</b> |      |             |         |
|               | YAP  | 3           | 3       |
|               | pYAP | 1           | 0       |
| p-değeri      |      | 0.0         | 0.0     |
| <b>PIN</b>    |      |             |         |
|               | YAP  | 2           | 2       |
|               | pYAP | 1           | 0       |
| p-değeri      |      | 0.0         | 0.0     |
| <b>kanser</b> |      |             |         |
|               | YAP  | 2           | 2       |
|               | pYAP | 1           | 0       |
| p-değeri      |      | 0.0         | 0.0     |

**YAP boyanması ve klinikopatolojik parametreler arasında regresyon analizi:** YAP'ın boyanması ile klinikopatolojik parametreler arasında karşılaştırma yapmak için ordinal regresyon analizi yapılmıştır. Karşılaştırma yapılan klinikopatolojik parametreler: perinöral

invazyon (PN inv), cerrahi sınır (CS), ekstraprostatik ekstensiyon (yayılım) (EPE), seminal vezikül tutulum (SV tutulum)'dur. Tablo 5'te gösterilmektedir. Tümör hücrelerinde YAP'ın hem sitoplazmik hem de nükleer boyanması ile EPE arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. YAP'ın fazlalığı durumunda, ekstraprostatik yayılım 3.61 kat artmıştır.

**Tablo 5.** İmmünohistokimyasal boyama yapılan doku örneklerinin klinikopatolojik özellikleri

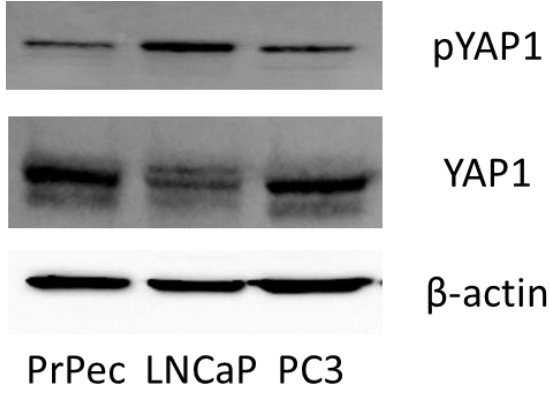
|                     |         | Örnek sayısı<br>(N=54) | p-değeri                | Görelî orantı<br>(Odd ratio) |
|---------------------|---------|------------------------|-------------------------|------------------------------|
| <b>PN inv</b>       |         |                        |                         |                              |
|                     | pozitif | 37                     |                         |                              |
|                     | negatif | 17                     |                         |                              |
| <b>CS</b>           |         |                        |                         |                              |
|                     | pozitif | 18                     |                         |                              |
|                     | negatif | 36                     |                         |                              |
| <b>Gleason skor</b> |         |                        |                         |                              |
|                     | ≤7      | 32                     |                         |                              |
|                     | >7      | 22                     |                         |                              |
| <b>EPE</b>          |         |                        | 0.037 (YAP boyanma ile) | 3.61                         |
|                     | pozitif | 15                     |                         |                              |
|                     | negatif | 39                     |                         |                              |
| <b>SV tutulum</b>   |         |                        |                         |                              |
|                     | Pozitif | 11                     |                         |                              |
|                     | negatif | 43                     |                         |                              |

PN inv:perinöral invazyon, CS: cerrahi sınır, EPE: ekstraprostatik yayılım , SV tutulum: seminal vezikül tutulum

## 4.2 PROSTAT KANSERİ HÜCRE MODELLERİNDE ANALİZLER

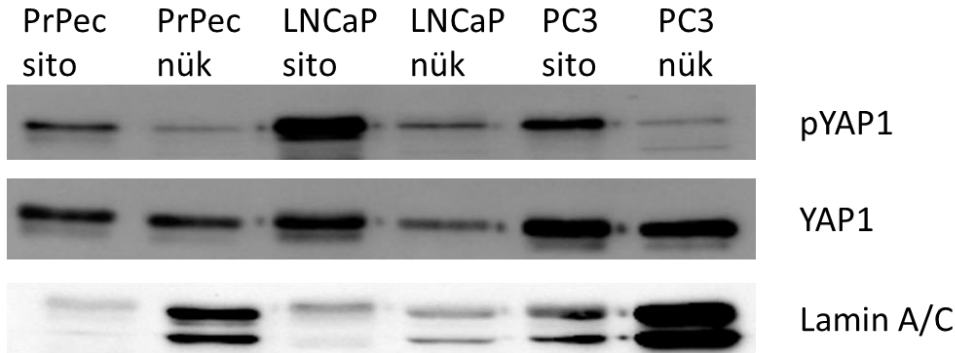
### 4.2.1 YAP ve pYAP proteinlerinin ekspresyon ve lokalizasyon analizleri:

Westernblot analizinde (Şekil 4 ) tüm hücre lizatlarında en yüksek YAP ekspresyonu PrePEC hücrelerinde görülürken, LNCaP hücrelerinde PC3 hücrelerine göre daha az YAP ekspresyonu görüldü. pYAP ekspresyonu LNCaP hücrelerinde diğer hücrelere göre daha fazla idi.



**Şekil 4.** PrePEC, LNCap ve PC3 hücrelerinden elde edilen tüm hücre lizatlarında YAP ve pYAP protein seviyeleri.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

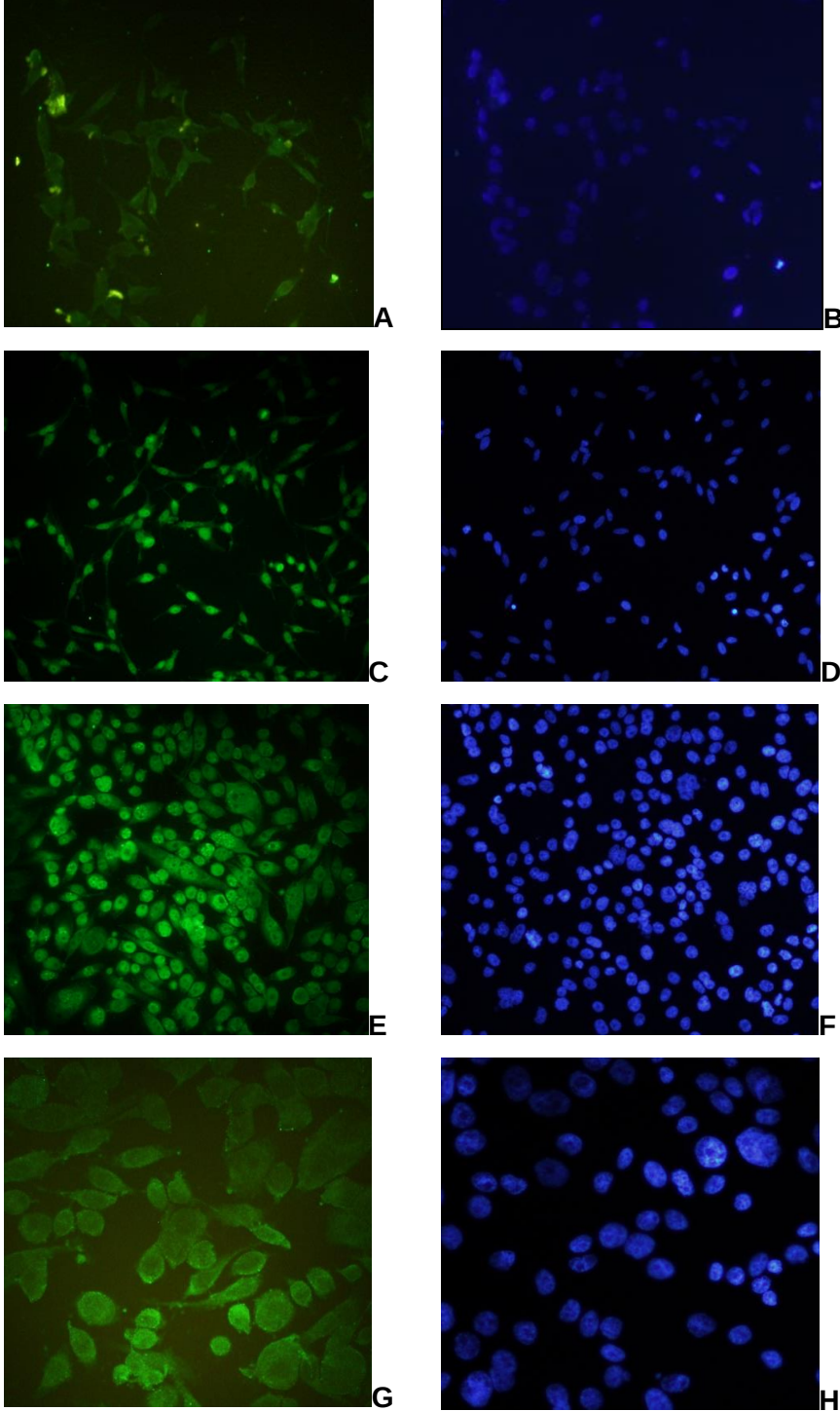
YAP ve pYAP'ın sitoplazmik ve nükleer dağılımının karşılaştırılması için yürütülen Şekil 5'teki SDS-page jel analizi sonuçlarına göre incelenen prostat kanseri hücrelerinde sitoplazma ve nükleusta YAP1 protein miktarı, AR pozitif LNCaP'lerde AR negatif PC3'lerden azdır. LNCaP'lerde, pYAP1 sitoplazmada hem PrePEC hem PC3 hücrelerine göre daha fazla olup, nükleusta hücreler arasında çok büyük farklılık gözlenmemiştir.

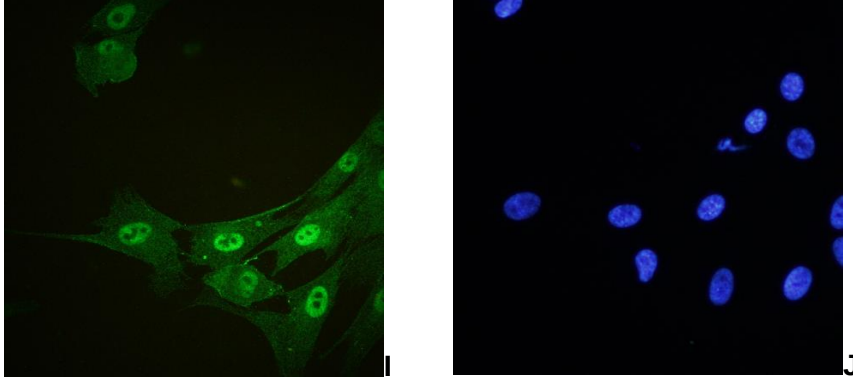


**Şekil 5.** YAP ve pYAP'ın, PrePEC, LNCaP ve PC3 hücrelerindeki sitoplazmik (sito) ve nükleer (nük) ekspresyonunun westernblot ile analizi. Lamin A/C nükleer fraksiyon yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

YAP ve pYAP'ın hücresel lokalizasyonu in-situ olarak immünofloresan yöntemle ayrıca incelenmiştir. İmmünofloresan yöntemi in-situ yani hücre yapısını koruyarak proteinlerin hücre içindeki lokalizasyonlarını belirlemede kullanılan çok önemli bir yöntemdir. Sitoplazmik/nükleer ekstraksiyon ve arkasından western blotlama ile de bir proteinin lokalizasyonu incelenmiştir. Ancak bu durumda hücresel yapıların bozulması gerekir. Şekil

6'da görüldüğü gibi LNCaP'de YAP daha çok nükleer lokalizasyon göstermektedir (Şekil 6C,D). PC3 (Şekil 6G,H) de ve PrePEC'de (Şekil 6I,J) ise hem sitoplazmik hem de nükleer dağılım görmek mümkündür. pYAP'ın de PC3 (Şekil 6E,F) ve LNCaP'de Şekil 6A,B) hem sitoplazmik hem de nükleer lokalizasyon gösterdiği belirlenmiştir.



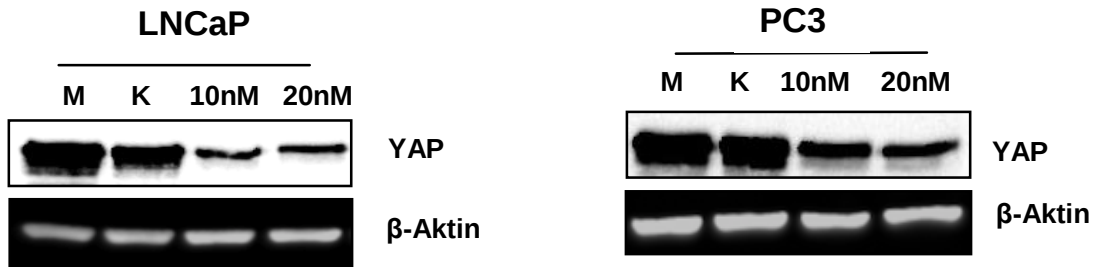


**Şekil 6.** YAP ve pYAP için immüno Floresan boyama.

A)LNCaP-pYAP, B)LNCaP-DAPI, C)LNCaP-YAP, D)LNCaP-DAPI, E)PC3-pYAP, F)PC3-DAPI, G)PC3-YAP, H)PC3-DAPI, I)PrePEC-YAP, J)PrePEC-DAPI.

#### 4.2.2 YAP'ın ekspresyonunun susturulması (knockdown edilmesi) ve fonksiyonel analizler:

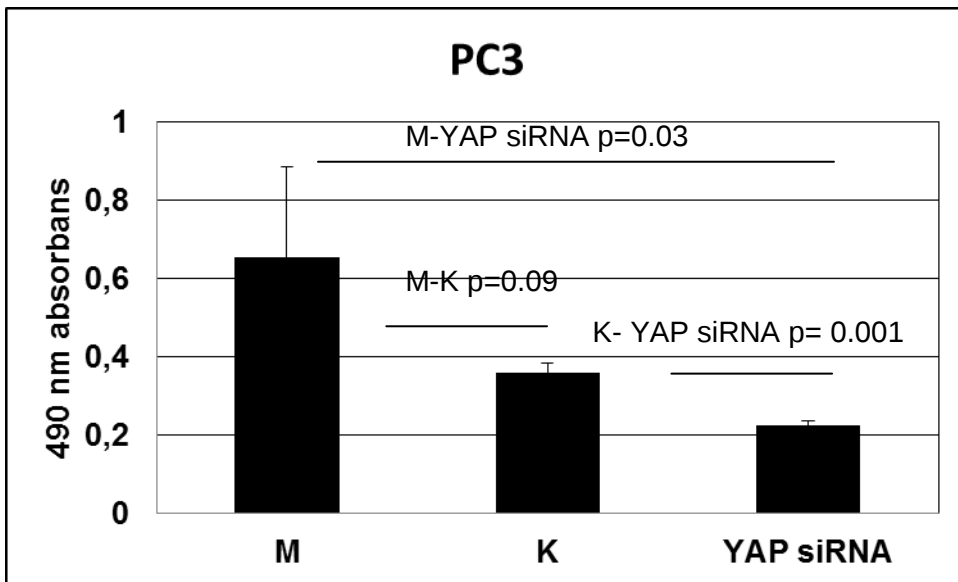
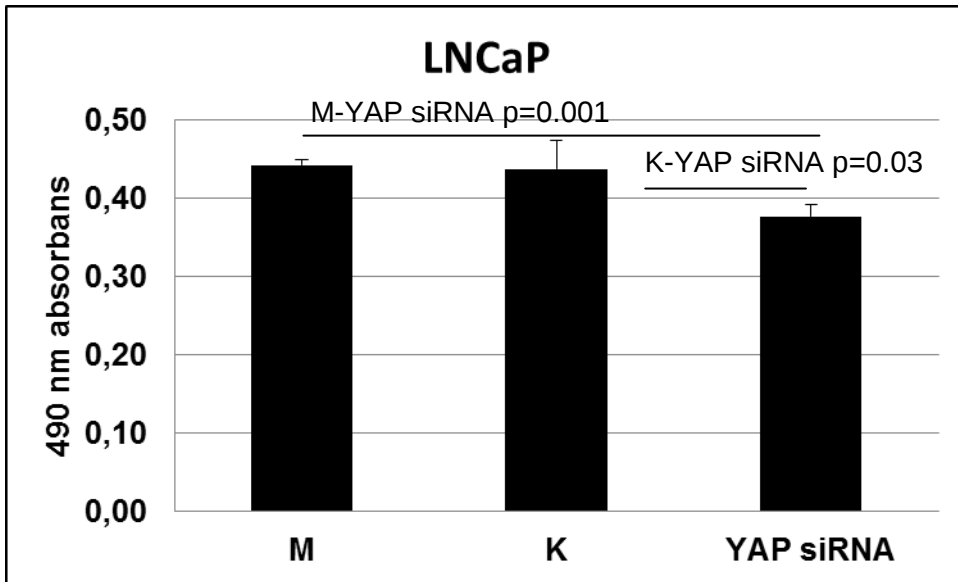
6 kuyucuklu hücre tabakalarında büyütülen LNCaP ve PC3 hücreleri % 80 hücre yoğunluğuna ulaştığında, YAP'a spesifik siRNA ve kontrol siRNA'lar ile Dharmafect 2 (Thermoscientific) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek transfekte edilmiştir. YAP'ın ekspresyonunun susturulması sırasında 10 ve 20 nM siRNA kullanılarak 72 saat sonra tüm hücre lizat eldesinde westernblot analizi ile YAP'ın susturulması kontrol edilmiştir. Şekil 7'de de görüldüğü gibi her iki siRNA konsantrasyonunda da protein ekspresyonunun inhibe edildiği gözlenmiştir. siRNA'ların hücrelerde efektif olarak çalıştığı doğrulandıktan sonra iş paketinde belirtilen çalışmalara başlanmıştır.



**Şekil 7.** YAP'a spesifik siRNA ile LNCaP ve PC3 hücrelerinde YAP'ın ekspresyonunun susturulmasının westernblot analizi. Mock (M) ve Scramble (K) siRNA'lar kontrol amaçlı kullanılmıştır.

### Hücre canlılığına olan etkisi:

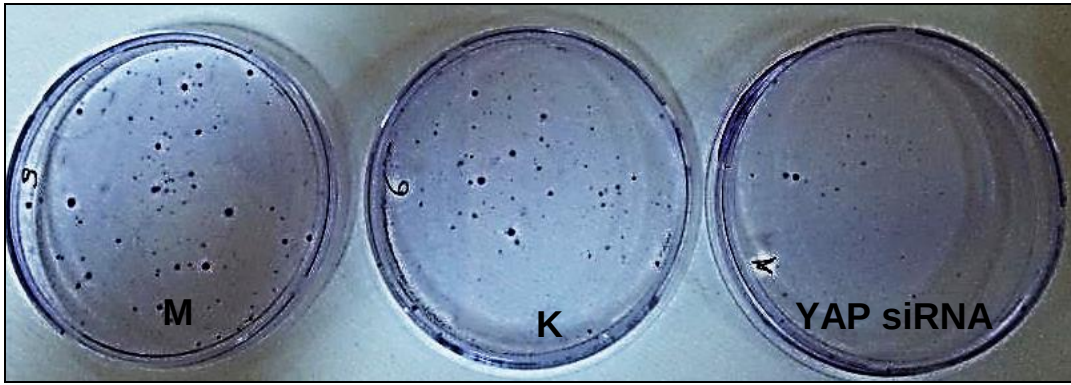
YAP'a spesifik siRNA transfekte edilmiş LNCaP hücrelerinin proliferasyonu, mock ( $p=0.03$ ) ve kontrol grubu ( $p=0.03$ ) siRNA kullanılan LNCaP hücrelerine göre azaldı (Şekil 8). PC3 hücrelerinin proliferasyonunda da YAP siRNA kullanıldığında mocka göre anlamlı derecede ( $p=0.001$ ) azalma görüldü. Yine aynı hücrelerde kontrol grubu siRNA kullanıldığında da proliferasyonda mocka göre görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0.09$ ). Kontrol grubuna göre YAPsiRNA'da izlenen azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0.001$ ). Sonuç olarak hem LNCaP hem de PC3'de YAP'ın siRNA ile ekspresyonunun susturulmasının hücrelerde canlılığı azalttığı tespit edildi.



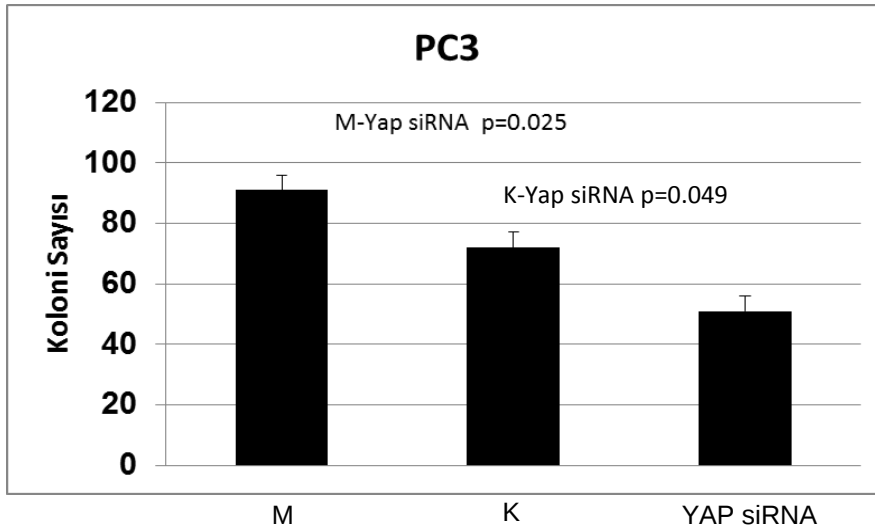
**Şekil 8.** YAP siRNA'nın LNCaP ve PC3 hücrelerinde proliferasyona olan etkisinin MTS ajanı kullanılarak ölçülmesi. Mock (M), scramble siRNA (K siRNA), YAP'a spesifik siRNA (YAPsiRNA). ( $p \leq 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.)

**Monolayer koloni oluşumuna olan etkisi:**

Deney sonucuna göre YAP siRNA ile transfekte olan PC3 hücrelerinin koloni oluşturma özelliklerinin mock ( $p=0.025$ ) ve kontrol ( $p=0.049$ ) grubuna göre anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (Şekil 9, 10).



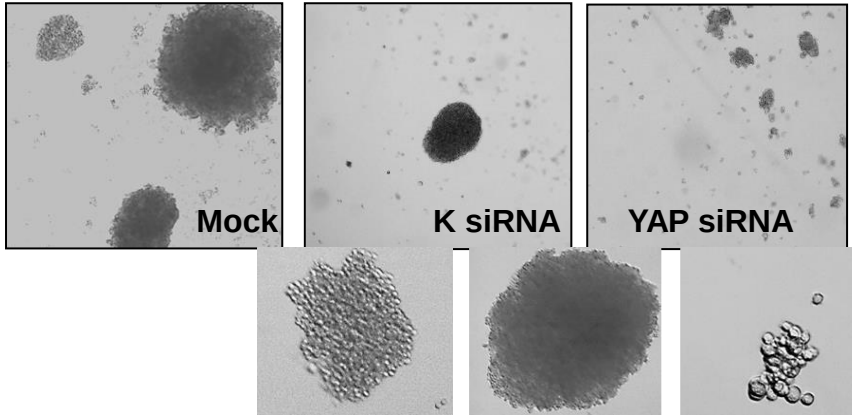
**Şekil 9.** YAP siRNA'nın PC3 hücrelerinin klonojenitesine olan etkisi. Koloniler sabitlenerek, kristal viole boyası ile boyanmıştır. Mock (M), scramble siRNA (K siRNA), YAP'a spesifik siRNA (YAPsiRNA).



**Şekil 10.** Koloni formasyonunun ölçüm grafiği. Mock (M), scramble siRNA (K), YAP'a spesifik siRNA (YAPsiRNA) kullanımı PC3 hücrelerinin koloni oluşumuna olan etkisi koloniler sayılarak hesaplanmıştır ( $p \leq 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.)

### **Soft agar koloni oluşumuna etkisi:**

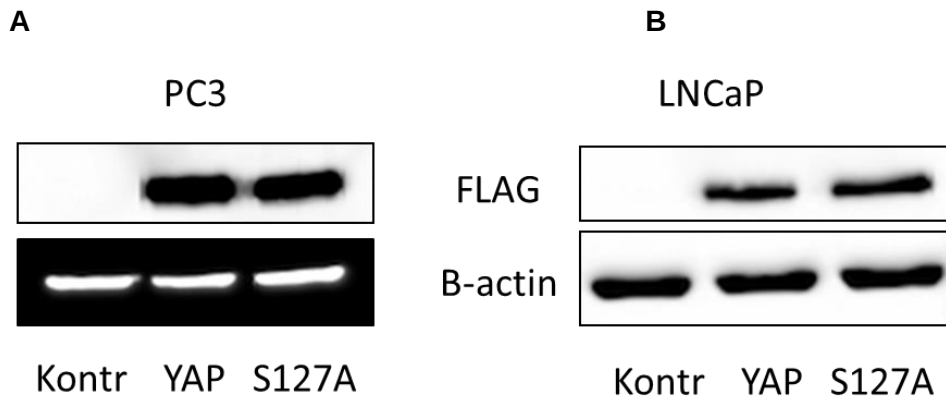
Sonuçlara göre, mock grubunda daha fazla sayıda ve daha büyük koloniler gözlemlendi. Kontrol grubunda da YAP siRNA ile transfekte edilen PC3 hücrelerine göre daha fazla sayıda ve daha büyük koloniler tespit edildi. En az sayıda ve en küçük koloniler YAP siRNA transfekte edilen hücrelerde görüldü (Şekil 11). Bu sonuçlar YAP'ın ekspresyonunun susturulmasının koloni oluşumunu negatif olarak etkilediğini göstermektedir.



**Şekil 11.** Soft agar koloni oluşumu. Mock (M), scramble siRNA (KsiRNA), YAP'a spesifik siRNA (YAPsiRNA) transfekte edilmiş PC3 hücrelerinin ayrı hücre tabaklarındaki 20X büyütmedeki koloni oluşumları görüntülenmiştir.

### **4.2.3 YAP ve YAPS127A'nin overekspres edilmesi ve fonksiyonel analizler:**

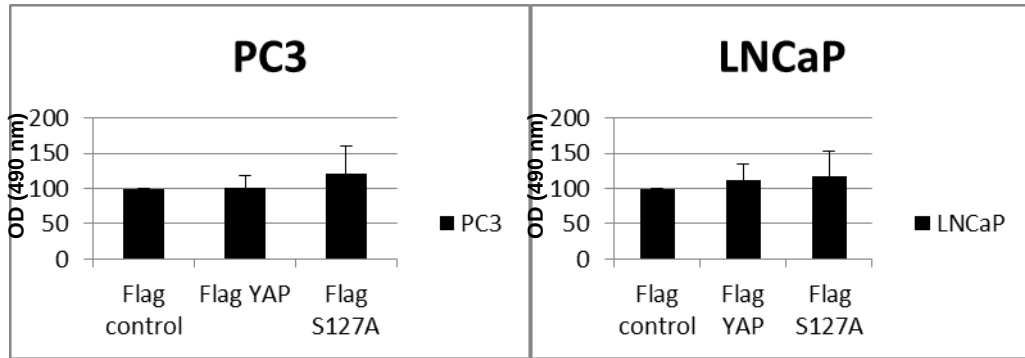
PC3 (Şekil 12A) ve LNCaP (Şekil 12B) hücrelerinde FLAG işaretli YAP ve YAPS127A proteinlerinin ekspresyonu westernblot analizi ile gösterilmiştir. Daha sonra aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.



**Şekil 12.** Western blot ile YAP ve YAPS127A'nın overekspresyonlarının gösterilmesi. A)PC3, B)LNCaP (Kontr.-kontrol vektör, YAP-FLAGYAP plazmidi, S127A-FLAGS127A plazmidi).

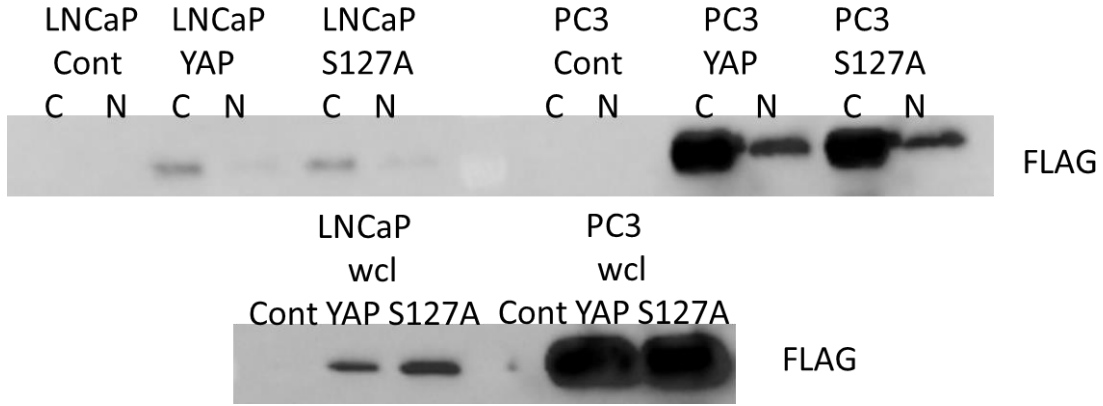
**Hücre canlılığına olan etkisi:**

Ekspresyon için kullanılan plasmid transfekte edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 13'te gösterilmektedir. Hem PC3 hem de LNCaP için YAP S127A overeksprese edildiğinde hücre canlılığında artma olduğu görülmektedir. Bu da YAP'ın aktif olmasının kanser hücrelerinin çoğalmasına sebep olduğuna işaret etmektedir.



**Şekil 13.** YAP veya YAPS127A'nın 48 saat overekspresyonundan sonra MTS ile hücre canlılığının belirlenmesi. PC3 ve LNCaP hücreleri kullanılmıştır.

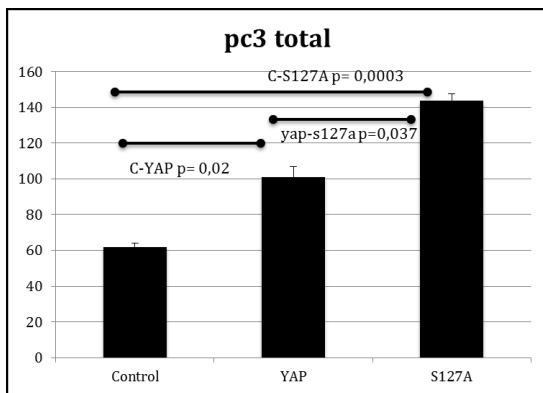
**Hücredeki lokalizasyona olan etkisi:** FLAG-YAP ve FLAG-YAPS127A plazmidi ile transfekte edilen LNCaP ve PC3 hücrelerinden nükleer ve sitoplazmik lizatlar elde edilerek proteinlerin ektopik ekspresyonu FLAG antikoru uygulanarak westernblot analizi ile tespit edilmiştir. PC3'de ekspresyon LNCaP'e göre daha fazladır. Her iki hücre hattında FLAG işaretli proteinler daha çok sitoplazmada yer almakta olup, nükleusa az bir miktarının geçebildiği görülmüştür (Şekil 14).



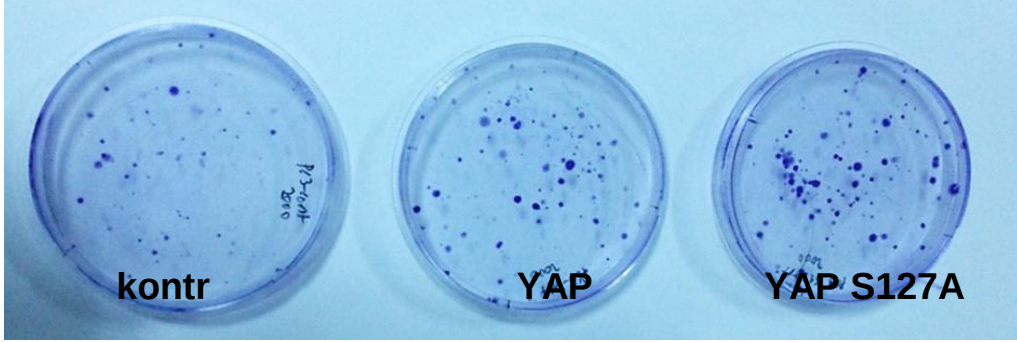
**Şekil 14.** YAP ve YAP S127A'nın overekspresyondan sonra hücre içindeki lokalizasyonlarının western blot ile gösterilmesi. (Cont:Kontrol, C:Sitoplazmik, N:Nükleer, wcl: total hücre lizati)

**Monolayer koloni oluşumuna olan etkisi:** LNCaP hücrelerinde koloni oluşumu gözlenmemiştir. PC3 hücrelerinde FLAG-YAP ve FLAG-YAPS127A ekspresyonu yapılan hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde fazla koloni sayılmıştır (Şekil 15). Ayrıca FLAG-YAPS127A mutantının koloni oluşumunu daha fazla arttırdığı gözlenmiş olup, literatürle uyumlu bir şekilde YAP'ın fosforile olamadığı için nükleusa geçtiğini ve transkripsiyonu aktive ettiğini düşündürmektedir.

**A**



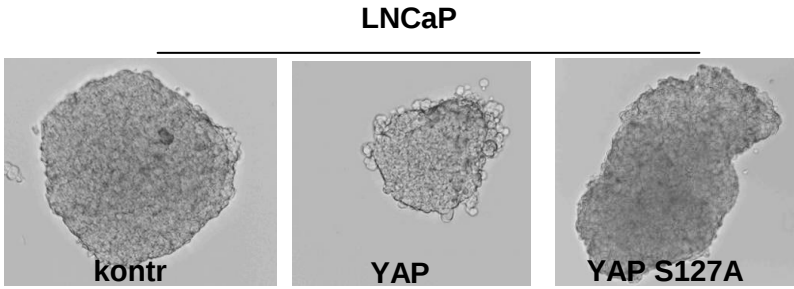
**B**



**Şekil 15.** FLAG-YAP veya FLAG-YAP S127A'nın overekspresyonunun monolayer koloni oluşumuna etkisi. A) Sayılan kolonilerin grafik olarak ifadesi, B) Monolayer kolonilerin temsili resmi.

**Soft agar koloni oluşumuna etkisi:**

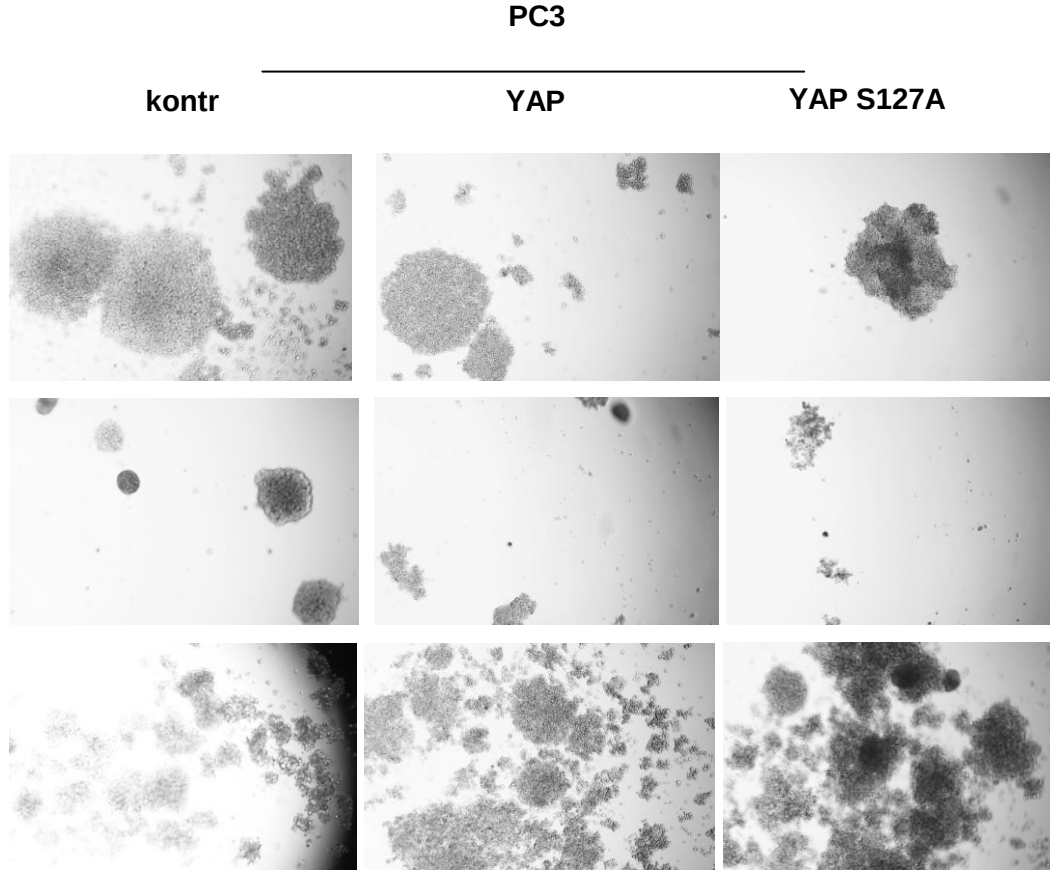
LNCaP hücrelerinde FLAG-YAP ve FLAG-YAPS127A ekspresyonu yapılan hücrelerde kontrol grubuna göre koloni sayısı açısından bir fark gözlenmemiştir. FLAG-YAP ekspresyonu yapılan hücrelerde oluşan kolonilerin büyüklüğü kontrol grubuna göre daha küçüktür (Şekil 16). Androjene duyarlı, AR+ LNCaP hücrelerinde YAP'ın tümör oluşumunu engelleyici bir özelliği olabileceğini düşündürmektedir.



**Şekil 16.** FLAG-YAP veya FLAG-YAP S127A'nın overekspresyonunun LNCaP hücrelerinde soft agar koloni oluşumuna etkisi.

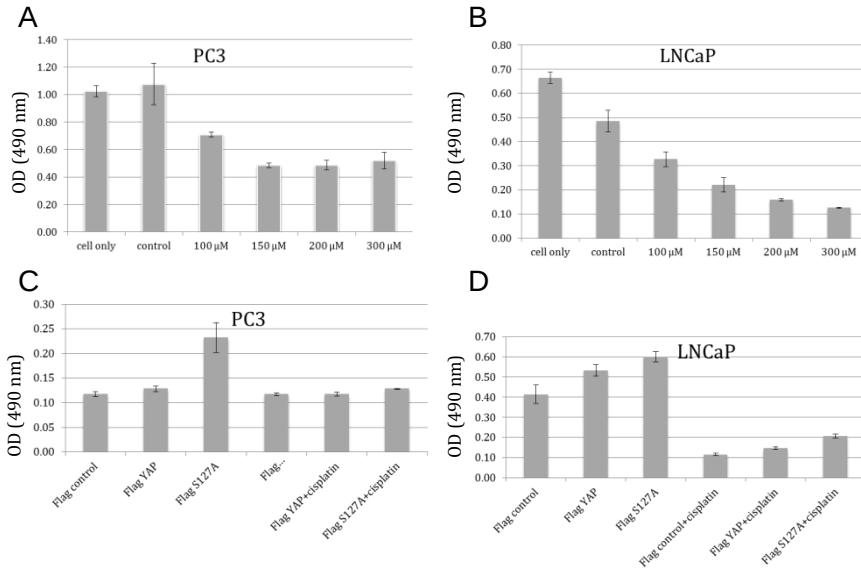
PC3 hücrelerinde FLAG-YAP ve FLAG-YAPS127A ekspresyonu yapılan hücrelerde kontrol grubuna göre koloni büyüklüğü ve sayısı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 17). Westernblot analizlerinde overeksprese edilen proteinlerin daha çok sitoplazmada lokalize olduğu görülmektedir. Literatürde sitoplazmik YAP'ın fosforile edilerek degrade olduğu ya da 14-3-3 bağlanma proteinleri ile bağlanıp sitoplazmada tutulduğu bilinmektedir. Nükleusa geçmeyen YAP böylelikle proliferasyonu ya da tümörögenezi aktive

edemeyecektir. Mutant YAP'ın de çoğunlukla sitoplazmada kaldığı için fosforlanmasa dahi nükleer fonksiyonunu yerine getiremediği düşünülmüştür.



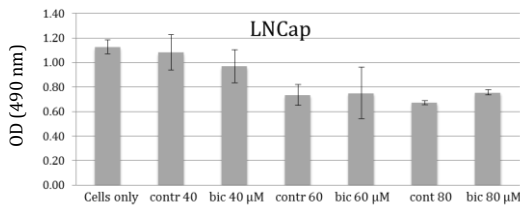
**Şekil 17.** FLAG-YAP veya FLAG-YAP S127A'nın overekspresyonunun PC3 hücrelerinde soft agar koloni oluşumuna etkisi.

**Sisplatin ve bicalutamide ile muamele edilmesinin hücre canlılığına olan etkisi:** LNCaP ve PC3 hücreleri için apoptozu tetikleyen bir kemoterapötik ajan olan sisplatin için IC<sub>50</sub> değeri PC3 için 150 µM LNCaP için 100 µM olarak bulunmuştur (Şekil 18A,B). Bu miktar hücre canlılığının araştırıldığı durumlarda kullanılan çalışmalardaki miktarın üstündedir. Çalışmamızda çözücü olarak %0.9'luk NaCl kullanılmıştır. Bu da sisplatin için iyi bir çözücü olmadığını düşündürmektedir. Ancak kullanılan miktar hücrelerde apoptozun indüklendiği miktar ile aynıdır ve ilaçla muameleyi 72 saat sürdürdüğümüz için 24 saatlik süre içerisinde gözlenen hücre canlılığındaki etkisini göremiyor olmamız muhtemeldir. PC3 hücrelerinde FLAGYAP ekspresyonu sonrasında kullanılan sisplatin bir etki göstermezken (Şekil 18C), FLAG S127A ekspresyonunun olduğu durumda sisplatin uygulaması hücre canlılığını azaltmıştır (Şekil 18 C). Bu durum nükleer YAP'ın hücrelerde sisplatine duyarlılığı arttırdığını düşündürmektedir.



**Şekil 18.** Prostat kanseri hücrelerinin sisplatin ile muamele edilmesi ve YAP overekspresyonunun sisplatin muamelesine etkisi. A) PC3 B) LNCaP hücreleri artan konsantrasyonda sisplatin ile 72 saat muamele edilmiş ve MTS ile canlılıkları belirlenmiştir. C) PC3 D) LNCaP hücrelerinde YAP veya YAP S127A 48 saat overeksprese edildikten sonra sisplatin ile 48 saat boyunca muamele edilmiş ve MTS ile canlılıkları belirlenmiştir.

Androjen reseptör pozitif LNCaP hücreleri anti-androjen ajan olan bicalutamide ile muamele edilmişlerdir. Kontrol grubu olarak DMSO uygulanmış hücreler kullanılmıştır. Artan konsantrasyona rağmen LNCaP'in hücre canlılığına olan herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 19). Bu yüzden YAP ve YAPS127A overekspresyonu varlığında bicalutamide uygulamasının hücre canlılığına olan etkisine bakılmamıştır.

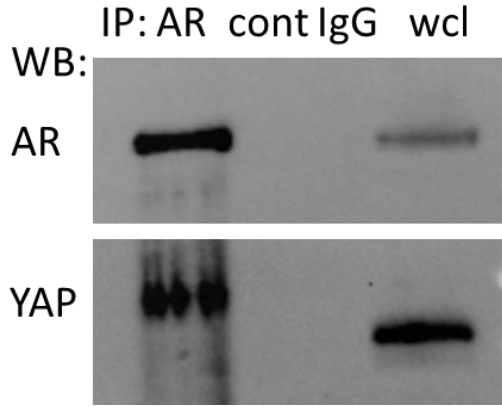


**Şekil 19.** Prostat kanseri hücrelerinin bicalutamide ile muamele edilmesi LNCaP hücreleri 24 saat serumsuz besi yerinde tutulduktan sonra 48 saat artan dozlarda bicalutamide ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığı MTS ile belirlenmiştir.

#### 4.2.4 YAP ve androjen reseptörü (AR) arasındaki ilişkinin araştırılması:

##### Protein kompleksi oluşumunun tespit edilmesi:

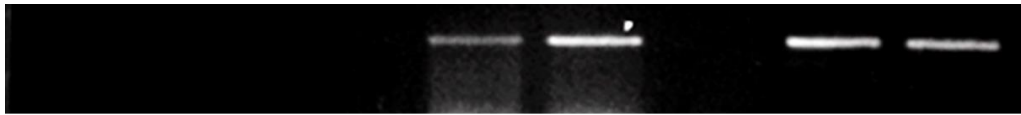
Ko-immüno çöktürme (co-IP) ve westernblot yöntemi ile LNCaP hücrelerinde YAP ve AR arasında protein kompleksi oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 20).



**Şekil 20.** AR ve YAP proteinlerinin LNCaP hücrelerinde koimmünopresipitasyonu. LNCaP hücrelerinden hazırlanan hücre lizatları AR antikoru ile çöktürülmüştür. Oluşan immünopresipitatta AR ve YAP proteinleri western blot ile incelenmiştir. (wcl: total hücre lizatı, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.)

##### ChIP (Kromatin immüno çöktürme) yöntemi ile genomik düzeyde tespiti:

ChIP yöntemine göre YAP androjen reseptörü transkripsiyon kompleksine yerleşik olarak görülmüştür (Şekil 21).



cont-AR cont-YAP cont-IgG DHT-AR DHT-YAP DHT-IgG cont-input DHT-input

**Şekil 21.** LNCaP hücrelerinde ARE1 genomik bölgesine YAP ve AR'ın bağlanması ChIP yöntemiyle gösterilmesi. LNCaP hücreleri DHT ile 2 saat muamele edildikten sonra AR ve YAP antikorları ile kromatin immünopresipitasyon (ChIP) gerçekleştirilmiştir. ARE1 bölgesi için spesifik primerler ile PCR yapılmıştır. (Cont-IgG negatif kontrol olarak kullanılmıştır.)

## 5. SONUÇ

Çalışmamızda, LNCaP ve PC3 prostat kanseri hücre soylarında fonksiyon kaybına dayalı analizler YAP'ın tümör indükleyici bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Fonksiyon kazanımına dayalı analizlerde de hücre canlılığı ve klonojenite deneyleri de aynı sonuçları vermiştir. Yalnızca soft agar koloni oluşumunda bir fark gözlenmemiştir. Bu durum over-ekspresyonumuzun kalıcı (stable) olmayıp geçici (transient) olmasından kaynaklanıyor olabilir.

YAP1'in ekspresyonu tüm hücre lizatlarında en fazla primer prostat epitel hücrelerinde iken, LNCaP hücrelerinde PC3 hücrelerine göre daha az YAP1 ekspresyonu görülmüştür. Yine tüm hücre lizatlarında pYAP ekspresyonu LNCaP hücrelerinde diğer hücelere göre daha fazla tespit edilmiştir. Sitoplazma ve nükleusta YAP1 protein miktarı, AR pozitif LNCaP'lerde AR negatif PC3'lerden azdır. LNCaP'lerde, pYAP1 sitoplazmada hem PrePEC hem PC3 hücrelerine göre daha fazla olup, nükleustaki ekspresyonda hücreler arasında çok büyük farklılık gözlenmemiştir.

İnsan prostat kanseri dokusu örneklerinde, YAP1'in ekspresyonu sitoplazma ve nükleusta tümöre komşu normal dokuda, PIN ve tümör dokusuna göre daha fazla görülmüştür. pYAP'ın sitoplazmadaki boyanma derecesi de tümöre komşu normal dokuda PIN ve tümör dokusuna göre yüksektir. Tüm doku çeşitlerinde pYAP nükleusta boyanmamıştır.

Tümör dokularında, karşılaştırma yapılan klinikopatolojik parametrelerden yalnızca ekstraprostatik ekstensiyon (EPE) ile YAP'ın boyanması arasında bir ilişki gözlenmiştir. YAP'ın hem sitoplazmik hem de nükleer boyanması ile EPE arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. YAP'ın fazlalığı durumunda, ekstraprostatik yayılım 3.61 kat artmıştır. Bu durum YAP'ın prostat kanseri migrasyonu ve invazyonunda bir rolü olduğunu düşündürmektedir. YAP1'in PC3'de siRNA ile susturulması sonrası migrasyon ve invazyonun azalması da klinikte gördüğümüz sonucu destekler niteliktedir (sonuç gösterilmedi).

Yaptığımız çalışma YAP'ın prostat kanseri tümörögenezinde bir rolü olduğunu kanıtlamaktadır. Primer prostat epitel hücrelerinde YAP'ın ekspresyonu fazla iken, en az ekspresyon LNCaP hücrelerinde görülmüştür. PC3'de ekspresyonu da LNCaP'e göre fazladır. Bu durum prostat kanserinde YAP'ın regülasyonunun bozulduğunu

düşündürmektedir. Ayrıca EPE'nin olduğu durumlarda YAP'ın ekspresyonunun fazla olması bu proteinin prostat kanseri metastazında bir fonksiyonu olabileceğini ve hatta metastaz için bir marker olarak kullanılabileceği fikrini doğurmuştur.

YAP ve AR arasında bir protein kompleksi olduğu bulunmuştur. Ayrıca YAP, -170'inci pozisyonundaki (ARE1- androgen response elements 1) PSA (prostate specific antigen) proksimal promotöründe aktif androjen reseptörü bağlanma bölgesindeki transkripsiyon kompleksine yerleşik olarak görülmüştür. Bu sonuç YAP'ın androjen reseptörünün sorumlu olduğu genlerin transkripsiyonunda bir ko-aktivatör olabileceği fikrini çağrıştırmaktadır.

İlerleyen dönemdeki çalışmalarda YAP'ın gerçekten metastazı etkileyip etkilemediğini anlamak için EMT (epitelyal mezenkimal değişim) belirteçlerindeki değişimlere bakılması planlanmaktadır. Ayrıca ilaç yeniden konumlandırılması (drug repositioning ile) klinikte başka amaçlarla kullanılan ilaçlar ya da klinikte kullanılmayıp etki mekanizması bilinen inhibitörleri potansiyel metastaz inhibitörü olarak kullanıp YAP'ın etkisini azaltmayı sağlayacak ilaç/kimyasal bulunması çalışmaları da öngörülmektedir.

## KAYNAKLAR LİSTESİ

1. Agarwal, N., Sonpavde ,G., Sternberg, C.N. 2012. “Novel Molecular Targets for the Therapy of Castration- Resistant Prostate Cancer”, *Eur Urol.*, 61, 5, 950-60.
2. Bai, H., Gayyed, M.F., Lam-Himlin, D.M., Klein, A.P., Nayar, S.K., Xu, Y., Khan, M., Argani, P., Pan, D., Anders, R.A. 2012. “Expression of Yes-associated protein modulates Survivin expression in primary liver malignancies”, *Hum Pathol.*, 43,9, 1376-85.
3. Baia, G.S., Caballero, O.L., Orr, B.A., Lal, A., Ho, J.S., Cowdrey, C., Tihan, T., Mawrin, C., Riggins, G.J. 2012. “Yes-associated protein 1 is activated and functions as an oncogene in meningiomas”, *Mol Cancer Res.*, 10(7), 904-13.
4. Center, M.M., Jemal, A., Lortet-Tieulent, J., Ward, E., Ferlay, J., Brawley, O., Bray, F. 2012. “International variation in prostate cancer incidence and mortality rates”, *Eur Urol.*, 61,6,1079-92.
5. Diep, C.H., Zucker, K.M., Hostetter, G., Watanabe, A., Hu, C., Munoz, R.M., Von Hoff, D.D., Han, H. 2012. “Down regulation of Yes Associated Protein 1 expression reduces cell proliferation and clonogenicity of pancreatic cancer cells”, *PLoS One.*, 7(3):e32783.
6. Fernandez, L.A., Northcott, P.A., Dalton, J., Fraga, C., Ellison, D., Angers, S., Taylor, M.D., Kenney, A.M. 2009. “YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation”, *Genes Dev.* , 23, 2729–2741.
7. Franken, N.A.P., Hans M Rodermond, H.M., Stap, J., Jaap Haveman, J., Bree, C.V. 2006. “Clonogenic assay of cells in vitro”, *Nature Protocols*, 1,5, 2315 –2319.
8. Ge, L., Smail, M., Meng, W., Shyr, Y., Ye, F., Fan, K.H., Li, X., Zhou, H.M., Bhowmick, N.A. 2011. “Yes-associated protein expression in head and neck squamous cell carcinoma nodal metastasis”, *PLoS One.*, 6(11):e27529.
9. Halder, G. & Johnson, R. L. 2011. “Hippo signaling: growth control and beyond”, *Development*, 138, 9–22.

10. Hall, C.A., Wang, R., Miao, J., Oliva, E., Shen, X., Wheeler, T., Hilsenbeck, S.G., Orsulic, S., Goode, S. 2010. "Hippo Pathway Effector Yap Is an Ovarian Cancer Oncogene", *Cancer Res.* , 1;70(21), 8517-25.
11. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. 2010, "Cancer statistics", *CA Cancer J Clin.*, 60:277-300.
12. Kang, W., Tong, J.H., Chan, A.W., Lee, T.L., Lung, R.W., Leung, P.P., So, K.K., Wu, K., Fan, D., Yu, J., Sung, J.J., To, K.F. 2011. "Yes-Associated Protein 1 Exhibits Oncogenic Property in Gastric Cancer and Its Nuclear Accumulation Associates with Poor Prognosis", *Clin Cancer Res.*, 15;17(8):2130-9.
13. Liu, A.M., Wong, K.F., Jiang ,X., Qiao, Y., Luk, J.M. 2012. "Regulators of mammalian Hippo pathway in cancer", *Biochim Biophys Acta.*, 1826(2), 357-64.
14. Maluf, F. C., Smaletz, O., Herchenhorn, D. 2012. "Castration resistant prostate cancer: systemic therapy in 2012," *Clinics*, 67, 389–394.
15. Mullins, J. K., Loeb, S. 2012. " Enviromental exposures and prostate cancer", *Urol.Oncology*, 30(2):216-9.
16. Nishio, M., Otsubo, K., Maehama, T., Mimori, K., Suzuki, A. 2013. "Capturing the mammalian Hippo: Elucidating its role in cancer", *Cancer Science*,104(10), 1271-7.
17. Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G.A., Muir, B., Li, W., Sgroi, D.C., Deng, C.X., Brugge, J.S., Haber, D.A. 2006. "Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon", *Proc Natl Acad Sci U S A.*,103(33):12405-10.
18. Sarker, D., Reid, A.H., Yap ,T.A., de Bono, J.S. 2009. "Targeting the PI3K/AKT Pathway for the Treatment of Prostate Cancer", *Clin Cancer Res.*, 1, 15(15):4799-805.
19. Steinhardt, A.A., Gayyed, M.F., Klein, A.P., Dong, J., Maitra, A., Pan, D., Montgomery, E.A., Anders, R.A. 2008. "Expression of Yes-associated protein in common solid tumors", *Hum Pathol.*, 39, 1582–1589.

20. Tannock, I.F., de Wit, R., Berry, W.R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K.N., Oudard, S., Théodore, C., James, N.D., Turesson, I., Rosenthal, M.A., Eisenberger, M.A. 2004. “Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer”, *N Engl J Med.*, 351, 1502–12.
21. Vassilev, A., Kaneko, K.J., Shu, H., Zhao, Y., DePamphilis, M.L. 2001. “TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm”, *Genes Dev.*, 15, 1229–1241.
22. Vlug, E.J., van de Ven, R.A., Vermeulen, J.F., Bult, P., van Diest, P.J., Derksen, P.W. 2013. “Nuclear localization of the transcriptional coactivator YAP is associated with invasive lobular breast cancer”, *Cellular Oncology*, 36, 5, 375-384.
23. Wang, H., Du, Y.C., Zhou, X.J., Liu, H., Tang, S.C. 2013. “The dual functions of YAP-1 to promote and inhibit cell growth in human malignancy”, *Cancer Metastasis Rev.* (Epub ahead of print).
24. Yagi, R., Chen, L.F., Shigesada, K., Murakami, Y., Ito, Y. A. 1999. “WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator”, *EMBO J.*, 18, 2551–2562.
25. Yuan, M., Tomlinson, V., Lara, R., Holliday, D., Chelala, C., Harada, T., Gangeswaran, R., Manson-Bishop, C., Smith, P., Danovi, S.A., Pardo, O., Crook, T., Mein, C.A., N R Lemoine, N.R., Jones, L.J. and S Basu, S. 2008. “Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast”, *Cell Death and Differentiation* 15, 1752–1759.
26. Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., Mu, D., Lucito, R., Powers, S. and Lowe, S.W. 2006. “Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach”, *Cell*, 125, 1253–1267.
27. Zeng, Q., Hong, W. 2008. “The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals”, *Cancer Cell.*, 13(3), 188-92.

28. Zhang, H., Pasolli, H.A., Fuchs E. 2011. “Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2270–2275.
29. Zhao, B., Tumaneng, K., Guan, K.L. 2011. “The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal”, *Nat Cell Biol.*, 13, 877–883.
30. Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.C., Guan, K.L. 2007. “Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control”, *Genes Dev.*, 21, 2747–2761.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

|                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Proje Yürütücüsü:                       | Yrd. Doç. Dr. FİLİZ KISAAYAK ÇOLLAK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Proje No:                               | 114S419                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Proje Başlığı:                          | Prostat Kanseri Gelişiminde Hippo Sinyal İletim Sistemi Üyesi Yap (Yes-Associated Protein)'ın Rolünün Araştırılması                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Proje Türü:                             | 3501 - Kariyer                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Proje Süresi:                           | 24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Araştırmacılar:                         | SIDIKA ŞEYMA ÖZKANLI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Danışmanlar:                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: | İSTANBUL MEDENİYET Ü.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:  | 15/10/2014 - 15/10/2016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Onaylanan Bütçe:                        | 207000.0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Harcanan Bütçe:                         | 167221.24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Öz:                                     | <p>YAP (Yes associated protein) transkripsiyonu ko-aktif edici bir protein olup, insanda 11q22 kromozomunda yer alan Yap geni tarafından kodlanmaktadır. Yap, Hippo sinyal iletim sisteminde yer alan proteinlerden bir tanesidir. Hippo sinyal iletim sistemi tümör baskılayıcı bir sistem olup, hücrelerin çoğalması, büyüme, rejenerasyon gibi fizyolojik fonksiyonlarda da rolü gösterilmiştir.</p> <p>Hippo sinyal iletim sisteminin aktif olduğu durumda, Yap proteini fosforile edilmekte ve sitoplazmada 14-3-3 bağlama proteinleri tarafından bağlanmakta ya da parçalanmaktadır. Böylece Yap'ın çekirdeğe geçişi ve hücre çoğalmasını sağlayacak genlerin transkripsiyonu engellenmektedir. Hippo sinyal iletim sistemindeki düzensizlikler prostat kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserin tümörogenezi ve metastazıyla ilişkilendirilmiştir.</p> <p>Çalışmamızda prostat kanseri hücre modelleri ve insan prostat tümör dokusu kullanılmıştır. Yap proteininin ekspresyonu susturularak ya da doğal ve mutant formu over ekspres edilerek hücrenin canlılığına, koloni oluşturma kapasitesine, ankras bağımsız büyümesine olan etkisi incelenmiştir. Ayrıca over eksprese edildiği koşullarda sisplatin ve bicalutamide kullanımının hücrenin canlılığına olan etkisi ve tedaviye karşı direnç oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. Yap ve androjen reseptörü (AR) arasındaki etkileşim ko-immüno çöktürme ve ChIP metodları ile tetkik edilmiştir. İnsan prostat kanseri dokularında Yap ve fosforlanmış Yap'ın ekspresyonuna immünohistokimya ile bakılıp klinikopatolojik özellikler ile Yap'ın boyanma kuvveti arasındaki ilişki istatistiksel yöntemler ile karşılaştırılmıştır.</p> <p>Yap'ın ekspresyonu AR- PC3 hücrelerinde AR+ LNCaP hücrelerine göre daha fazla tespit edilmiştir. Yap'ın fonksiyon kaybı deneyleri hücre canlılığını ve hücre dönüşmesini (klonojenite ve soft agar koloni oluşumu) azaltmış, fonksiyon kazanımı deneylerinde fosfo mutant YAP<sup>S127A</sup>'nin ekspresyonu hücre canlılığını arttırmıştır. Bu durum prostat kanserinde Yap'ın tümörögenez de rolü olabileceğini düşündürmektedir. Yap ile AR protein kompleksi oluşturmakta ve Yap AR-kromatin kompleks oluşumunda yer almaktadır. İnsan prostat kanseri doku örneklerinde Yap'ın ekspresyonu kansere komşu normal dokuda kanser dokusuna göre daha fazla görülmüştür. Klinikopatolojik özelliklerden yalnızca ekstraprostatik yayılım ile ilişkili bulunmuştur. Yap'ın ekspresyonunun çok olduğu durumlarda ekstraprostatik yayılım daha fazla görülmüştür</p> |
| Anahtar Kelimeler:                      | Prostat kanseri, Yap, androjen reseptörü, Hippo sinyal iletim sistem                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:  | Hayır                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |