



Prostat Kanserinde Six Transmembrane Protein of Prostate 2 Gen Ekspresyonunun ve Hücre İçi Lokalizasyonunun Belirlenmesi

Determination of Six Transmembrane Protein of Prostate 2 Gene Expression and Intracellular Localization in Prostate Cancer

Dr. Bora İrer¹, Dr. Ömer Demir², Dr. Aykut Kefi², Dr. Güven Aslan²

¹Izmir Büyükşehir Belediyesi Eşrefpaşa Hastanesi, Üroloji Kliniği, İzmir, Türkiye

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Öz

Amaç: Çalışmamızda six transmembrane protein of prostate 2 (*STAMP2*) geninin RNA ve protein ekspresyon profilinin androjenlerle ilişkisinin ve *STAMP2*'nin hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesini amaçladık.

Gereç ve Yöntem: RNA ve proteinler androjen uygulanmış ve uygulanmamış prostat kanserinin lenf nodu (LNCaP) hücrelerinden, androjen reseptörü içermeyen DU145 hücrelerinden ve *STAMP2* transfekte edilmiş COS-7 hücrelerinden elde edildi. *STAMP2* geninin ekspresyon profili ve androjen uygulamasının *STAMP2* RNA ve protein düzeylerine etkisi northern blot ve western blot yöntemleri ile gösterildi. Ek olarak hem LNCaP hücrelerinde androjen uygulaması sonrası doğal olarak sentezlenen *STAMP2* proteininin hem de COS-7 hücrelerindeki transfekte *STAMP2* proteininin hücre içi lokalizasyonu immünfloresan mikroskopisi ile belirlendi.

Bulgular: LNCaP hücrelerinde *STAMP2* geninin RNA ve protein ekspresyonunun androjenlerle düzenlendiği ve androjen uygulama süresi arttıkça ekspresyon düzeyinin arttığı, androjen reseptörü içermeyen DU145 hücrelerinde *STAMP2* ekspresyonunun olmadığı saptandı. İmmünfloresan mikroskopisi incelemesi sonucunda *STAMP2* proteininin hücre içinde golgi cisimciğinde ve hücre membranında lokalize olduğu gözlemlendi.

Sonuç: *STAMP2* geni, prostat kanseri patogenezinde ve prostat kanserinin androjen bağımlı evreden androjen bağımsız evreye geçişinde önemli bir role sahip olabilir. Ayrıca hücre içinde golgi kompleksi ve hücre membranında lokalize olan *STAMP2* proteini prostat kanseri tanısı ve tedavisi için aday olabilecek yeni bir hedef molekül olabilir.

Anahtar Kelimeler: Prostat, prostat kanseri, six transmembrane protein of prostate 2

Abstract

Objective: In this study, we aimed to determine the relationship between the RNA and protein expression profile of six transmembrane protein of prostate 2 (*STAMP2*) gene and androgen and the intracellular localization of *STAMP2*.

Materials and Methods: RNA and protein were obtained from androgen treated lymph node carcinoma of the prostate (LNCaP) cells, untreated LNCaP cells, DU145 cells with no androgen receptor, and *STAMP2* transfected COS-7 cells. The expression profile of *STAMP2* gene and the effect of androgens on the expression was shown in RNA and protein levels by using Northern and Western blotting methods. In addition, intracellular localization of the naturally synthesized *STAMP2* protein and the transfected *STAMP2* protein in COS-7 cells after androgen administration in both LNCaP cells was determined by immunofluorescence microscopy.

Results: We found that the RNA and protein expression of *STAMP2* gene in LNCaP cells are regulated by androgens, the power of expression is increased with the duration of androgen treatment and there is no *STAMP2* expression in DU145 cells which has no androgen receptor. As a result of the immunofluorescence microscopy study we observed that *STAMP2* protein was localized at golgi complex and cell membrane.

Conclusion: In conclusion, we have demonstrated that *STAMP2* may play an important role in the pathogenesis of the prostate cancer and in the androgen-dependent androgen-independent staging of prostate cancer. In addition, *STAMP2* protein, which is localized in the intracellular golgi complex and cell membrane, may be a new target molecule for prostate cancer diagnosis and treatment.

Keywords: Prostate, prostate cancer, six transmembrane protein of prostate 2

Giriş

Prostat kanseri günümüzde Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da deri kanserlerinden sonra en sık tanı konan kanserdir ve erkekler arasında kansere bağlı ölüm nedenleri içinde üçüncü sırada yer almaktadır (1). Prostat kanseri yaşla birlikte görülme sıklığı artan bir hastalıktır ve erkeklerde yaşam beklentisinin artması bu hastalığı önemli bir medikal problem haline getirmiştir.

Androjenler prostat hücrelerinin normal çoğalmasında ve farklılaşmasında; prostat kanserinin gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadırlar (2). Androjen azaltıcı tedaviler prostat kanserinin gerilemesine yol açmaktadırlar (3). Fakat olguların çoğunda, birçok tedaviye rağmen hastalığın androjen dirençli prostat kanserine (ADPK) ilerlemesi ve ölüme yol açması engellenememektedir. Günümüzde prostat kanserinin progresyon göstermesi ve ADPK ilerlemesi ile ilgili birçok araştırma olmasına rağmen altta yatan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Bu ilerlemenin ortaya çıkarılması hastalığın etkin tedavisinde önemli rol alacaktır. Literatürdeki birçok çalışma, androjenler ve androjen reseptörleri (AR) ile düzenlenen genlerin prostat kanserinin tüm aşamalarında rol aldığını göstermiştir (4). Bu sebeple prostat kanseri hücrelerinde AR'yi hedef alan genler ve bunların yolakları tedavide önemli hedefler olabilir. Androjenle regüle olan ve prostat kanserinin patogenezinde önemli bir rol aldığı son çalışmalarda gösterilen genlerden biri six transmembrane protein of prostate (*STAMP*) ya da six transmembrane epithelial antigen of prostate (*STEAP*) gen ailesine üye olan *STAMP2*'dir (5,6,7). *STAMP2*'nin prostat kanserinde benign prostat dokusu ile karşılaştırıldığında aşırı derecede eksprese olduğu ve oksidatif stresi artırarak prostat kanseri patogenezinde rol alabileceği gösterilmiştir (5,6).

Bu çalışmada, *STAMP2* geninin AR içeren [prostat kanserinin lenf nodu (LNCaP) hücre kültürleri, AR taşıyan] hücre kültürlerindeki ekspresyon profilinin androjenle regülasyonunu, RNA ve protein düzeyinde göstermek ve endojen *STAMP2* proteininin hücre içi lokalizasyonunu belirlemek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü, Androjen Uygulaması ve Gen Transfeksiyonu

İnsan prostat kanseri hücre kültürleri LNCaP, DU145 (prostat kanseri beyin metastazından elde edilen ve AR taşımayan) ve maymun böbrek epitel (COS-7) hücre kültürleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan temin edildi. LNCaP hücreleri %10 fetal sıçır serumu (FCS) (PAA laboratuvarlar Gmbht), %1 penisilin-streptomisin (Cambrex), %1 L-glutamin (Cambrex) ile desteklenmiş RPMI 1640 (Cambrex) medyumuna içeren 15 cm²lik kültür plağı içinde 37 °C'de ve %5 CO₂'li ortamda çoğaltıldı. Yeterli sayıya ulaşan hücreler 10 cm²lik plaklara her plakta 9x10⁵ hücre olacak şekilde yeniden ekildi. LNCaP hücrelerine 10⁻⁸ M sentetik androjen [R1881, Methyltrienolone (PerkinElmer)] 0, 6, 12, 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandı. Androjen uygulaması sonrası hücrelerden protein ve RNA elde edildi. Prostat kanseri beyin metastazından elde edilen ve AR taşımayan DU145 hücreleri %10 FCS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ile desteklenmiş Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle medyumuna [DMEM (Cambrex)] içeren 10 cm²lik kültür plağı içinde 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda çoğaltılıp protein izolasyonu için

kullanıldı. COS-7 hücreleri %10 FCS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ile desteklenmiş DMEM içeren 15 cm²lik kültür plağı içinde 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda çoğaltıldı. Yeterli sayıya ulaşan hücreler 10 cm²lik plaklara her plakta 9x10⁵ hücre olacak şekilde yeniden ekildi. Gen transfeksiyonu için hücrelerin medyumunu işlemiden 2 saat önce değiştirildi. Transfeksiyon işlemi için FUGENE-6 transfeksiyon reaktifi (Roche) üretici firmanın önerisi doğrultusunda kullanıldı. Hücreleri pcDNA4-HisMax-*STAMP2* (Fahri Saatçioğlu Laboratuvarları) ve pcDNA4-HisMax-Empty plazmid ile transfekte etmek için 5'er µg plazmid DNA, 10 µL FUGENE-6 ve DMEM toplam reaksiyon volümü 100 µL olacak şekilde hesaplanarak kullanıldı. Bir Eppendorf tüp içinde 10 µL FUGENE-6 DMEM ile karıştırıldıktan sonra transfekte edilecek plazmid DNA'ları eklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında karışımın tamamı hücre plaklarına damla damla eklendi ve 48 saat sonra hücrelerden protein elde edildi.

Hücrelerden Protein ve RNA İzolasyonu

Androjen uygulanmış ya da transfekte edilmiş hücrelerin medyumunu aspiratörle uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1x fosfat tamponlu tuz ile yıkandı. Yıkama sonrası hücreler plaktan kazınarak buz içinde bekleyen 15 mL'lik falkon tüplere alındı. Santrifüj sonrası hücre çökelmesine 100 µL lizis solüsyonu eklendi, pipetle karıştırılarak süspansiyon haline getirildi ve 1,5 mL'lik Eppendorf tüplere alındı. Her tüp +4 °C'de 2 saat rotasyon sonrasında 13000 rpm'de 15 dakika santrifüje tabi tutuldu. Santrifüj sonrası her tüpte dipteki çökelmeden ayrılan sıvı yeni Eppendorf tüplere alındı. Protein konsantrasyonları Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer) ve Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad laboratuvar) kullanılarak ölçüldü. Androjen uygulanmış hücrelerden RNA tek basamak guanidin tiyosiyanat yöntemi kullanılarak elde edildi. RNA konsantrasyonu Lambda 25 UV/VIS Spektrofotometresi (PerkinElmer) ve Lambda 25 bilgisayar programı kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Northern Blot

Her bir örnekten 15 µg RNA %1'lik agaroz jele yüklendi ve 1x morfolino propan sülfirik asit içinde 100V'de 3-4 saat horizontal elektroforez sisteminde (Owl) yürütüldü. Elektroforez sonrası RNA'nın değerlendirilmesi amacıyla Syngene biyo-görüntüleme ve GeneSnap programı kullanılarak jel görüntüledi. Görüntüleme işlemi sonrası jel üzerindeki RNA, 10x salin sodyum sitrat ve Whatman 3MM filter kağıdı kullanılarak naylon membrana (MSI, Westboro) transfer edildi ve hibridizasyona hazır hale getirildi. Naylon membran cDNA prob ile hibridize edilmeden önce northern blot prehibridizasyon solüsyonu içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hazırlanan P³² işaretli *STAMP2* cDNA prob denatüre edilerek prehibridizasyon solüsyonuna eklendi. Naylon membrandaki spesifik sinyal Typhoon 9400 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences) ve Typhoon Scanner Control 3.0 software (Amersham Biosciences) kullanılarak görüntüledi. Her örnek için gözlenen sinyal ImageQuant TL software (Amersham Biosciences) ile kantitatif olarak ölçüldü.

Western Blot

Her bir örnekten 100 µg protein içeren örnekler ve 20 µL protein marker (New England Biolabs) 100 °C'de 2 dakika

denatüre edildikten sonra %10'luk poliakrilamid jele yüklendi. Elektroforez işlemi Single-Sided Vertical Electrophoresis System (Owl) kullanılarak tamamlandı. Elektroforez sonrası jeldeki proteinler, Tank Electroblothing System'de (Owl) 1x transfer solüsyonu içinde 100 mA'lık elektrik akımı kullanılarak Immuno-Blot PVDF Membrane'ye (Bio-Rad laboratuvarlar) transfer edildi. Transfer sonrası polivinilidinden diflorür membrana % STAMP2 proteinine karşı tavşanlarda immünizasyon sonucu oluşturulan serumdan aseton pürifikasyonu ile elde edilen antikor (Fahri Saatçioğlu Laboratuvarları), primer antikor olarak 1 µg/mL konsantrasyonda kullanıldı. Sekonder antikor olarak anti-rabbit immünooglobulin (Ig) G antikorunu 1/10000 konsantrasyonda uygulandı. Kemilüminesans olarak elektrokemilüminesans (ECL) reaktif kullanılarak membrandaki spesifik sinyal filme [Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences)] aktarıldı. Filmdeki spesifik sinyal Optimax X-ray Film Processor cihazı kullanılarak görüntüledikten sonra GeneTools ImageQuant programı (Syngene) ile kantitatif olarak ölçüldü.

İmmünfloresan Mikroskopisi

LNCaP ve COS-7 hücreleri içinde 22x20 mm'lik lamellerin bulunduğu plaklara ekildi. LNCaP hücrelerine 48 saat androjen uygulaması yapıldı. STAMP2 proteininin hücre içi lokalizasyonunu göstermek için, yeni tanımlanan proteinlerin hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesinde kullanılan yeşil floresan veren yeşil floresan proteini (GFP) kullanıldı. COS-7 hücreleri, GFP'nin C-terminal ucuna yerleştirilerek oluşturulmuş GFP-STAMP2 ekspresyon vektörü (Fahri Saatçioğlu Laboratuvarı) ve pcDNA4-HisMax-STAMP2 ile transfekte edildi. Primer antikor olarak anti-GFP antikorunu ve STAMP2 proteinine karşı immünizasyonla elde edilen serumdan asetonla pürifiye edilen antikor kullanıldı. Sekonder antikor olarak 1/200 dilüsyonda Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rabbit IgG [Molecular Probes (kırmızı)] ve Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG [Molecular Probes (yeşil)] kullanıldı. Yıkama işleminin ardından 1/1000 dilüsyonda 4',6-diamino-2-fenilindol (Sigma) hücre çekirdeklerini boyamak amacıyla kullanıldı. Lameller 20 µL ProLong Antifade Kit (Molecular Probes) kullanılarak lamaların üzerine yapıştırıldılar. Tüm örnekler Leica DM IRBE lazer taramalı konfokal floresan mikroskobu, 488 nm Argon Lazer ve Leica konfokal bilgisayar programı kullanılarak görüntüledi. LNCaP ve COS-7 hücrelerinden z ekseninde 100 nm'lik kesitler ile görüntüler elde edildi. İki farklı antikora ait görüntüler (kırmızı ve yeşil) Adobe Photoshop programı kullanılarak üst üste getirilip kolokalizasyon (sarı ve turuncu) değerlendirildi.

DeneySEL ve hücre kültürleri ile yapılan bir çalışma olduğu için etik kurul onayı alınmamıştır.

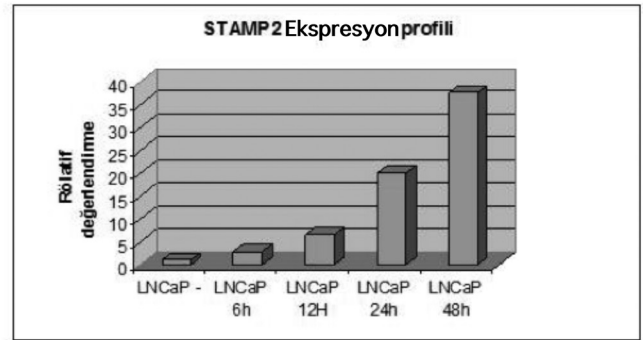
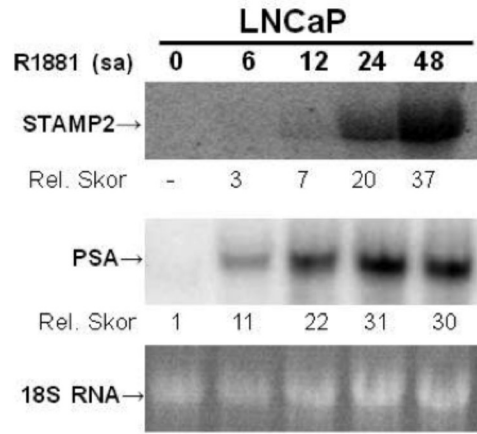
Bulgular

LNCaP Hücrelerinde Six Transmembrane Protein of Prostate 2 Ekspresyonunun RNA ve Protein Düzeyinde Androjenle Regülasyonunun Belirlenmesi

STAMP2 geninin RNA düzeyinde ekspresyonunu AR içeren LNCaP hücrelerinde göstermek için northern blot yöntemi kullanıldı. Androjen uygulanmamış LNCaP hücrelerinde STAMP2 ekspresyonuna rastlanmazken, androjen uygulanmış LNCaP hücrelerinde 6. saat sonunda ekspresyon görülmeye başlandı ve maksimum seviyeye 48. saatte ulaşıldı. STAMP2'nin ekspresyon

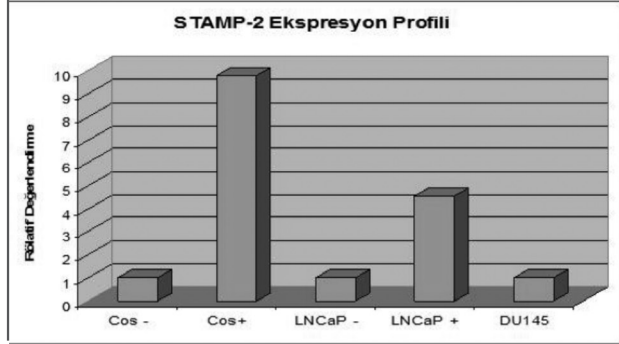
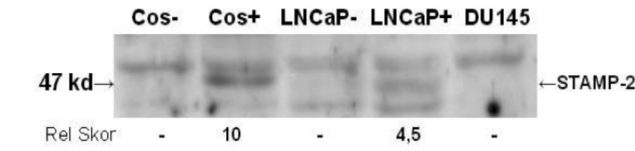
profilini değerlendirmek için aynı RNA'lar bu kez prostat spesifik antijen (PSA) için hazırlanmış cDNA prob ile işaretlendi. Androjen uygulanmamış LNCaP hücrelerinde bazal seviyede PSA ekspresyonu gözlemlendi. Androjen uygulanmasının ardından bu bazal PSA ekspresyonunun hızlı bir şekilde yükselmeye başladığı, 24. saatte maksimum düzeye ulaştığı ve 48. saatte sabit kaldığı gözlemlendi. LNCaP hücrelerinde STAMP2 geninin ekspresyonunun PSA ekspresyonu gibi androjenler tarafından düzenlendiği, PSA'dan farklı olarak STAMP2'nin androjen yoksun ortamda bazal ekspresyona sahip olmadığı, androjen uygulama süresine bağlı olarak doğru orantılı bir şekilde arttığı ortaya çıktı (Şekil 1).

STAMP2'nin androjen uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde protein ekspresyonunu belirlemek için Western blot yöntemi kullanıldı. STAMP2 proteininin ekspresyonunun LNCaP hücrelerinde androjen uygulaması sonrasında ortaya çıktığı gözlemlendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan ve STAMP2



Şekil 1. Six transmembrane protein of prostate 2'nin RNA düzeyinde ekspresyon profili: Prostat kanserinin lenf nodu hücrelerine artan süreler içinde sentetik androjen R1881 (10^{-8} M) uygulandı. Toplam RNA izole edildikten sonra six transmembrane protein of prostate 2 probu ile işaretlenerek northern analiz yönteminde kullanıldı. Six transmembrane protein of prostate 2'nin ekspresyonunu değerlendirmek için aynı RNA'ların prostat spesifik antijen ekspresyonu ile karşılaştırıldı. 18 S RNA'nın jel görüntüsü kontrol olarak kullanıldı. Problemlere cevap veren mRNA miktarı her örnek için rölatif olarak kantifiye edildi

LNCaP: Prostat kanserinin lenf nodu, STAMP2: Six transmembrane protein of prostate 2, PSA: Prostat spesifik antijen



Şekil 2. Six transmembrane protein of prostate 2 protein ekspresyonu: Androjen uygulanmış ve uygulanmamış prostat kanserinin lenf nodu hücrelerinden, androjen reseptörü taşımayan DU145 ve pcDNA4-HisMax-six transmembrane protein of prostate 2 ve pcDNA4-HisMax empty vektör ile transfekte edilmiş maymun böbrek epitel hücrelerinden elde edilen protein western blotting yöntemi ile değerlendirildi. Her bir örnek için 100 µg protein %10'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü. Primer antikor olarak anti-six transmembrane protein of prostate 2 ve sekonder antikor olarak anti-rabbit immünoglobulin G kullanıldı. İmmüno blotting sonrası elektrokemilüminesans ile işaretlenen spesifik sinyal filmlere aktarılıp Optimax X-ray Film Processor cihazı ile görüntüledi. Spesifik sinyalin rölatif değerlendirmesi için GeneTools ImageQuant programı kullanıldı

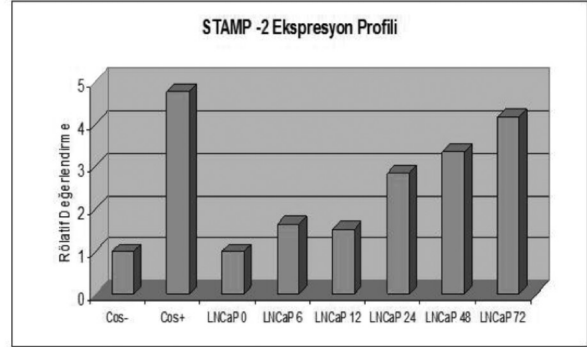
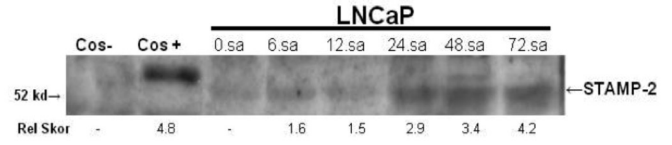
LNCaP: Prostat kanserinin lenf nodu, *STAMP2*: Six transmembrane protein of prostate 2

geni transfekte edilen COS-7 hücrelerinde de bu ekspresyon gözlemlendi. Androjen uygulanmamış LNCaP hücrelerinde ve AR taşımayan DU145 hücrelerinde bu proteinin ekspresyonunun olmadığı ortaya konuldu (Şekil 2).

LNCaP hücrelerinde androjen etkisi ile ortaya çıkan *STAMP2* ekspresyonunun androjene maruz kalma süresi ile ilişkisini belirlemek için, LNCaP hücrelerine 6, 12, 24, 48 ve 72 saat süreyle androjen uygulandı. LNCaP hücrelerinde *STAMP2* protein ekspresyonunun androjene maruz kalma süresi ile doğru orantılı bir şekilde arttığı ortaya konuldu (Şekil 3).

Six Transmembrane Protein of Prostate 2 Proteininin Hücre İçindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi

STAMP2 proteininin hücre içi lokalizasyonunu belirlemek için GFP'nin C-terminal ucuna yerleştirilerek oluşturulmuş GFP-*STAMP2* ekspresyon vektörü ile transfekte edilmiş COS-7 hücreleri floresan mikroskopide incelendi. Anti-GFP antikoruna (yeşil), anti-*STAMP2* antikoruna (kırmızı) ve kolokalizasyona (sarı) ait görüntüler değerlendirildiğinde; GFP-*STAMP2*'nin golgi kompleksine özgü hücre çekirdeğini çevreleyen ve sitoplazmaya uzanan (juksta-nükleer) bir dağılım gösterdiği, ayrıca hücre



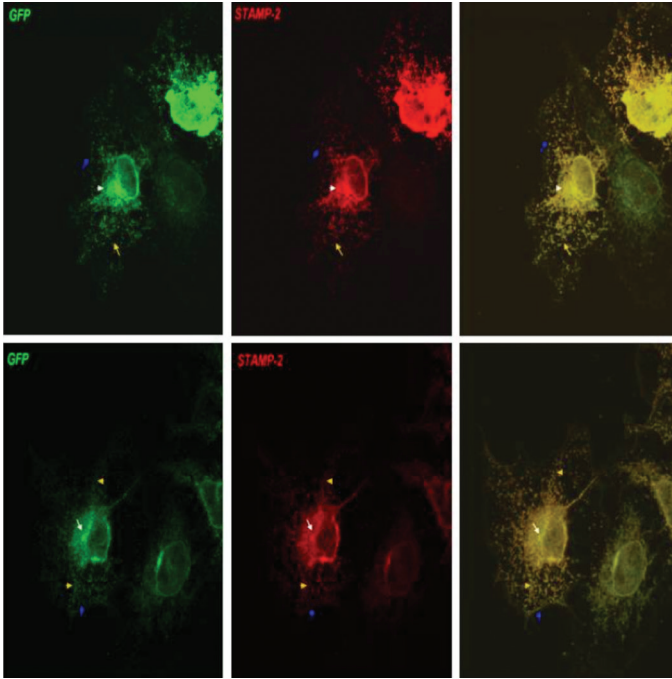
Şekil 3. Six transmembrane protein of prostate 2 protein ekspresyonu: 6., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde androjen uygulanmış ve androjen uygulanmamış lenf nodu prostat kanseri hücrelerinden ve pcDNA4-HisMax-six transmembrane protein of prostate 2 ve pcDNA4-HisMax empty vektör ile transfekte edilmiş maymun böbrek epitel hücrelerinden elde edilen protein western blotting yöntemi ile değerlendirildi. Her bir örnek için 100 µg protein %10'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü. Primer antikor olarak anti-six transmembrane protein of prostate 2 ve sekonder antikor olarak anti-rabbit immünoglobulin G kullanıldı. İmmüno blotting sonrası elektrokemilüminesans ile işaretlenen spesifik sinyal filmlere aktarılıp Optimax X-ray Film Processor cihazı ile görüntüledi. Spesifik sinyalin rölatif değerlendirmesi için GeneTools ImageQuant programı kullanıldı

LNCaP: Prostat kanserinin lenf nodu, *STAMP2*: Six transmembrane protein of prostate 2

sitoplazmasında yaygın değişik lokalizasyonlarda bulunduğu ve sitoplazma membranında yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 4). *STAMP2* proteininin hücre içi lokalizasyonunu kanıtlamak için, bu kez GFP proteininin yardımını kullanmadan pcDNA4-HisMax-*STAMP2* ile transfekte edilmiş COS-7 hücreleri aynı deneysel metod ve deney şartları sağlanarak konfokal floresan mikroskopu ile incelendi. pcDNA4-HisMax-*STAMP2*'nin COS-7 hücrelerinde sekresyonuna neden olduğu *STAMP2* proteini, GFP-*STAMP2* proteini gibi golgi kompleksine özgü juksta-nükleer bir dağılım gösterdiği gözlemlendi. Ayrıca hücre sitoplazmasında da yaygın olarak bulunduğu ve sitoplazma membranında yoğunlaştığı belirlendi (Şekil 5).

LNCaP Hücrelerinde, Androjen Uygulaması Sonrası Ekspresyon Olan Six Transmembrane Protein of Prostate 2 Proteininin Hücre İçindeki Lokalizasyonunun Gösterilmesi

Androjen uygulanması sonrası LNCaP hücrelerinde doğal olarak ortaya çıkan *STAMP2* proteininin hücre içi lokalizasyonunu belirlemek için androjen uygulanmış LNCaP hücreleri immüno floresan mikroskopisi ile incelendi. Androjen uygulanmış LNCaP hücrelerinde ekspresyon olan doğal *STAMP2* proteininin



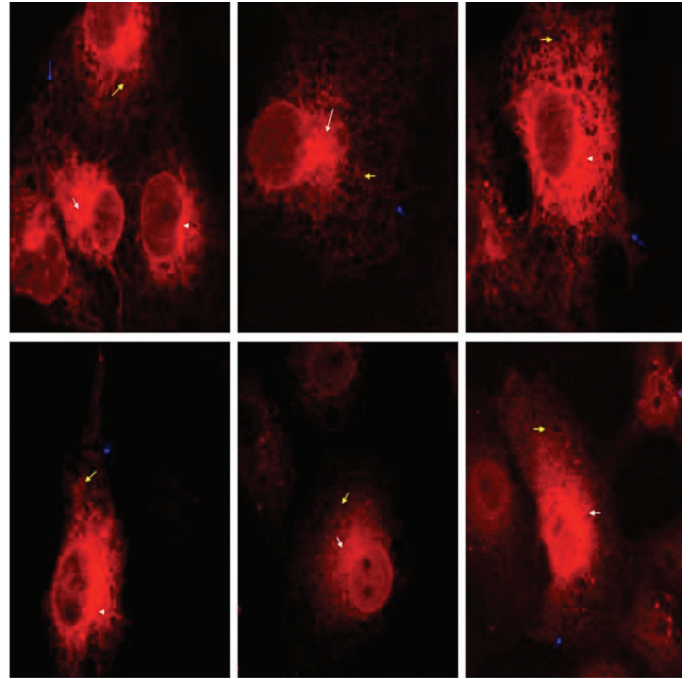
Şekil 4. Yeşil floresan proteini-six transmembrane protein of prostate 2'nin intrasellüler lokalizasyonu: Maymun böbrek epitel hücreleri yeşil floresan proteini-six transmembrane protein of prostate 2 ile transfekte edildikten sonra metanol-aseton yöntemi ile fikse edildi. Primer antikör olarak anti-six transmembrane protein of prostate 2 ve anti-yeşil floresan proteini antikoru ve sekonder antikör olarak Goat Anti-Rabbit IgG Alexa 592 (kırmızı) ve Alexa 488 (yeşil) kullanıldı. Hücreler Leica DM IRBE konfokal mikroskop ve 488-nm Argon Laser ile görüntüldü. Yeşil floresan proteini ve six transmembrane protein of prostate 2'nin görüntüleri Adobe Photoshop programı ile üst üste konarak kolokalizasyon (sarı ve turuncu) gösterildi. Six transmembrane protein of prostate 2'nin lokalizasyonu oklar ile belirtildi. Beyaz ok golgi kompleksini, mavi ok plazma membranını, sarı ok ise sitoplazmadaki dağılımı işaret etmektedir

GFP: Yeşil floresan proteini, STAMP2: Six transmembrane protein of prostate 2

hücre içi lokalizasyonunun *STAMP2* ile transfekte edilmiş COS-7 hücrelerinde olduğu gibi daha çok plazma membranında dağılım gösterdiği saptandı. Hücre içi arka plan boyanmanın fazla olması nedeniyle *STAMP2*'nin sitoplazmik dağılımı net olarak değerlendirilemedi (Şekil 6).

Tartışma

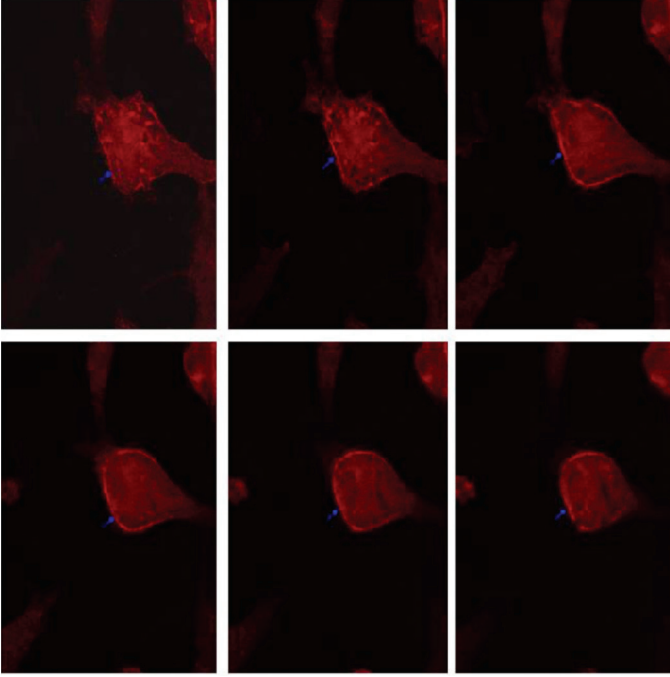
Androjenler, prostat hücrelerinin normal proliferasyonunda ve diferansiyasyonunda, prostat kanserinin gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadırlar (4). Bu nedenle erken evre prostat kanseri androjen ablasyon tedavisine yanıt vermektedir (3,4). Ancak hastalık kısa bir süre sonra androjenlerden bağımsız hale gelmekte ve ilerlemesine devam etmektedir. Prostat kanserinin bu androjen yanıtı evresinde etkin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (3,4). Bu evredeki hastalığın tedavisinde başarılı olabilmek için prostat kanserinin androjen bağımlı durumdan androjen bağımsız duruma geçişinin altında yatan moleküler mekanizmaların net



Şekil 5. pcDNA-4HisMax-six transmembrane protein of prostate 2'nin intrasellüler lokalizasyonu: Maymun böbrek epitel hücreleri pcDNA4-HisMax-six transmembrane protein of prostate 2 ile transfekte edildikten sonra metanol-aseton yöntemi ile fikse edildi. Primer antikör olarak anti-six transmembrane protein of prostate 2 ve sekonder antikör olarak Goat Anti-Rabbit IgG Alexa 592 (kırmızı) kullanıldı. Hücreler Leica DM IRBE konfokal mikroskop ve 488-nm Argon Laser ile görüntüldü. Six transmembrane protein of prostate 2'nin lokalizasyonu oklar ile belirtildi. Beyaz ok golgi kompleksini, mavi ok plazma membranını, sarı ok ise sitoplazmadaki dağılımı işaret etmektedir

olarak ortaya konması gerekmektedir. Bu amaçla prostatta androjenlerle regüle olan genler üzerinde çalışılmaya başlanmış ve birçok yeni gen tanımlanmıştır.

Six transmembran proteinlerin (STP) iyon kanallarında, su kanallarında ve ağrı iletiminde sinyal taşıyıcı protein olarak hücre içi sinyal iletiminde rol aldığı bilinmektedir (8,9). Ayrıca STP'ler ile birçok hastalığın patogenezi arasında ilişki bulunmuştur. Multidrug rezistans proteinler, STP ailesinin bir üyesi olup birçok kanserin tedavisinde önemli rol almaktadırlar (10). Bu ailenin bir diğer üyesi olan ATP-binding cassette transporter protein ile kolesterol metabolizmasında bozukluğa neden olan Tangier hastalığı arasında da ilişki gösterilmiştir (11). STP ailesi içinde yer alan, *STEAP* olarak da bilinen ve *STAMP* protein ailesinin bir üyesi olan *STAMP2* ilk kez Korkmaz ve ark. (5) tarafından tanımlanmıştır. Regülasyonunda androjenlerin rol aldığı *STAMP2*'nin prostat dokusunun yanında plaseenta, akciğer, kalp, kemik iliği, karaciğer ve yağ dokusunda da aşırı miktarda salgılandığı gösterilmiştir (5,12). Korkmaz ve ark. (5) *STAMP2* geninin AR içeren LNCaP hücrelerinde androjen uygulaması sonrası ekspresyonunun arttığını, AR içermeyen DU145 ve P53 prostat kanseri hücrelerinde ekspresyonunun olmadığını göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda benzer şekilde *STAMP2* geninin androjen uygulaması sonrası ekspresyonunun LNCaP hücrelerinde arttığını mRNA düzeyinde gösterdik. Ayrıca ek olarak, *STAMP2* protein



Şekil 6. Androjen uygulanmış prostat kanserinin lenf nodu hücrelerinde six transmembrane protein of prostate 2'nin intrasellüler lokalizasyonu: Prostat kanserinin lenf nodu hücreleri androjen uygulandıktan sonra metanol-aseton yöntemi ile fikse edildi. Primer antikör olarak anti-six transmembrane protein of prostate 2 ve sekonder antikör olarak Goat Anti-Rabbit IgG Alexa 592 (kırmızı) kullanıldı. Hücreler Leica DM IRBE konfokal mikroskop ve 488-nm Argon Lazer ile görüntüledi. Hücrelerden z ekseninde 100 nm aralıklarla kesitler alındı. Six transmembrane protein of prostate 2'nin intrasellüler lokalizasyonu oklar ile belirtildi. Mavi ok, plazma membranını işaret etmektedir

ekspresyonunun da androjen uygulaması ile doğru orantılı arttığını, AR olmayan DU145 hücrelerinde *STAMP2* proteininin eksprese olmadığını saptadık. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde *STAMP2* prostat kanserinde hastalığın androjen bağımlı evreden androjen yanıtı evreye geçişinde rol oynayabilecek genlerden biri olabilir. Ancak bu hipotezin net olarak ortaya konması için prostat kanserli aynı hastadan alınan normal prostat dokusu, androjen yanıtı evredeki prostat kanseri dokusu ve ADPK evresindeki kanser dokusunda yapılacak *STAMP2* geninin RNA ve protein ekspresyonunu gösteren geniş hasta sayılı ve klinik destekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Androjenlerle düzenlenen genlerden biri olan Kallikrein-3 ya da diğer adıyla PSA prostat kanserinin tanısında ve tedavi sonrasında kanser takibinde tümör belirleyicisi olarak kullanılmaktadır (13). Çalışmamızda LNCaP hücrelerinde PSA'nın ve *STAMP2*'nin ekspresyonunun androjen uygulaması ile arttığını ve androjen uygulamasının süresi ile her iki genin ekspresyonundaki artış arasında pozitif ilişkili olduğunu saptadık. *STAMP2*'nin ve PSA'nın ekspresyon profilinin androjenlerle düzenlenmesi bu iki genin birbiri ile ilişkili olabileceğini ve prostat kanserinin başlangıcında ve patogenezinde birlikte rol alabileceğini göstermektedir. Bu hipotezin açığa kavuşturulması için PSA ve *STAMP* gen ailesi arasındaki ilişki ayrıntılı olarak çalışılmalıdır.

Korkmaz ve ark. (5) *STAMP2* geni transfekte edilen COS-1 hücrelerinde *STAMP2* proteininin endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve hücre membranında lokalize olduğunu göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda *STAMP2* proteininin prostat kanserinin olası tanı ve tedavi için kullanılabilirliğini ortaya koymak adına LNCaP hücrelerinde ve *STAMP2* transfekte edilmiş COS-7 hücrelerinde *STAMP2* proteininin hücre içi lokalizasyonunu belirlemeyi amaçladık. İnceleme sonunda GFP-*STAMP2* ve pcDNA4-HisMax-*STAMP2* transferi sonunda sentezlenen *STAMP2* proteininin aynı Korkmaz ve ark. (5) sonuçlarındaki gibi COS hücrelerinin hücre membranına ve golgi kompleksine lokalize olduğunu gösterdik. Ayrıca ek olarak androjen uygulanması sonrası sentezlenen doğal *STAMP2* proteininin LNCaP hücrelerinde daha çok hücre membranında lokalize olduğunu saptadık. Ancak LNCaP hücrelerinin içi yapısı, COS hücreleri gibi yayvan şekilde olmaması ve LNCaP hücrelerine göre yapışıklıkları tabana daha geniş yayılmaları, doğal sentezlenen *STAMP2* proteininin transfekte gen tarafından sentezlenen protein kadar çok olmaması sebebiyle *STAMP2* proteininin LNCaP hücrelerinde hücre içi dağılımı plazmid-*STAMP2* ile transfekte edilmiş COS-7 hücrelerindeki gibi net değerlendirilemedi. Sonuç olarak, hem LNCaP hem de COS-7 hücrelerinde yapılan immüno Floresan çalışmaları birlikte değerlendirildiğinde, *STAMP2* proteininin hücrede golgi kompleksi ve hücre membranında lokalize olduğu gösterilmiştir. Hücre membranında bulunan ve transmembran kuyruk içeren birçok protein, antikör aracılı immünoterapide hedef olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu proteinlerin potansiyel tanı aracı olarak kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Prostat spesifik membran antijeni [PSMA (14,15)] ve prostat kök hücre antijeni (16) gibi proteinler de prostat kanserinin antikör aracılı tedavisi için hedef seçilmiş proteinlerden bazılarıdır. Anti-PSMA antikoru yakın geçmişte prostat kanseri metastazlarını saptamak için kullanılmış ve prostat kanseri tedavisinde kullanılabilirliği açısından değerlendirilmeye başlanmıştır (14,15). Azumi ve ark. (17) *STAMP2* gen ailesinin de üyesi olduğu *STEAP* geninin sentezlediği proteinin bazı epitop bölgelerinin mesane ve böbrek tümörlerinde T hücre yanıtını artırdığını ve bu *STEAP* reaktif T hücrelerinin *STEAP* proteinini eksprese eden böbrek ve mesane kanseri hücrelerini öldürebileceğini göstermişlerdir. Bu epitop bölgelerinden elde edilecek aşılardan *STEAP* ekspresyonuna karşı böbrek ve mesane tümörlerinin immünoterapisinde kullanılabilmesini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda gösterdiğimiz gibi *STAMP2*'nin androjenlerle regüle olması ve hücre içinde hücre membranına lokalize olması, ayrıca *STEAP* proteininin sahip olduğu epitop bölgelerine benzer fonksiyona sahip epitoplar içermesi olasılığı sebebiyle, prostat kanserinin androjen yanıtı evresinde immünoterapi amacıyla kullanılabilir ve böylece hastalık ADPK'ye ilerlemeden önlenabilir. Ancak bu sonuca varabilmek için *STAMP2* proteininin bu özelliğini ortaya çıkaracak daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Yakın zamanda literatürde birçok çalışma *STAMP2*'nin prostat kanserinin başlangıç ve ilerlemesindeki rolünü ortaya koymaya çalışmıştır. Jin ve ark. (6) prostat kanseri hücrelerinde *STAMP2*'nin reaktif oksijen radikallerini artırdığını, tümör grade ve tedaviye yanıtla ilişkili olduğunu; Lindstad ve ark. (18) *STAMP2*'nin adipogenezde rol aldığını ve *STAMP2* aracılı adipogenezin *in vivo* prostat kanseri büyümesini kolaylaştırdığını göstermişlerdir. Ayrıca *STAMP2*'nin enflamatuvar süreçlerden sorumlu olduğunu,

obezite ve insülin direnci ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (19).

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızın kısıtlılığı insan prostat kanseri dokularından ve normal prostat dokusundan protein ve RNA izolasyonunun yapılmaması, sadece hücre kültürlerinden elde edilen protein ve RNA'ların kullanılmış olması ve *STAMP2* RNA ve protein ekspresyonunun kanserli ve normal prostat dokularında gösterilmemesidir.

Sonuç

Bizim çalışmamız ve literatürdeki diğer çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde *STAMP2*'nin prostat dokusunun fizyolojisinde ve prostat kanserinin patogeneğinde önemli bir rol aldığı saptanmıştır. Bu sebeple *STAMP2* prostat kanseri tanı ve tedavisi için hedef molekül olabilir ve bu amaçla daha ayrıntılı klinik destekli çalışmalar planlanmalıdır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Deneysel ve hücre kültürleri ile yapılan bir çalışma olduğu için etik kurul onayı alınmamıştır.

Hasta Onayı: Hücre kültürleri kullanılarak yapılan bir çalışma olduğu için hasta onam formuna gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Deneysel Çalışmalar ve Uygulamalar: B.İ., Konsept: B.İ., A.K., Dizayn: B.İ., A.K., Veri Toplama veya İşleme: B.İ., Analiz veya Yorumlama: B.İ., Ö.D., A.K., G.A., Literatür Arama: B.İ., Yazan: B.İ.
Çıkar Çatışması: Yazarlar ve makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamızın deneysel aşamaları Prof. Dr. Fahri Saatçioğlu'nun desteği ile Oslo Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü Fahri Saatçioğlu Laboratuvarları'nda yapılmıştır.

Kaynaklar

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin 2017;67:7-30.
2. Debes JD, Tindall DJ. The Role of Androgens and The Androgen Receptor in Prostate Cancer. Cancer Lett 2002;187:1-7.
3. Anderson J. Treatment of Prostate Cancer- The Role of Primary Hormonal Therapy. EAU Update Series 2003;1:32-39.

4. Lonergan E, Tindall DJ. Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer Development and Progression. J Carcinog 2011;10:20.
5. Korkmaz CG, Korkmaz KS, Kurys P, et al. Molecular Cloning and Characterization of *STAMP2*, an Androgen-regulated Six Transmembrane Protein That is Overexpressed in Prostate Cancer. Oncogene 2005;24:4934-4945.
6. Jin Y, Wang L, Qu S, et al. *STAMP2* Increases Oxidative Stress and is Critical for Prostate Cancer. EMBO Mol Med 2015;7:315-331.
7. Sikkeland J, Sheng X, Jin Y, Saatcioglu F. *STAMPing* at The Crossroads of Normal Physiology and Disease States. Mol Cell Endocrinol 2016;425:26-36.
8. Catterall WA. Molecular Properties of Brain Sodium Channels: An Important Target for Anticonvulsant Drugs. Adv Neurol 1999;79:441-456.
9. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, et al. The Capsaicin Receptor: A Heat-Activated Ion Channel in The Pain Pathway. Nature 1997;389:816-824.
10. Haass C. Presenile Because of Presenilin: The Presenilin Genes and Early Onset Alzheimer's Disease. Curr Opin Neurol 1996;9:254-259.
11. Ordovas JM. ABC1: The Gene for Tangier Disease and Beyond. Nutr Rev 2000;58:76-79.
12. Arner P, Stenson BM, Dungner E, et al. Expression of Six Transmembrane Protein of Prostate 2 in Human Adipose Tissue Associates with Adiposity and Insulin Resistance. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:2249-2254.
13. Stephan C, Jung K, Diamandis EP, et al. Prostate-Specific Antigen, Its Molecular Forms, and Other Kallikrein Markers for Detection of Prostate Cancer. Urology 2002;59:2-8.
14. Frenkler WP, Rahbar K, Herrmann K, et al. 177Lu-PSMA Radioligand Therapy for Prostate Cancer. J Nucl Med 2017;58:1196-1200.
15. Baum RP, Kulkarni HR, Schuchardt C, et al. 177Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. J Nucl Med 2016;57:1006-1013.
16. Kessler C, Pardo A, Tur MK, et al. Novel PSCA Targeting scFv-fusion Proteins for Diagnosis and Immunotherapy of Prostate Cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2017;30:2472-2479.
17. Azumi M, Kobayashi H, Aoki N, et al. Six-transmembrane Epithelial Antigen of The Prostate As An Immunotherapeutic Target For Renal Cell and Bladder Cancer. J Urol 2010;183:2036-2044.
18. Lindstad T, Qu S, Sikkeland J, et al. *STAMP2* Is Required for Human Adipose-Derived Stem Cell Differentiation and Adipocyte-facilitated Prostate Cancer Growth In Vivo. Oncotarget 2017;8:91817-91827.
19. ten Freyhaus H, Calay ES, Yalcin A, et al. Stamp2 Controls Macrophage Inflammation Through Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Homeostasis and Protects Against Atherosclerosis. Cell Metab 2012;16:81-89.