T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LISANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

İLAÇ DİRENÇLİ PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES ARACILI İLAÇ DUYARLILIĞININ ARTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Araş. Gör. Rıza SERTTAŞ

Referans no: 10173894

EDİRNE-2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LISANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

İLAÇ DİRENÇLİ PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES ARACILI İLAÇ DUYARLILIĞININ ARTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Araş. Gör. Rıza SERTTAŞ

Destekleyen Kurum: TÜBAP/2016-04

Tez No:

EDİRNE-2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Suat ERDOĞAN danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Araş. Gör. Rıza SERTTAŞ tarafından tez başlığı "İlaç Dirençli Prostat Kanser Hücrelerinde Endoplazmik Retikulum Stres Aracılı İlaç Duyarlılığının Artırılması" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 21/12/2017 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
ÜYE

İmza
Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öğrenim hayatım ve tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, sayın danışmanım Prof. Dr. Suat ERDOĞAN hocama ilgi ve destekleri için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Başta Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım olmak üzere tez aşamasındaki yardımları için doktora öğrencisi Kader TÜRKEKUL ve arkadaşlarıma, ayrıca desteklerinden dolayı TÜBAP'a (Proje no: 2016-04) teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında akademik, maddi, manevi her türlü desteği ve varlığı için eşim Doktorant Pelin TURHAN-SERTTAŞ'a; akademik kariyerimde kararlı bir şekilde yürümem için maddi ve manevi her türlü fırsatı sunan ve sevgilerini esirgemeyen AİLEME, içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **PROSTAT DOKUSU** 3
- **PROSTAT KANSERİNDE TANI** 4
- **PROSTAT KANSERİNDE TEDAVİ** 6
- **PROSTAT KANSERİNDE KEMOTERAPİ** 6
- **PROSTAT KANSERİNDE İLAÇ DİRENCİ VE MEKANİZMALAR** 7
- **ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ** 12
- **KARSİNOGENEZ** 14
- **TRİAPİN** 15
- **HÜCRE DÖNGÜSÜ VE DNA TAMİRİ** 17
- **APOPTOZ** 19

GEREÇ VE YÖNTEMLER 24

BULGULAR 39

TARTIŞMA 73

SONUÇLAR 81

ÖZET 83

SUMMARY 85

KAYNAKLAR 87

ŞEKİLLER LİSTESİ 96
TABLO LİSTESİ 99
ÖZGEÇMİŞ 100

SİMGE VE KISALTMALAR

3-AP : Triapin

ABC : ATP-Binding Cassets

ADP : Adenozin difosfat

APAF1 : Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1

AR : Androjen reseptörü

ATCC : American Type Culture Collection

ATF6 : Aktifleştirilmiş transkripsiyon faktörü 6

ATF4 : Aktifleştirilmiş transkripsiyon faktörü 4

ATP : Adenozin trifosfat

BT : Bilgisayar tomografisi

BCL-2 : B-cell lymphoma 2

CDK : Siklin bağımlı kinaz

BRCA1 : Breast cancer 1

BRCA2 : Breast cancer 2

CDK2 : Siklin bağımlı kinaz 2

CDK4 : Siklin bağımlı kinaz 4

CDK6 : Siklin bağımlı kinaz 6

CO2 : Karbondioksit

DISC : Death inducing signaling complex

DMSO : Dimetil sülfoksit

dNDP : Deoksinükleotid difosfat

dNTP : Deoksinükleotid trifosfat

eIF2α : α ökaryotik başlama faktörü 2

EGFR : Epidermal growth factor reseptor

ER : Endoplazmik retikulum

ETaR : Endotelin a reseptörü

FSS : Fötal sığır serumu

GRP78 : Glukoz-düzenleyici protein

GSH : Glutatyon

GST : Glutatyon S-transferaz

IAP : İnhibitör of apoptosis/apoptoz inhibitörleri

IGF1R : İnsülin büyüme faktörü 1 reseptörü

IL-6 : İnterlökin 6

IRE1a : İnositol-ihtiyaçlı enzim 1a

kDa : Kilo dalton

KDPK : Kastrasyon dirençli prostat kanseri

KML : Kronik myeloid lösemi

mRNA : Mesajcı ribonükleik asit

MDR : Multidrug resistance

miRNA : Mikro mesajcı ribonükleik asit

MTX : Mitoksantron

PARP : Poly (ADP-riboz) polimeraz

PC3 : Prostat kanseri 3

PCa : Prostat kanseri

PERK : PRKR-benzeri ER kinaz

P-gp : P-glikoprotein

pH : Hidrojenin gücü

PI3K : Fosfotidilinozitol-3-OH kinaz

PSA : Prostat spesifik antijen

RNA : Ribonükleik asit

RNR : Ribonükleotid redüktaz

ROS : Reaktif oksijen türleri

S1P : Sfingozin 1-fosfat

STAT3 : Sinyal artırıcı ve transkripsiyon aktivatörü-3

TKR : Trozin kinaz reseptör

TNF : Tümör nekroz faktörü

TNFR : Tümör nekroz faktörü reseptörü

UPR : Unfolded Protein Response

VEGFR : Vascular endotelial growth factor reseptor

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, dünya ve Türkiye genelinde kalp ve damar hastalıklarından sonra en sık karşılaşılan ikinci ölüm sebebidir. Prostat kanseri (PCa), erkeklerde akciğer kanserinden sonra ölüm sebebi olarak ikinci sırada yer alır (1). Kanser hastalarının tedavi seçenekleri arasında cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi ve kök hücre nakli gibi seçenekler yer almaktadır. Günümüzde kanser tedavisinde en sık başvurulan uygulama kemoterapidir. Bu tedavi yönteminde genel olarak kanser hücreleri üzerinde toksik etki göstererek apoptoz yolaklarını tetikleyici ilaçlar kullanılmaktadır (2). Ancak kemoterapi ajanlarına karşı bazı hastalarda gelişebilen ilaç direnci, hastanın yaşam süresini kısaltmaktadır (3). Gelişen ilaç direncini ortadan kaldırmaya yönelik yeni tedavi stratejileri hasta sağkalım süresini uzatacağından kanser tedavisinde önemli bir çalışma alanını oluşturmaktadır. Kemoterapi sürecinin ardından hastalığın şiddetinin artarak ortaya çıkmasında ilaç direncinin etkin bir rol aldığı bilinmektedir (4).

Androjen baskılama tedavisi sonrası gelişebilen kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK) hastalarında ilk standart tedaviyi dosetaksel (Taxotere®) oluşturur. Ancak, bu terapi esnasında ve sonrasında hastalığın ilerleme gösterdiği vakalarda henüz standart bir tedavi bulunmamaktadır. Bu çalışmada KDPK insan hücre hattında (PC3) dosetaksel ilacına karşı direnç geliştirilerek, ilaç dirençli hücre modeli kullanıldı. Tedavi amaçlı olarak, bir ribonükleotid redüktaz (RNR) inhibitörü olan triapin (3-AP) ile endoplazmik retikulum (ER) stresinin tetiklenmesi ve mitoksantron (Novantrone®) tedavisi ile hücrelerin ölümü amaçlandı. Tedavi etkinliğinde apoptoza yönelimin ve hücre döngüsünün analizleri

gerçekleştirildi. Çalışmada katı tümör ortamını *in vitro* koşullarda temsilen üç boyutlu (sferoid) hücre kültürü kullanıldı. Söz konusu teknik, hücre kültürü temelli çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılabilmekte ve katı tümör, doku ortamını uygun bir şekilde modelleme fırsatı sağlamaktadır (5).

Triapin molekülünün önceki çalışmalarda kolon kanseri hücrelerinde ER stresini tetiklediği ve bunun sonucunda kanser hücrelerinin sağ kalımlarının azalmasında etkili olduğu gösterilmiştir (6). Endoplazmik retikulum, hücrelerden dış ortama gönderilecek olan proteinlerin sentezlenme, katlanma ve olgunlaşma aşamalarının meydana geldiği yer olduğundan hücresel olayların kontrolündeki ileti mekanizmalarının elemanlarının sentezinde önemli bir organeldir. Endoplazmik retikulumun protein katlama kapasitesinin bozulması durumunda ER stresi gelişir ve katlanmamış protein yanıtı (Unfolded Protein Response-UPR) uyarılır (7). Endoplazmik retikulum stresinin, UPR gibi hücresel koruyucu mekanizmalarca, üstesinden gelinemediği durumlarda ise hücre içi apoptotik yolakların etkinlik kazandığı önceki çalışmalarla gösterilmiştir (8). Yapılan bu çalışmada da 3-AP molekülünün ilaç direnci kazanmış PCa hücrelerinde ER stresini tetikleyerek kanser hücrelerinin apoptoza gidişini hızlandırması veya hücre döngüsünün durdurulması hedeflenmiştir.

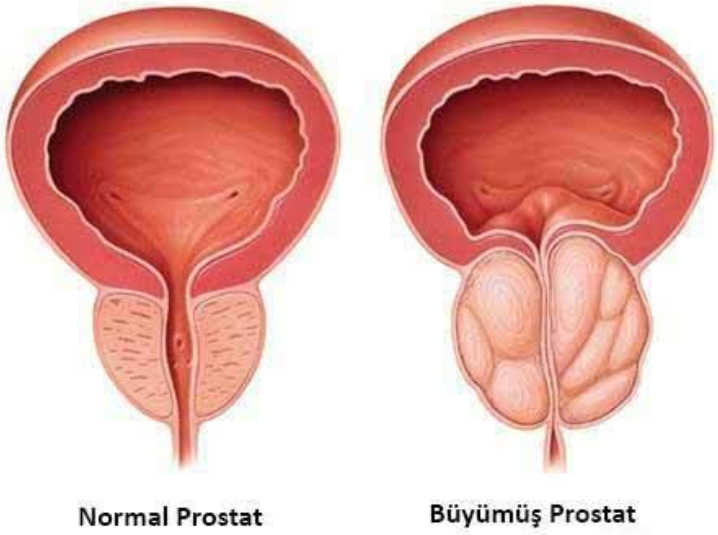
Kemoterapiye karşı direnç gelişmiş kanser hücrelerinde ilaç etkinliğinin artırılmasının, kanserli hastaların kemoterapi süreçlerine önemli katkı sağlaması beklenmektedir. Bu yolla PCa hastalarının sağkalım sürelerinin uzatılabilmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

GENEL BİLGİLER

PROSTAT DOKUSU

İdrar kanalının üst bölümünü oluşturan üretranın üzerini saran prostat dokusunun (Şekil 1) ürettiği prostat sıvısı, ejekülasyon sırasında meniye karışarak spermlerin hareketli kalmasından sorumludur (9). Prostat sıvısı fosfatazlar, prostaglandinler, prostat spesifik antijen (PSA) ve diğer bileşikler ile alkali pH'da olmasından dolayı vajinal salgının asidik yapısına karşı spermler korunmuş olur. Böylece ovumun başarılı bir şekilde döllenmesi sağlanmaktadır. Prostat, tübülo-alveolar bezlerden bileşik tübülo-alveolar sınıfına girmektedir. Prostatın yapısındaki epitel doku kan ve hücreler arası maddeden farklı özellikte olan salgı maddesini üretmek üzere farklılaşmış olan bez epiteldir (10).

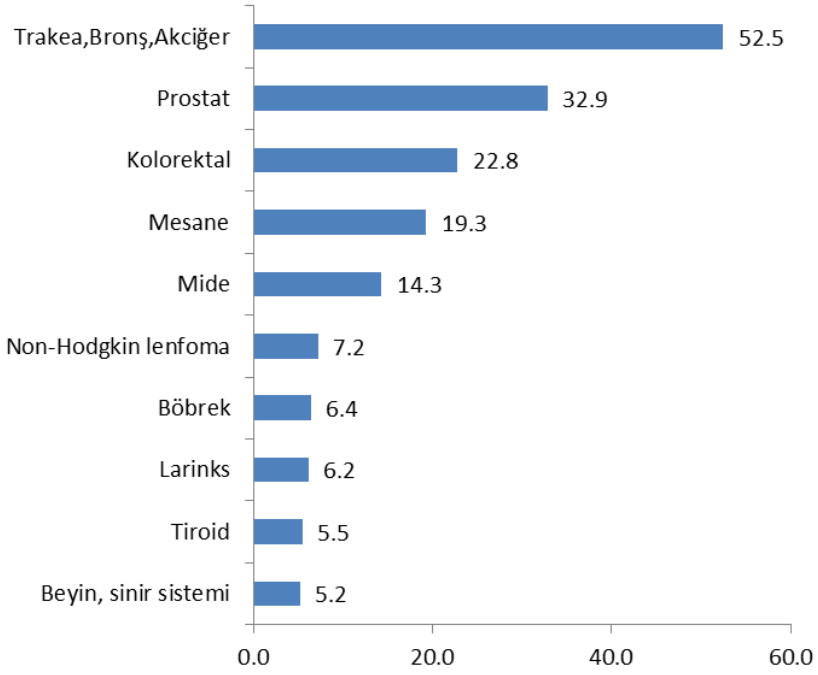
Prostat hücreleri androjen reseptörü (AR) taşımaktadırlar. AR hücre dışından proliferasyonu tetikleyici iletileri almada görevli bir almaçtır. Primer tümörlerde AR'nin sentezinden sorumlu gen bölgesinde mutasyon oranı az iken metastatik tümörlerde bu oran çok fazladır. AR miktarının artması, tümör hücrelerinde aşırı duyarlılığa neden olmakta ve androjenden bağımsız olarak hücre bölünmesi devam etmektedir. AR'nin hormon bağlanma bölgesindeki mutasyonlar ise almaçın özgüllüğünü değiştirerek hücreyi androjenden bağımsız bir mekanizma ile çoğalmaya yönlendirmektedir (11).



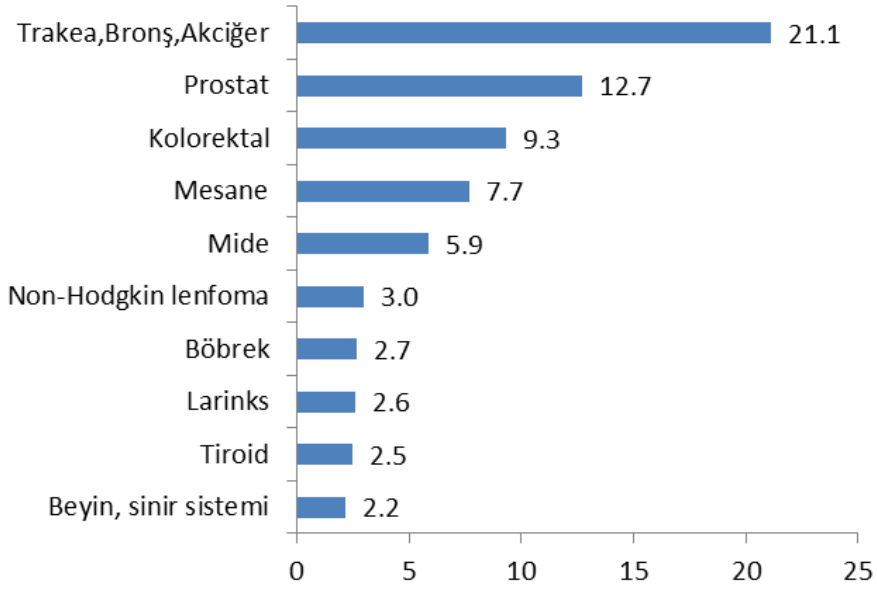
Şekil 1. Tümör oluşumu sonrası prostat dokusunun karşılaştırılması (12).

PROSTAT KANSERİNDE TANI

Prostat kanseri, gelişmiş ülke erkeklerinde en sık görülen kanser çeşidi olup kanser kaynaklı ölüm sebepleri içinde ikinci sıradadır (1). Türkiye'de önemli kanserlerin görülme oranını belirlemek için Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi kanser kayıtları toplanmakta ve cinsiyet, yerleşim ve nüfus dikkate alınarak elde edilen verilere göre kanser görülme sıklığı her yıl artmaktadır (13). 2014 için ülkemizde karşılaşılan kanser vakaları arasında yapılan karşılaştırma sonucuna göre erkeklerde en çok rastlanılan kanser türlerinin hız ve oranları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2 ve 3) (14):



Şekil 2. Erkeklerde en sık karşılaşılan kanserler (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (100 000 kişide).



Şekil 3. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık karşılaşılan bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014).

Erkeklerde en sık görülen kanser türleri sırasıyla akciğer, mide ve prostat kanseridir (13). Prostat kanseri hastalarının % 30'unda ileri evre hastalık mevcuttur (9). Prostat kanserinin teşhisinde kullanılan yöntemler (15):

- Elle muayene: Prostat rektal muayene ile yoklandığında sert/katı bir düğüme rastlanırsa kanserden şüphelenilir.
- Kanda yüksek PSA değeri: PSA, prostat bezinden salgılanan bir proteindir. Yüksek PSA değeri, prostat kanseri şüphesini akla getirir. 0-4 ng/ml aralığı normal, 4-10 ng/ml aralığı şüpheli, 10 ng/ml ve üzeri ise yüksek olarak değerlendirilir. PSA değerinde artış saptanan veya parmakla prostat muayenesinde sertlik tespit edilen hastalara biyopsi yapılır.
- Prostattan parça almak (biyopsi): Uzman hekim, bir iğne aracılığıyla prostat bezinden biyopsi örnekleri alır ve bu örnekler patologlor tarafından incelenir.
- Ultrason: Ultrasonografi yardımıyla prostat muayene edilir.

PROSTAT KANSERİNDE TEDAVİ

Prostat kanseri vakalarında kural olarak çeşitli tedavi yöntemleri bulunmaktadır:

- Gözlemleyerek beklemek: Hastadaki ve tümördeki gelişmeler uzman tarafından belirli aralıklarla kontrol edilir. Bu tedavi yöntemi, genellikle 75 yaşından büyük hastalara ve tümörün agresif bir yayılma göstermediği durumlarda uygulanır.
- Ameliyat: Prostat bezi ve yakın çevresindeki lenf düğümleri operasyonla alınır.
- Perkutan radyoterapi: Prostat bezindeki kanser hücreleri ışın kullanılarak öldürülür.
- Brakiterapi: Prostat bezi içerisine küçük radyoaktif tohumlar ekilerek çok yakından ışın gönderilir.
- Antihormon tedavisi: Testosteron, kanser hücrelerinin gelişmesini desteklediğinden ilaç yardımıyla testosteronun etkileri zayıflatılır.
- Kemoterapi: Kanserin sadece ileri evrelerinde kullanılmaktadır.

PROSTAT KANSERİNDE KEMOTERAPİ

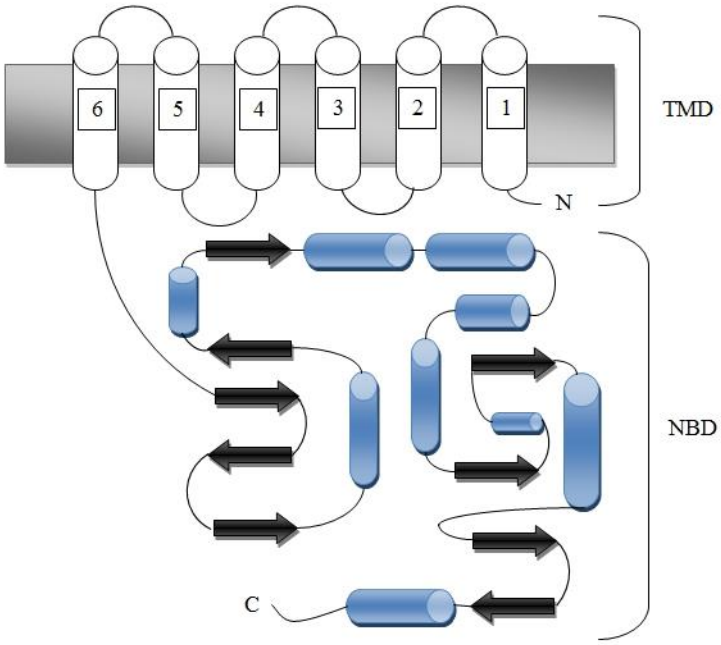
Kötü huylu prostat kanserinde antihormon uygulaması yoluyla kastrasyonlu androjen baskılayıcı (ablasyon) tedavi klinikte çok sık kullanılır (16). Çünkü PCa hücrelerinin çoğalması hormon bağımlı halde gerçekleşmektedir. Androjen varlığında söz konusu kanser hücreleri çoğalmaya yönelmektedir (3). Ancak bu hastaların yaklaşık % 80'inde ortalama 2

yıl içinde nüks meydana gelmektedir. Androjen seviyesi büyük ölçüde düşürülse de nüks meydana gelebilir. Bu duruma kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK) denir (17).

Günümüzde KDPK durumunda kemoterapi uygulanır. Eskiden KDPK durumunda mitoksantron temelli kemoterapiler sadece palyatif, yani semptomatik seviyede engelleme amaçlı kullanılmaktaydı. Mitoksantron kemoterapotik ajanı, deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonunu engeller. Bunu da DNA topoizomeraz II enzimi ile etkileşip onun işlevini durdurarak gerçekleştirir (18). Bu tedavi ortalama 18-20 ay kadar bir sağkalım süresi oluşturmaktadır. Günümüzde de KDPK'lı hastalarda taksol türevi kemoterapi ajanları (dosetaksel, kabazitaksel) uygulanmaya devam edilmektedir (19). Klinikte uygulanmakta olan kemoterapi yöntemi her gün uygulanan kortikosteroid ve bunun yanında üç haftada bir uygulanan dosetaksele dayanır. Dosetaksel gibi taksol türevi ilaçlar kanser hücrelerinde mikrotübül yapısını durağan hale getirerek mitoz bölünmeyi engeller (17). Rutin olarak uygulanan kemoterapi sürecinde hasta bireylerdeki ilaca karşı verilen cevapta değişiklik meydana gelir. Tedavinin başlangıcında ilacın etkisi yüksek iken, ilerleyen süreçte giderek kaybolmaya yönelim gösterir. Çünkü kanser hücreleri, kullanılmakta olan ilaçları etkisiz kılıp onların toksik etkilerinden kurtulmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmektedir (5).

PROSTAT KANSERİNDE İLAÇ DİRENCİ VE MEKANİZMALAR

Dosetaksel tedavisi sonrasında hastalığı ilerleme gösteren KDPK'lı hastalarda prognoz oldukça kötüdür ve ortalama sağkalım süresi 6 ile 10 ay arasındadır. Böyle hastalarda uygulanabilecek kemoterapi içerikleri dar bir yelpazeye sahiptir ve yeni ilaçlarla güçlendirilmelidir (17). İlaç direncinin oluşmasından bir çok etken sorumludur. Ancak en büyük rol ATP (Adenozin Trifosfat-Binding Cassets, ABC) taşıyıcı proteinlerine aittir. ABC taşıyıcı proteinleri hücre zarında bulunurlar ve hücre içi ile dışı arasında madde taşınmasında görevlidirler (3). Söz konusu proteinler hücre içine giren ilacı hücre dışına pompalayarak uzaklaştırmaktadır (20).



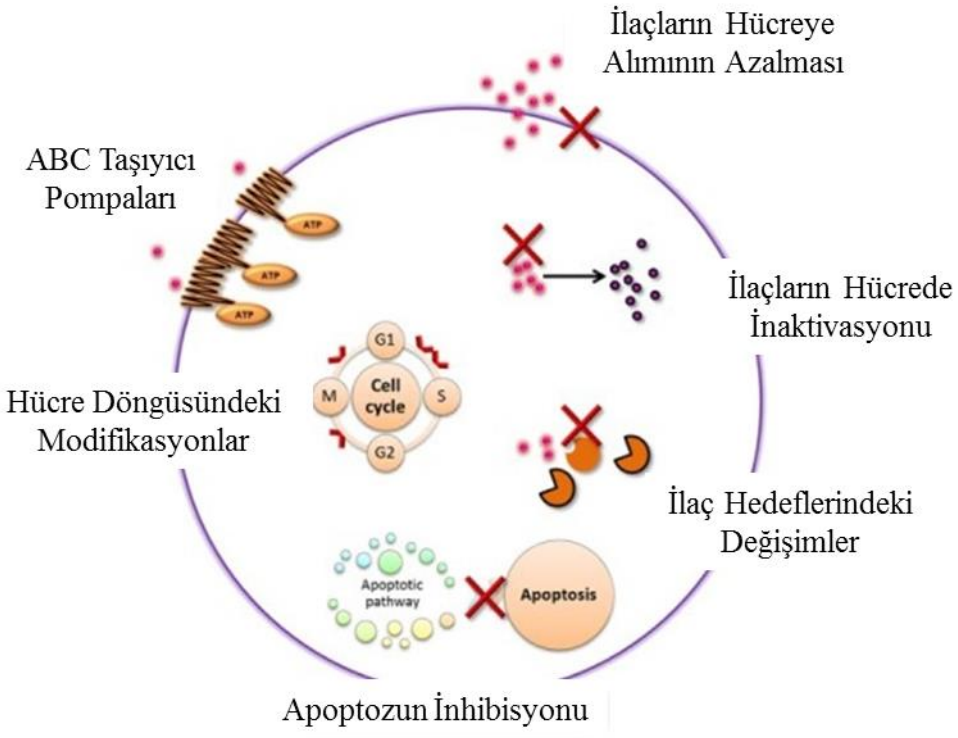
Şekil 4. ABC taşıyıcı proteinlerinin şematik yapısı. Altı geçişli zar-içi kısım helikslerden oluşan TMD bölgesidir. Bu bölge taşıma işlevinden sorumludur. Heliks ve tabaka yapısındaki diğer kısım ise ATP bağlayabilen NBD bölgesidir.

ABC taşıyıcı proteinlerinin yapısı ortak bazı kısımları barındırmaktadır. Bunlar iki adet yüksek oranda korunmuş nükleotid bağlayıcı bölge (NBD) ve iki adet zar-içi bölge (TMD) olarak isimlendirilir (Şekil 4). Bu yapı dört adet tek polipeptit elemanın NBD-TMD şeklindeki dimerleşmesi ile meydana gelmiştir. TMD, taşıma işlemi ve substrat özgüllüğünden sorumluyken NBD, ATP bağlama ve hidrolizinden sorumludur (40).

Tablo 1. İlaç direncinde belirteç olarak kullanılmakta olan proteinler.

Sembol	Fonksiyon
ABCG2	Hücre dışına ksenobiyotik atımı, ilaç direnci
ABCC1	İlaç direnci
ABCC2	Organik anyon atımı
ABCC3	İlaç direnci
ABCC4	Prostoglandin ve steroidsulfat transportu
ABCC5	Nükleosid transportu
ABCC6	İlaç direnci
ABCB1	Çoklu ilaç direnci

İlaç direnci, ABC taşıyıcı proteinlerinin yüksek düzeyde sentezlenmesiyle meydana gelir (21). Klinikte gözlenen, kanserli hücrelerde gelişen ilaca karşı direnç durumu literatürde çoklu ilaç direnci (Multidrug Resistance-MDR) olarak adlandırılır (39). ABC taşıyıcı proteinleri ilaç direncinde belirteç olarak kullanılır (Tablo 1). MDR olarak tabir edilen durum genellikle ABCB1 proteininden dolayı gözlenmektedir (22).



Şekil 5. İlaç direnci oluşumunda etkin olarak rol alan başlıca mekanizmalar.

İlaç direncinden sorumlu diğer etkenler ise kemoterapotik ajanların hücre içine alımının azalması, ilaç hedeflerindeki değişimler, hücre döngüsündeki modifikasyonlar, ilaçların hücre içinde inaktivasyonu, apoptozun inhibisyonu (Şekil 5), anormal sfingolipid metabolizması (23), mikrotübül dinamiklerindeki değişimler, alfa ya da beta tubulin seviyesindeki değişimler, beta tubulin üzerindeki mutasyonlar, mikrotübül ilişkili proteinlerin anormal düzeyde sentezi ve androjen reseptör yolağındaki değişimlerdir (24).

Kemoterapi sırasında uygulanmakta olan ilaçlardaki moleküllerin kanser hücrelerindeki derişimleri azalma gösterebilir. Bundan sorumlu olan yapılar ATP-bağımlı akış pompaları denilen taşıyıcı proteinlerdir. Bu proteinler de ABC taşıyıcı proteinleri grubunun

bir üyesidir. Vinca alkoloidler, antrasiklinler, aktinomisin-D ve taksanlara karşı bu şekilde direnç gelişmektedir (53).

Bazı kanser ilaçlarının özgül olarak bir takım onkoproteinlere bağlanıp onların fonksiyonlarını engelleme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir. Kanser hücrelerinde kemoterapi süresince, ilaç tasarlanırken hedef olarak seçilen yapının değişikliğe uğrayabileceği gözlenmiştir (54). Bu duruma verilebilecek en uygun örneklerden birisi kronik myeloid lösemi (KML) hastalarında gözlenen BCR/ABL füzyon proteininde kemoterapi ile birlikte meydana gelen mutasyonlardır (41). Bu mutasyonlar genellikle BCR/ABL füzyon proteinin ilaç ile etkileşebilen aktif bölgesindeki aminoasitlerin kodlanmasından sorumlu olan *BCR/ABL* füzyon genindeki tek nükleotid değişimlerinden kaynaklanır. T315I mutasyonu en sık rastlanılan mutasyondur. Bu mutasyon sonucunda füzyon proteindeki 315. sırada bulunan treonin aminosidi yerine izolösin geçer ve KML hastalarında kullanılan reseptör tirozin kinaz inhibitörleri işlev göremez duruma gelir. Bu hastalarda önceleri kullanılan imatinib, T315I mutasyonu sonucunda işlevsiz kaldığından dolayı dasatinib geliştirilmiştir (41).

Kanserleşmiş hücrelerin en karakteristik özelliklerinden biri de kontrol edilemez çoğalma yetenekleridir. Bu durum hücre döngüsündeki aksaklıklardan kaynaklanır. Hücre dögüsünün kontrol edilemez olmasının sebebi; interfazdaki G1, S ve G2 fazları ile mitotik evredeki işlemlerin kontrollü bir şekilde yapılamamasıdır. Ayrıca DNA replikasyonundaki doğruluğun taranıp onarımın gerçekleştiği hücre döngüsü kontrol noktalarının da sağlıklı işlev görememesi de hücre döngüsünün kontrol edilmesini olanaksız kılar. Kemoterapi esnasında hücrelerin G2 evresinde tutuklu kalmaları sonucunda tedaviden kaçınıp ilaca karşı direnç geliştirebildikleri rapor edilmiştir (55).

Antikanser işlevine sahip ilaçların kullanımı sırasında hücresel kompartmanlar ilaç direncinin gelişiminde önemli bir role sahiptir. Zardan geçemeyecek formülasyondaki bir ilaç molekülü endositoz yoluyla hücre içine alınır ve lizozomal bir vakuol oluşturularak hücre içine aktarım gerçekleştirilir. Bu aktarım sırasında hücresel yapılardaki farklı kompozisyonlardaki proteinler ve lipidler ile lümenin sahip olduğu farklı pH değeri gibi özellikler, ilacın hücre içindeki yerleşimini etkileyip onun hedefine ulaşmasını etkileyebilir (56).

Kemoterapi sırasında kullanılan ilaçlar glutatyon S-transferaz (GST) enzimi aracılığıyla detoksifikasyon işlemine maruz kalıp etkilerini kaybedebilirler. GST, glutatyon

(GSH) molekülünü kofaktör olarak kullanır. Siklofosfamid, doksorubusin, melfalan ve kloroambusil gibi alkilleyici ajanlara karşı direnç geliştirmiş hücrelerde GSH seviyelerinin çok yüksek olduğu saptanmıştır.

Kemoterapotik ajanların bir çoğunun apoptoza yönlendirme özelliğinin olduğu bilinmektedir. Apoptoz tetiklendiğinde DNA fragmentasyonu, kromozom dekondenzasyonu, nükleus ve hücre zarının bütünlüğünün kaybolması gibi biyokimyasal ve morfolojik olaylar gerçekleşir. Antiapoptotik ve hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilen özellikteki genlerin ifadelerinin tetiklenmesi durumunda, kanserli hücreler apoptozdan kurtulabilmektedir. Bu duruma örnek olarak *BCL-2* (B-cell lymphoma 2) gen ailesi gösterilebilir. *BCL-2*, kanser hücrelerinin çoğalmasını tetikleyebilen ve apoptozun engellemesini sağlayabilen bir onkogen olduğu için kanserli hücrelerdeki ilaç direnci üzerinde önemli bir role sahiptir. Bu gen ailesi proapoptotik özellikteki *BAX*, *BID*, *BIM* ve antiapoptotik özellikteki *BCL-XL* genlerini de içerir. Apoptozun etkinleştirilmesi için *BCL-2* gen ifadesinin baskılanması gerekir. Bu amaçla hücrenin bu gen ifadesini baskılayabilecek moleküler mekanizmalar barındırdığı da tespit edilmiştir. 15-20 nükleotid uzunluğunda bulunan kısa ribonükleik asit (RNA) molekülleri olarak tespit edilen mikroRNA'lar (miRNA), genlerde ya da mesajcı RNA (mRNA) üzerinde tamamlayıcı oldukları bölgelere bağlanıp gen ifadesini baskılama yeteneğine sahiptirler. Bu şekilde miR-181 ve miR-497 molekülleri de *BCL-2* geninin ifadesini baskılayarak apoptozu etkinleştirir (24).

Bir çok çalışmanın sonucunda artan seramid seviyesi apoptoza yol açarken sfingozin 1-fosfat (S1P) seviyesindeki artışın apoptozun engellenmesine yol açtığı gözlenmiştir. Bu durum da ilaç direnci gelişimine sebep olmaktadır. Alfa ya da beta tubulin sentezindeki değişimler, beta tubulin üzerindeki mutasyonlar ve mikrotübül ilişkili proteinlerin anormal derecede ifadesi hücreye yüksek derecede bölünme yeteneği kazandırabilmektedir. Bu sayede de tubulinler üzerinde etkili olabilen taksanlar sınıfı bileşiklere karşı direnç gelişebilmesi söz konusudur (57).

Androjen reseptör yolağındaki değişimler de ilaç direnci gelişiminde etkili olabilir. Çünkü androjene-duyarlı prostat kanseri hücreleri androjen yokluğunda tedavi edilebilirken, androjen reseptör yolağında meydana gelen değişimler bu kanser hücrelerini androjen-bağımsız halde çoğalabilme yeteneğine kavuşturabilmektedir. Bu da kastrasyon direncini ortaya çıkarmakta ve hormon bazlı tedavilere karşı direnç gelişimine yol açmaktadır (24).

Araştırmacılar kanser hücrelerinde meydana gelen ilaç direncini zayıflatmak için yeni yöntemler geliştirmektedirler. Bu yöntemler, ilaç direncinin altında yatan mekanizmaları ortadan kaldırarak etkisiz hale getirmeyi amaçlamaktadır. Bunlara lapatinib kemoterapotik ajanının geliştirilmesi örnek verilebilir. Lapatanib, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ile ilişkili tirozin kinazların ATP-bağlayan bölgesine bağlanıp etkinlik gösterir (25). Bu özelliğinden dolayı ilaç direncinde görevli olan ABC taşıyıcı proteinlerin inhibisyonunu gerçekleştirme yeteneğine sahiptir. İlaç dirençli kanser hücrelerini tedavi etmede lapatinib bir çok çalışmada kullanılmıştır (26). Reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörü olarak kullanılan bir diğer kemoterapotik ajan ise gefitinibdir. Bu ajanın da ilaç dirençli meme kanseri hücrelerinin tedavisinde kullanıldığı gösterilmiştir (27). Başka bir çalışmada da araştırmacılar paklitaksel direnci gösteren prostat kanseri hücrelerinin hücre döngüsündeki kontrol mekanizmalarını ve mikrotübülleri hedefleyen başka bir taksan sınıfı bileşik olan cabazitaksel ile tedavi edilerek ilaca karşı hassasiyetin artırıldığı gösterilmiştir (24).

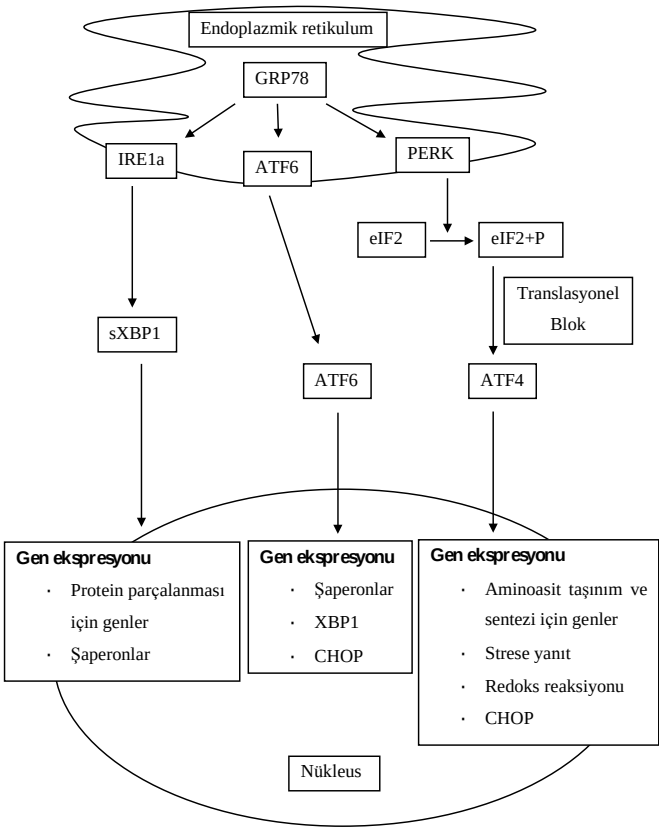
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Endoplazmik retikulum bir çok fonksiyonunun yanısıra, hücrede sentezlenen proteinlerin katlanması ve işlevsel olmasını sağlayacak olan üç boyutlu yapısının oluşumunda da rol alır. (5). Bu organel, protein sentezinde kalite kontrol bölgesi olarak da değerlendirilmektedir (7). Yanlış katlanmaya uğrayan proteinlerin ER lümeninde birikiminden dolayı ER homeostazı bozulur ve ER stresi gelişir (5, 7). Bu birikim, hücreler üzerinde toksik etkiye neden olmakta ve hücrelere zarar vermektedir. Bu zarar da kendisini patofizyolojik anlamda metabolik ve nörodejeneratif hastalıklar olarak göstermektedir. Hücreler kendilerini ER stresinden korumak amacıyla UPR yolağını aktive etmektedirler. Bu sayede katlanmamış proteinlerin birikiminin azaltılması hedeflenmektedir (7). Eğer yine de homeostaz sağlanamaz ise hücre apoptotik yolaklara başvurmak zorunda kalır (5).

ER stresinin temelini oluşturan moleküler mekanizmalar incelendiğinde 78 kDa ağırlığında glukoz-düzenleyici protein (GRP78), PRKR-benzeri ER kinaz (PERK), inozitol-ihtiyaçlı enzim 1a (IRE1a) ve aktifleştirilmiş transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) proteinleri görülmektedir (5). GRP78, proteinlerin doğru katlanmasını sağlama yeteneği olan bir şaperon proteindir. Diğer proteinler ise UPR yolağını etkinleştiren hücresel elemanlardır (Şekil 6). UPR yolağının aktifleştirilmesi; translasyonun azalmasına, endoplazmik retikulumdaki katlanmamış proteinlerin birikiminin önlenmesine, ER şaperonlarını ve protein

katlanmasından sorumlu enzimleri kodlayan genlerin translasyonunun artırılmasına hizmet etmektedir. PERK molekülü α ökaryotik başlama faktörü 2 (eIF2α)'nin fosforilasyonunu sağlar ve translasyon yavaşlar. Söz konusu molekül, kinaz aktivitesi gösteren sitozolik domainli tip I transmebran proteindir. UPR yolağıyla ilişkili genlerin yüksek ifadesi protein translasyonunun azalmasına sebep olur (7).

Endoplazmik retikulum stresi geliştikten sonra GRP78, lümene katlanmaya yardımcı olması için gönderilmektedir ve ardından sitozolik bölgesinin trans otofosforilasyonu ve dimerizasyonu üzerine PERK molekülü aktifleşir. Aktif PERK'in eIF2α'nın 51. pozisyonundaki serini fosforillemesi sonucu oluşan yeni eIF2α, translasyon sürecinde hücre içinde durdurma yeteneğini barındırır hale gelmektedir. Ancak ATF4 gibi transkripsiyon faktörü görevi yürüten mRNA'ların katıldığı translasyon süreçleri devam ederek miktarları artış göstermektedir. Böylece PERK aktivasyonu ile ER stresine karşı hücrenin protein yükü azaltılarak katlanmamış proteinlerin düzeltilmesi sağlanır (5).



Şekil 6. UPR sinyal yolağının şematik olarak gösterimi. XBP: X-bağlı protein. Transkripsiyon faktörü. CHOP: CCAAT/ artırıcı bağlayabilen protein.

ER fonksiyonunun incelendiği çalışmalar ER stresinin karsinogenez ile olan ilişkisini de ortaya koymaktadır. ER stresi sırasında etkinleşen IRE1α-XBP1 yolağı, çeşitli kanser oluşumlarında önemli rol oynamaktadır (50). Sinyal artırıcı ve transkripsiyon aktivatörü-3 (STAT3) molekülü normal hücrelerde geçici olarak aktifleşir. Ancak karsinogenez oluşumuyla ilgili olarak meydana gelen hücre çoğalması, apoptozun engellenmesi ve anjiyogenez gibi durumlarda STAT3 sürekli olarak etkinlik kazanır. STAT3 molekülünün de interlökin-6 (IL-6) üzerinde etkinlik sağlayarak apoptoza karşı direnç sağladığı gözlenmiştir (51).

KARSİNOGENEZ

Kanser dünya genelinde çok yaygın ve şiddetli şekilde gözlenen hastalıklardan birisidir. İstatistiksel veriler, dünya genelinde meydana gelen ölümlerin % 20'sinden kanser vakalarının sorumlu olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı gelişmiş ülkeler bütçelerinin % 10'unu kanser tedavisine ve yeni tedavi imkanlarının geliştirilmesine ayırmaktadır. Normal hücrelerde çoğalma ve hayatta kalım işlevlerinin kontrolünde işlev gören iletim yolaklarının işleyişini etkileyebilen onkojenik mutasyonlar sık olarak meydana gelmektedir. İletim yolaklarında gerçekleşen değişimler hücrenin çoğalma ve yaşama aktivitelerininin kontrolünü engellemekte ve oluşan onkojenik iletim tümör gelişimi ile birlikte invazyon ve metastaz sürecinde önemli rol almaktadır (28).

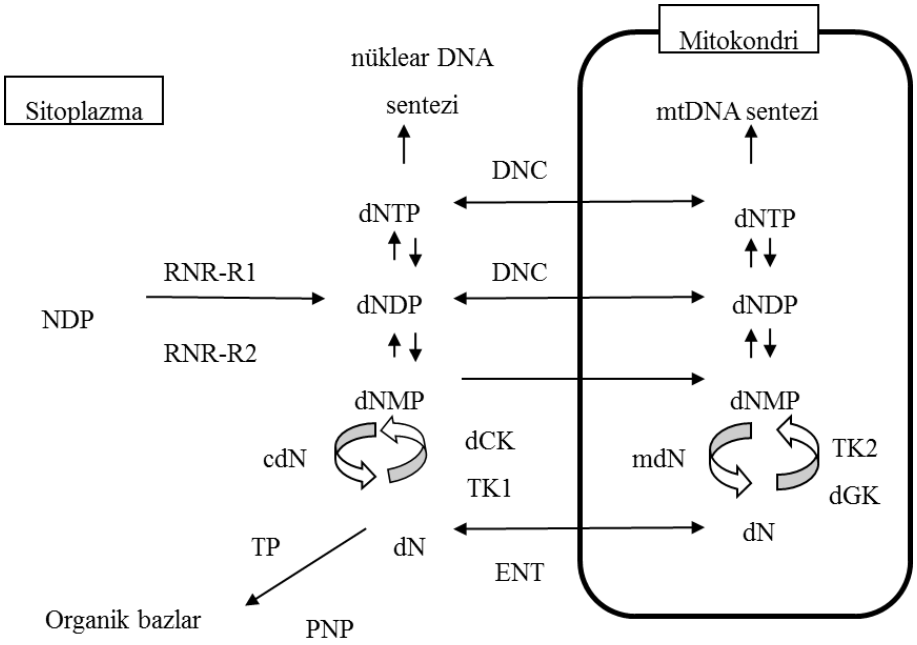
Protein kinazlar iletim sırasında protein fosforilasyonu/aktivasyonu sağlamakla görevli hücresel moleküllerdir. Bu moleküller zar yerleşimli ve sitoplazmik yerleşimli olmak üzere ikiye ayrılır. Zar yerleşimli olanlar reseptör tirozin kinazlar olarak adlandırılırlar. Reseptör tirozin kinazların sitoplazmik bölgelerinde aktivasyonu sağlayan bir kısım vardır. Burası tirozin kinaz kısmıdır. Söz konusu bu almaçlar büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale geçerler ve sitoplazmadaki hedef proteinler ile etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. Normal hücrelerde sinyal iletimi tersinir özelliktedir ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulur. Karsinogenez durumunda, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi meydana gelir. Protein kinazlar, KML hastalığında meydana gelen 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasındaki translokasyon gibi genomik değişimler, protein kinazların devamlı aktivasyonuna yol açan mutasyonlar ve protein kinazların aşırı sentezlenmesi olaylarıyla onkojenik transformasyona yol açabilirler. Prostat epitel hücrelerinin kötü huylu tümör durumuna ilerlemesi, protoonkogenlerin aktivasyonuna ilave olarak tümör supresör

özellikteki genlerin kaybı ile sonuçlanan mutasyon ve delesyonların kombinasyonuyla da meydana gelir (17).

Hücresel iletim mekanizmalarının prostat karsinogenezi sürecinde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Androjen reseptörü (AR), vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), endotelin A reseptörü (ETaR), fosfotidilinozitol-3-OH kinaz (PI3K), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve insülin büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF1R) söz konusu mekanizmalarda bulunan önemli elemanlardır. Özellikle PI3K/Akt/mTOR yolağı prostat kanserinde gelişim ve ilerlemede önemli bir role sahiptir. PI3K/Akt/mTOR yolağı sıklıkla prostat kanser hücrelerinde tümör supresör protein olan PTEN'in seviyesinin azalmasıyla aktifleşir. PTEN, PI3K/Akt yolağında inhibisyon sağlayabilme özelliğine sahiptir. Kanser, oluşum bakımından incelendiğinde, hücresel iletim mekanizmalarında meydana gelen değişimlerin etkili olduğu görülür. Bu mekanizmalar genellikle DNA tamir mekanizmaları, hücresel apoptoz yolakları, hücre farklılaşması ve çoğalmasını kontrol eden moleküler elemanlar gibi hücresel döngüyle yakın ilişkili oluşumlar ile ilgilidir. Normal şartlarda, DNA tamir mekanizmalarında hücrenin onaramayacağı bir hata oluştuğunda hücre apoptoz yolaklarını etkinleştirerek çevresine zarar vermeyecek şekilde ölüme yönelir. Ancak apoptozu yöneten yolaklarda meydana gelen onarılamayacak bir hata hücrenin işlevini doğru şekilde sürdüremeyip çevresine zarar oluşturmasına sebep olur. Kanserleşme de temel olarak böyle başlayarak ilerleyen süreçlerde başka doku ve organlara göç etme gibi kanser hücresi özelliklerini kazanır (29).

TRİAPİN

Triapin, ribonükleotid redüktaz (RNR) inhibitörü olarak görev yapar (30). Ribonükleotid redüktaz, DNA sentezi ve tamiri için kullanılan deoksiribonükleotid (dNDP) moleküllerinin sentezini sağlar (Şekil 7) (31). dNDP'ler, fosforillenerek deoksinükleotid trifosfat (dNTP) moleküllerini oluştururlar. dNTP'ler, DNA sentezi sırasında DNA polimeraz enzimi tarafından substrat olarak kullanılır (32). RNR, iki adet 90 kDa'lık regülatör görevi yapan RNR-R1 ve iki adet 45 kDa'lık katalizör görevi yapan RNR-R2 (p53R2) (RNR-M1) alt ünitelerinden oluşur (33, 35).



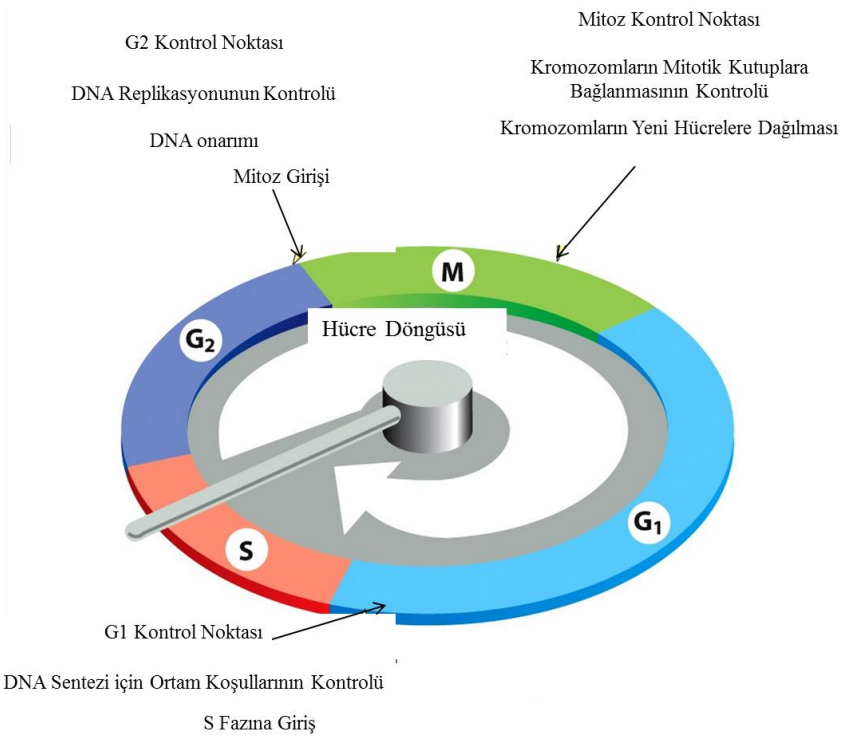
Şekil 7. Ribonükleotid redüktaz enziminin görevli ve ilişkili olduğu yolakların şematik olarak gösterimi. Nükleotid difosfat (NDP), ribonükleotid redüktaz R1, R2 alt üniteleri, deoksinükleotid monofosfat (dNMP), deoksinükleotid difosfat (dNDP), deoksinükleotid trifosfat (dNTP), deoksinükleotid (dN), timidin kinaz 1 (TK1) ve 2 (TK2), deoksisitidin kinaz (dCK), deoksiguanin kinaz (dGK), sitozolik deoksinükleotidaz (cdN), mitokondriyal deoksinükleotidaz (mdN), deoksinükleotid taşıyıcı (DNC), eşitleyici nükleosid taşıyıcı (ENT), timidin fosforilaz (TP), pürin nükleosid fosforilaz (PNP), ve mitokondriyal DNA (mtDNA).

Triapin, RNR'nin fonksiyonu üzerinde inhibisyon sağlar. Böylece, 3-AP uygulanan hücreler DNA sentezi ve tamirinden sorumlu olan moleküler mekanizmaları kontrol edemezler (34). 3-AP, tümör oluşumunu tetikleme özelliğine sahip onkogenlerle etkileşebilen RNR-R2 ile ilişki kurarak RNR'nin inhibisyonunu gerçekleştirir (35). 3-AP, demir iyonlarını bağlama özelliğine sahip bir indirgeyici molekül olduğundan yapısında demir bulunan enzimlerle etkileşebilme özelliği taşır (5). RNR-R2 hücre çoğalması ile yakın ilişkili durumdadır (35). RNR'nin inhibisyonundan sonra DNA tamir ve sentezinde aksaklık olan hücre G1 evresinde tutuklu kalır (36). 3-AP, hücre döngüsünü durdurmanın yanında metal iyonlarıyla etkileşebilmesinden dolayı da ER içi ile dışı arasındaki iyon dengesini bozar (37). Bunun sonucunda da ER stresi ile ilişkili üç temel yolak etkinlik kazanır (5). Bazı

çalışmalarda, 3-AP'nin Fe^{+2} ve Fe^{+3} içeren kompleksler üzerinde indirgeme özelliği göstermesinden dolayı O_2 varlığında reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu katalizlediği gösterilmiştir (38).

HÜCRE DÖNGÜSÜ VE DNA TAMİRİ

Hücrelerin sahip olduğu farklılaşma ve çoğalma yetenekleri, hücre bölünme süreçleri ile yakın ilişkili durumdadır. Özellikle bir dokuda yerleşik hücrelerin çoğalmaları mitoz bölünmenin moleküler düzeyde çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesiyle sürdürülür. Mitotik faz mitoz bölünme ve sitokinezi kapsar. Bu faz hücre döngüsünün en kısa evresidir. Mitotik hücre bölünmesinden sonra çok daha uzun bir evre olan interfaz gelir. Bu evre döngünün yaklaşık % 90'lık kısmıdır. İnterfaz evresinde hücre büyür ve genetik materyalini kopyalar. İnterfaz; G1, S ve G2 olarak adlandırılan evrelere ayrılmaktadır (Şekil 8). Bu evrelerde hücre proteinlerini ve sitoplazmik organellerini çoğaltarak büyür. Yalnızca S evresinde genetik materyal kopyalanırken G1 ve G2 evrelerinde protein sentezi ve hücre büyümesi gerçekleşmektedir. Özellikle G1 evresinde hücre replikasyonla ilişkili olan proteinlerini üretir (42).



Şekil 8. Hücre döngüsünde interfaz (G1-S-G2) ve mitotik (M) evrenin şematik olarak gösterimi.

Hücrenin bölünmeye hazırlık ve bölünme aşamaları özgül moleküler mekanizmalar tarafından titizlikle kontrol edilir. Bu amaç doğrultusunda mitoz bölünme öncesindeki G1, S ve G2 evreleri ile mitoz (M) evresinde kontrol noktaları bulunur (43). Bu noktalarda hücrenin genetik materyalinin bütünlüğü ve replikasyon işleminin doğruluğu kontrol edilir. Genetik materyalin hazır olmadığı durumlarda hücre bölünmeye gitmemekte ve yerleşik olduğu dokunun sağlığı için sahip olduğu apoptoz yolaklarını etkinleştirebilmektedir (44). Hücre döngüsündeki kontrol noktalarından en önemli olanı G1 evresinde bulunur. Bu evrede hücre bölünme bakımından duraklama ya da devam etme sinyalleri ile uyarılır. Duraklama sinyali alan hücre G0 evresine geçerek hücre döngüsünü durdurur. Devam etme sinyali alan hücre ise diğer kontrol noktalarından da geçip döngüsünü tamamlar (42). Hücre döngüsünde üç yerde kontrol noktası bulunur. Bunlardan ilki G1 evresinden S evresine geçiş noktasında bulunur ve çevrenin uygunluğunun kontrol edilmesinden sorumludur. Yeterli besin ve özel iletim molekülleri mevcut olduğunda hücre döngüsü ilerler. Eğer hücre dışı koşullar uygun değilse, hücrelerin S evresine geçişi engellenir ve G0 olarak bilinen özel dinlenme durumuna geçilir. Sinir ve iskelet kası hücreleri dahil bir çok hücre organizmanın genomu boyunca G0'da kalabilmektedir. İkinci kontrol noktası G2 evresinden M evresine geçişte bulunmaktadır. Burada DNA'nın replikasyonu kontrol edilmektedir. Hasarlı DNA'nın onarılması sağlanır. Genom doğru bir şekilde replike olup hasarlı kısımlar da onarıldıktan sonra M evresine geçilir. M evresinde bulunan üçüncü kontrol noktasında ise duplike kromozomların mitotik iğ iğliklerine bağlanarak metafaz plağı boyunca doğru bir şekilde dağıtılıp dağıtılmadığı kontrol edilir (46).

Hücre döngüsünün kontrolü siklin bağımlı kinaz (CDK) adı verilen enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. CDK2, CDK4 ve CDK6 başlıca siklin bağımlı kinazlardır (45). Bu enzimler hedefledikleri proteinleri fosforilleyerek onların aktivitelerini düzenlerler. Büyümekte olan bir hücrede, hücre döngüsünü yürüten kinazlar sabit bir konsantrasyonda bulunmakla birlikte çoğu zaman inaktif durumdadır. Böyle bir kinaz aktivite kazanabilmesi için bir siklin molekülüne ihtiyaç duymaktadır. Siklin proteinine bu adın verilme nedeni hücre içindeki derişiminin döngüsel olarak dalgalanma göstermesidir. Bu ihtiyaçtan dolayı kontrolden sorumlu proteinler CDK olarak adlandırılır (42).

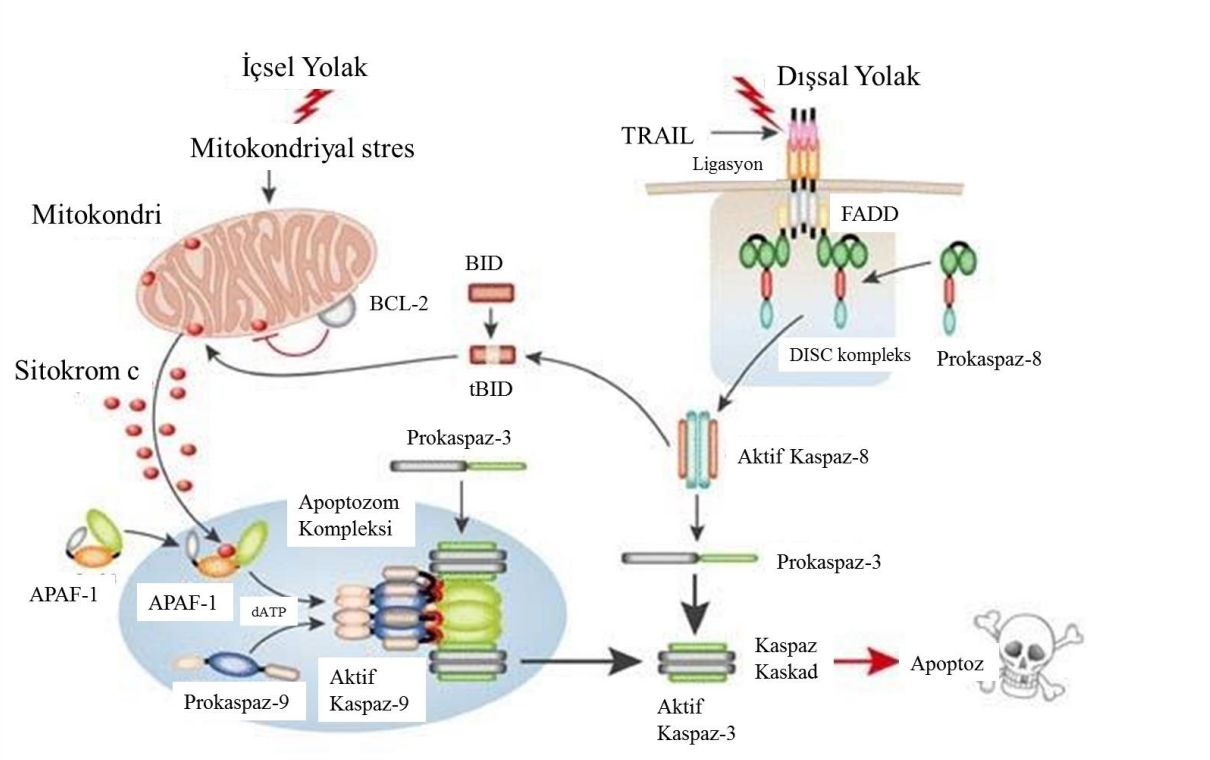
Kanser oluşumunda önemli etkenlerden biri de DNA tamir genlerinde meydana gelen mutasyonlardır. Hücre genomunda bir hasar tespit edildiğinde hücre döngüsü duraklar ve DNA tamir mekanizmalarından hasarın durumuna göre uygun olanı devreye girer. DNA tamir

genlerinde fonksiyonu engelleyici bir mutasyon olduğunda diğer bölgelerdeki mutasyonlar onarılamaz ve böylece mutasyonlar yeni hücrelere aktarılır. Kadınlarda sıklıkla gözlenen meme kanserinin oluşumunda *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde meydana gelen mutasyonların etkili olduğu saptanmıştır (47).

APOPTOZ

Hücresel gelişim, büyüme ve çoğalma kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmek zorundadır. Bu süreçlerin kontrol altında işlemediği durumlarda doku ve organ çapında fizyoloji risk altına girer. Kontrolün kaybı ilerleyen zamanlarda organizma açısından da risk teşkil edecektir. Bu kontrol apoptoz ve hücre döngüsünün dengelenmesi ile sağlanır (48).

Apoptoz, hücre içinden (intrinsik, içsel) ve dışından (ekstrinsik, dışsal) kaynaklı iletim mekanizmaları tarafından yakından kontrol edilir. Bu kontrol aynı zamanda hücresel homeostazinin korunmasını sağlar. Apoptoz oranının düşük olduğu durumlarda kanser ve otoimmün gibi hastalıklar oluşurken, yüksek oranda ise akut ve dejeneratif bir çok hastalık meydana gelir (52).



Şekil 9. İçsel ve dışsal apoptoz yolaklarında kaspaz aktivasyonunun şematik olarak gösterimi.

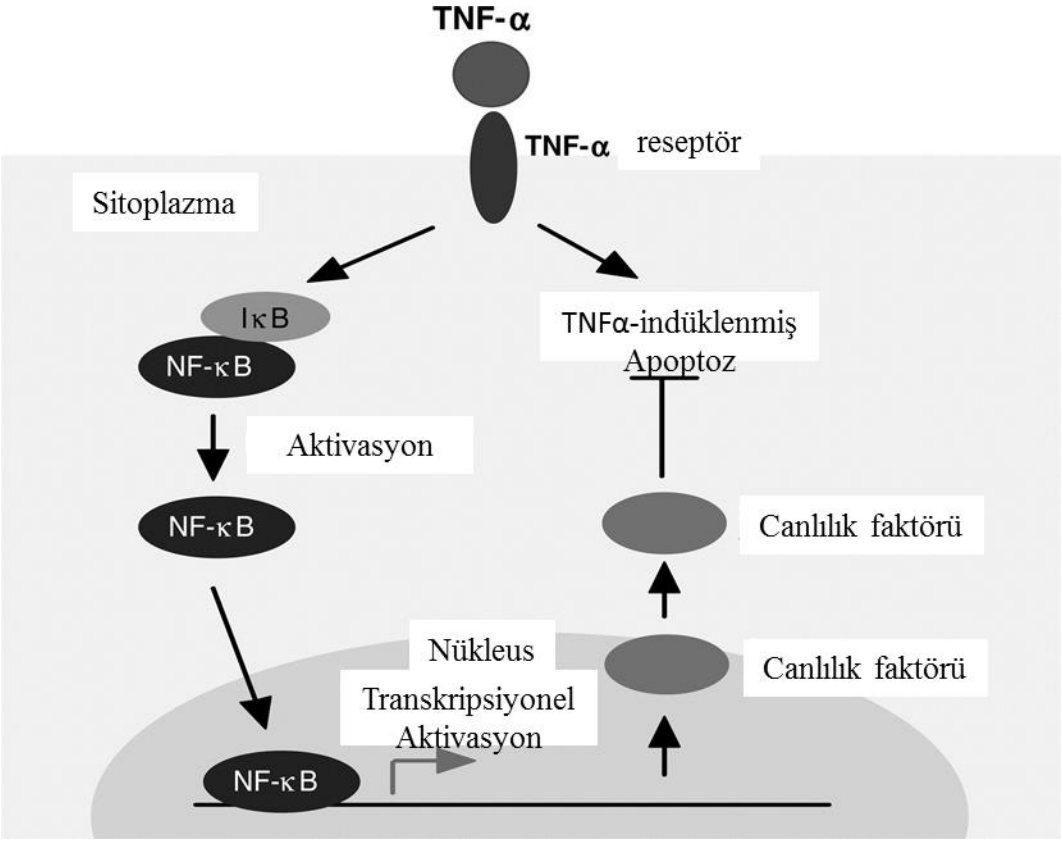
DNA tamir mekanizmaları, DNA üzerinde meydana gelen hataları düzeltmekle görevlidir. Bu hataların düzeltilemeyecek seviyede olduğu durumlarda hücre, organizma için zararlı bir durum oluşturmamak amacıyla içsel apoptotik mekanizmaların aktivasyonunu tetikler. İçsel yolakta mitokondri etkin bir role sahiptir. BCL-2 protein ailesinin antiapoptotik özellikte olan üyeleri, BCL-2 ve BCL-XL, mitokondrinin dış zarına bağlanarak işlev görmektedir. Aynı şekilde BCL-2 ailesinin proapoptotoik üyeleri olan BAD ve BAX da mitokondri zarıyla doğrudan bağlantı kurarak işlev görür. İçsel yolak aktivite kazandığında mitokondriden sitokrom c salınımı meydana gelir. Ardından BCL-2 proteinin inaktivasyonu ve kaspaz-9 aktivasyonu gerçekleşir. Kaspaz-9'un ardından gerçekleşen kaspaz-3 aktivasyonu ile birlikte apoptozom oluşumu sağlanır. Apoptozom, sitokrom c, APAF1 (Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1) proteini, ATP ve prokaspaz-9 içeren çok proteinli bir yapıdır. Mitokondri ile uyarılan içsel apoptoz yolağı DNA hasarı ya da dış kaynaklı uyaranlarla birlikte etkinlik kazanan en yaygın yolaktır (52). Bu durumun dışında da hücre, komşu hücrelerin bölünmelerine ve bulunduğu dokunun gelişmesine imkan vermek için de dışsal apoptotik mekanizmaların aktivasyonunu tetikleyebilmektedir. Dışsal yolakta hücre zarında bulunan ölüm almaçlarına ligandlar bağlandığında aktivasyon gerçekleşir. Daha sonra kaspaz-8 diğer kaspazları uyararak apoptoz indüklenir (52). Dışsal apoptotik mekanizmalardaki ölüm reseptörleri, taşıdığı toksisiteden dolayı hücreyi ölüme götürme özelliği taşıyan maddeler ile de tetiklenebilmektedir. Kanser vakalarının tedavisinde kullanılan kemoterapotik ajanlar yardımıyla özellikle bu durum amaçlanmaktadır. Kanser tedavilerinde apoptoz, otofaji ya da hücre döngüsünde durdurma gibi kanser hücrelerinin komşu sağlıklı hücrelere zarar vermeden öldürülebileceği durumlar oluşturulmak istenmektedir (49). Dışsal ve içsel yolakların nihayetinde kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleşir (Şekil 9).

Kaspazlar, ER ile ilişkili olan sistein proteaz ailesinin üyesidirler. Hücrelerde prokaspaz olarak adlandırılan inaktif bir proform yapıda bulunurlar ve apoptotik yolakların tetiklenmesiyle birlikte aktivite kazanırlar (7). Aktivite kazanımları apoptoz sinyalinin alınmasıyla birlikte diğer kaspazlar tarafından aspartik asit birimlerinden kesilerek meydana gelir. Aktivasyon kazanan kaspazlar diğer kaspazlara da aktivasyon kazandırarak işlem silsile halinde ilerleme gösterir. Kaspazlar 1'den 13'e kadar numara verilerek adlandırılmışlardır. Kaspaz-2, 8 ve 10 başlatıcı kaspaz olarak adlandırılırken 3, 6 ve 7 numaralı kaspazlar ise efektör kaspaz olarak adlandırılmaktadır. Hücre apoptoz sinyali aldığında başlatıcı kaspazlar,

adaptör proteinler aracılığıyla tetiklenerek aktivite kazanırlar. Adaptör proteinler başlatıcı kaspazların birbirine yakınlaşarak kümelenmelerini sağlamaktadır. Aktivasyon kazanan kaspazların her birinin hedefli olarak enzimatik aktivitelerini gösterdikleri hücresel elemanlar farklıdır. Bazı kaspazlar (Kaspaz-1, 2, 3) lamin proteinlerini parçalarken bazıları (Kaspaz-3 ve 6) da hücre iskeleti proteinlerine yönelir. Kaspazlar arasında DNA sindirimini sağlayan DNaz enzimin serbest kalmasını sağlayarak DNA parçalanmasını da uyarır. Kaspaz-12, ER stresiyle indüklenen apoptoz anahtar molekülü olarak önem taşımakta olup ER stresi tarafından aktivite kazanabilmektedir. Kalsiyum tarafından etkinleşen sitoplazmik proteaz özelliği gösteren kalpainlerin sağladığı aktivasyondur. ER'de kaspaz-12 aktive olduktan sonra prokaspaz-9 kesilerek aktivite kazanır ve kaspaz-9 işlevsel hale geçer. Kaspaz-9 da kaspaz-3 aktivasyonunu sağlayarak apoptoz gerçekleşir (7). Kaspaz-3 apoptoz sırasında hücresel proteinlerin enzimatik parçalanmasının yanında DNA tamir mekanizmasını da inaktive edebilmektedir. Bu durumu PARP (poly (ADP-riboz) polimeraz) enzimine bağlanarak bu enzimin kırık DNA zincirlerini tamir etmesini engelleyerek gerçekleştirmektedir (52).

Hücresel ölümün programlı olarak işleyebilmesi için birçok moleküler mekanizma işlev görmektedir. Bu amaçla apoptozu teşvik edecek yönde davranan *BAX*, *CASP3* (kaspaz-3), *CASP8* (kaspaz-8), *APAF1*, *BAK*, *P53*, *BID* ve *CYCS* (sitokrom c) gibi genlerinin yanısıra apoptozun engellenmesinde görevli olan *BCL-2*, *BCL-XL* ve *XIAP* gibi genler de mevcuttur. XIAP proteininin dahil olduğu IAP (inhibitör of apoptosis/apoptoz inhibitörleri) proteinleri böcekleri konak olarak kullanan virüslerde keşfedilmiştir. Böcek hücrelerinin virüslerle enfekte olduklarında içsel apoptotik yolakları etkinleştirme durumlarına karşın virüsler IAP'ları kullanarak konak hücrelerin ölmelerini engellediğini ve virüs replikasyonu için yeterli zamanın böylece kazanıldığı anlaşılmıştır (52). ER stresini kontrol altında tutamayan hücreler de apoptozu teşvik edebilen genlerin ifadesini artırma eğilimi göstermektedir. PERK, ATF6 ve IRE1a molekülleri sadece hayatta kalma işlevleriyle ilgili olan yolakları tetiklemezler, aynı zamanda apoptoz mekanizmalarını da indüklerler. Bu moleküller proapoptotik iletimleri tetiklemekle birlikte doğrudan hücre ölümüne yol açmazlar, CHOP ya da c-jun NH2- terminal kinaz (JNK) gibi moleküllerin aktivasyonunu tetiklerler (7). ER stresi sırasında sentezlerinde artış gözlenen bir diğer protein grubu ısı şoku proteinleridir (HSP, heat shock protein). HSP'ler ER stresi esnasında hücreyi stresten korumak amacıyla yüksek miktarda sentezlenir. Bu proteinlerin çoğunun antiapoptotik özellikte olduğu tespit edilmiştir.

ER stresiyle indüklenen apoptotik yolakları transkripsiyon faktörleri (CHOP), *BCL-2* ailesi üyeleri, kinazlar (JNK) ve kaspazlar oluşturmaktadır. Sinyal iletiminde görevli proteinlerden olan JNK, ER stresinde apoptotik yolak kontrolü sağlar. JNK gen ifadesini düzenler ve strese karşı yaşam ve apoptoz arasındaki dengeyi korumaktadır. IRE1a, XBP1'deki rolünden bağımsız olarak JNK sinyal yolunu aktive ederek apoptozu indükler. Ayrıca JNK, fosforilasyon yoluyla BCL-2 proteinlerini de kontrol etmektedir (7). BCL-2 üzerindeki kontrol, gen ifadesinin baskılanmasıyla gerçekleşirken *BAX* gen ifadesini artırmaktadır. JNK bulunduğu yolakta aktivasyon kazandıktan sonra P53 stabilizasyonu gerçekleştirir ve BCL-2/BCL-XL fosforilasyonuyla antiapoptotik proteinlerin baskılanmasını sağlar. Bu baskılanmadan mitokondriden sitokrom c salınımı indüklenerek kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleşir (52). Bu şekilde ER stresine karşı hücre mitokondri aracılı olan içsel apoptotik yolağı aktive etmiş olur. Apoptozun baskılanmasında görev alan NF-κB proteini JNK yolağının da baskılanmasını sağlamaktadır. NF-κB proteininin antiapoptotik etkisi TNFα aracılığıyla gerçekleşir. TNFα, enflamasyon, immünite, apoptoz ve farklılaşmada önemli rol üstlenmenin yanında NF-κB proteininin potansiyel indükleyicisidir. NF-κB, bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörüne ihtiyaç bulunmadığı durumlarda ya da aktivitesini kontrol etmek amacıyla IκB molekülü bağlı bulunur. İşlevsellik kazanması için bu molekülün serbestleşmesi gerekir (Şekil 10).



Şekil 10. TNFα ve NF-κB ilişkisinin şematik gösterimi.

Apoptozda iletim mekanizmaları tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesindeki TNFR, FAS ve TNFα gibi proteinlerin indüklemesiyle tetiklenebilmektedir. TNFα ve FASL sinyal yolakları TNFR ve FAS aracılığıyla hücre içi iletim mekanizmalarını uyarırlar. TNFR ve FAS almaçları ligand bağlanmasıyla birlikte DISC (death inducing signaling complex, ölüm indükleyici sinyal kompleksi) adı verilen karmaşık bir yapı oluştururlar. DISC, prokaspaz-8 düzeyinin korunmasını sağlamaktadır. Prokaspaz-8 düzeyi arttığı takdirde otokatalitik aktivasyonla birlikte DISC'ten ayrılır ve hedeflediği kaspazları aktive eder. Apoptoz kontrolünde görevli olan bir diğer protein P53 tümör baskılayıcı proteinidir. P53, hücresel stres sonucunda DNA onarılamayacak derecede hasarlı durumda bulunduğunda tümör oluşumunu engellemek amacıyla apoptozu indükler. Bunu BAX proapoptotik proteininin sentezini tetikleyerek gerçekleştirir. BAX aktivasyonu ile içsel apoptotik yolağa aktivasyon kazandırırken FAS ölüm yolağını aktive ederek de dışsal apoptotik yolağa aktivasyon kazandırır. Bunun yanında hücre döngüsündeki kontrol noktalarında DNA onarımını sağlayacak enzimlerin de indüklenmesinden sorumludur. Hasar çok yüksekse hücre döngüsünü G1 evresinde durdurur (52).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

HÜCRE KÜLTÜRÜ VE ARAŞTIRMA GRUPLARI

Bu tez çalışmasının kapsadığı tüm deneyler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki hücre kültürü, moleküler genetik ve görüntüleme laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Araştırmada insan prostat kanser hücre hatlarından kastrasyon dirençli PC3 hücreleri (ATCC® CRL-1435™) kullanıldı. Bu hücreler uygun besiyeri ortamında (DMEM/HAM'S F-12, 50/50 MIX, 1X, MULTICELL) ve % 10 FBS (fötal sığır serum, FSS) ve % 1 antibiyotik (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) (Gibco) bulunduran tam sıvı besiyerinde 75 cm^2'lik steril polisitren hücre kültürü kaplarında (SPL Life Sciences) çoğaltılarak araştırmada kullanıldı. Bu hücreler kültür kabı tabanına yapışarak (monolayer) 37 °C, % 5 CO_2 ve % 95 hava bulunduran steril inkübatörde (Thermo Scientific, USA) çoğalan hücrelerdir.

Hücre kültürü çalışmalarında ilaç direnci geliştirmek amacıyla dosetaksel (Cayman Chemical), ER stresi oluşturmak amacıyla triapin (3-AP) (Sigma-Aldrich) ve klinikte kullanılmakta olan ve tedaviyi desteklemek amacıyla da mitoksantron (MTX) (Cayman Chemical) kullanıldı. Stok derişimler DMSO (dimetil sülfoksit, Merck) içerisinde hazırlandı. Asıl çalışma derişimi içinde DMSO içeriğinin % 0,1'den düşük olacak şekilde uygulamalar gerçekleştirildi. Stok derişimler 3-AP için 100 mM, MTX için 1 mM ve dosetaksel için 10 µM olarak hazırlandı.

Pasajlama veya deneysel araştırmalarda kullanılan hücreler tripan mavisi (Sigma-Aldrich) kullanılarak boyanıp hemositometrede ve invert mikroskop (Nikon Eclipse TS100,

Japan) altında sayıları belirlenerek kullanıldı. Hücre kültürü deneylerinde her bir örnek için deneyler üç tekrardan oluştu. Elde edilen verilerde bir örnekliğin sağlanabilmesi için hücreler 18-25. pasajlarda kullanıldı. Araştırmada oluşturulan temel araştırma grupları aşağıda verildiği şekildedir:

- Grup 1: PC3 Kontrol (İlaç dirençsiz PCa hücreler)
- Grup 2: PC3 + 3-AP
- Grup 3: PC3 + MTX
- Grup 4: PC3 + 3-AP + MTX
- Grup 5: DR-PC3 Kontrol (İlaç dirençli PCa hücreler)
- Grup 6: DR-PC3 + 3-AP
- Grup 7: DR-PC3 + MTX
- Grup 8: DR-PC3 + 3-AP + MTX

HÜCRE SAYIMI

Çalışmada kullanılan hücrelerin sayımında hemositometre adlı lam kullanıldı. Bu işlem sırasında aşağıdaki basamaklar izlendi:

1. Kültür kabındaki medyum (sıvı besiyeri) uzaklaştırıldı.
2. Kültür kabı tabanı bir miktar PBS (fosfat tampon çözeltisi) (Sigma-Aldrich) ile yıkandı. T25 kültür kabı için 1 ml, T75 kültür kabı için 3 ml PBS yeterli oldu.
3. Kültür kabı tripsinize (tripsin ile muamele) edildi. T25 kültür kaplarına 1 ml, T75 kültür kaplarına 3 ml tripsin (Gibco, Trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red) uygulandı ve 15 dakika (dk) süre ile 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Tripsinin proteaz aktivitesi sayesinde hücrelerin hücre yüzey molekülleri ile kültür kabı tabanı arasındaki bağlar yok edilerek hücreler serbestleştirildi.
4. Kültür kabı içerisindeki tripsin ve hücre süspansiyonu temiz bir falkon tüpe alındı.
5. 150xg devirde 5 dk santrifüj (Centurion Scientific) yapıldı. Böylece tripsin, hücre artıkları ve ölü hücreler süpernatan kısımda kaldı. Pellet ise canlı hücrelerden oluştu.
6. Süpernatan döküldü. Pellet üzerine bir miktar medyum ilave edilip hücreler pipetaj yapılarak homojenizasyon sağlandı.

7. Hücre süspansiyonundan ve tripan mavisinden eşit hacimlerde (10 µl) alınarak hücre sayımı için karışım hazırlandı.
8. Hemositometrenin hücre sayım alanlarına lamel kapatılıp lam-lamel arasına mikropipet yardımıyla 10 µl karışım aktarıldı.
9. Hemositometre üzerindeki 4 tane hücre sayım alanının çaprazlama 2'sindeki hücreler sayıldı ve 2'ye bölünerek ortalama (A) alındı. Bu formülden 1 ml medyum içindeki hücre sayısı hesaplanmış oldu:

A X 10 000 X Sulandırma Faktörü = Toplam hücre sayısı

İLAÇ DİRENCİ GELİŞTİRME

PC3 hücrelerinde artan dozlarda dosetaksel uygulaması yapılarak ilaç direnci geliştirildi. Bunun için Takeda ve arkadaşlarının kullandığı yönteme bağlı kalarak, hücrelere 1 - 10 nM arasındaki düzeylerde artan dozlarda dosetaksel uygulandı (1). İlaç direnci geliştirmede doz uygulaması 48 saatlik periyotlarla gerçekleştirildi. İlk başta 1 nM uygulama yapıldıktan sonra 48 saat 37 °C % 5 CO_2 koşullarında inkübasyon sağlandı. İnkübasyon sonunda canlı kalan hücrelere ilaçsız taze besiyeri ile 24 saat yine aynı koşullarda inkübasyon uygulandı. Ardından 2, 4, 6, 8 ve 10 nM dozlar 48 saatlik periyotlarla uygulanıp her iki doz arasında 24 saat ilaçsız taze medyum kullanıldı. Gelişen direnci devam ettirmek amacıyla 10 nM'lık uygulamadan sonra her pasajlamada 3 nM kimyasal ajan içeren medyum kullanıldı. 18. pasajdan sonra hücre hattının dosetaksele karşı direnç kazandığı tespit edildi. Direnç kazanan hücreler pasajlanıp çoğaltıldıktan sonra ihtiyaç duyulduğu zaman kullanılmak üzere dondurularak muhafazaya alındı.

HÜCRE DONDURMA VE ÇÖZME

Kullanılan hücreler, yapılan çalışmada duyulan ihtiyaçtan daha fazla sayıda çoğalıyor veya yapılan çalışma bitmiş ya da ara verilecek ise uygun koşullarda dondurularak saklanabilir. Hücrelerin dondurulması, hücreler yeniden çözdürüldüğünde canlılıklarının kaliteli düzeyde olabilmesi için çok dikkat edilmesi gereken bir işlemdir. Bunun için aşağıdaki basamaklar takip edildi:

Ön Hazırlık

1. Dondurulacak hücre miktarına göre % 5 DMSO içeren besiyeri hazırlandı ve 4 °C'ye kaldırıldı (Örneğin; 10 vial için 15 ml) (2 x 10^6/viyal hücre konulacak şekilde).
2. Yıkama işlemi için yeterli besiyeri ısıtıldı (10 ml/15 ml falkon tüp).

Hücre Dondurma

1. Hücre kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. Kültür kabının taban alanı bir miktar PBS ile yıkandı ve tripsinize edildi.
3. Tripsin ile 10-15 dk muamele edilen hücrelerin üzerine ısıtılmış besiyeri eklendi.
4. Kültür kabındaki tripsin ve hücre süspansiyonu temiz bir falkon tüpe alındı.
5. 150xg devirde 5 dk santrifüj (Centurion Scientific) yapıldı. Böylece tripsin, hücre artıkları ve ölü hücreler süpernatan kısımda kaldı. Pellet ise canlı hücrelerden oluştu.
6. Süpernatan döküldü. Pelet üzerine vial başına 1,5 ml besiyeri ilave edilip hücreler pipetaj yapılarak homojenizasyon sağlandı. Hücre süspansiyonu 'cryovial' adı verilen tüplere konuldu (Hücre süspansiyonunda $2x10^6$ – $4x10^6$ hücre/ml olması, yeniden çözüldüğünde hücre canlılığının kaliteli olması açısından önemlidir). Hızlıca etiketlenip buzun üzerine alındı.
7. Hücrelerin bulunduğu tüpler dondurma kabına konulup –80 ºC'de bir gece bekletildi.
8. Ertesi gün sıvı azot tankına transfer edildi.

Hücre Çözme

1. Sıvı azot tankında muhafaza edilen hücreler tanktan çıkarıldıktan sonra 37 ºC'ye ısıtılmış olan su banyosuna transfer edilip burada çözünene kadar inkübasyon yapıldı.
2. Su banyosundaki inkübasyon sonunda hücreler 15 ml'lik bir falkon tüpte bir miktar besiyeri ile süspansiyon yapıldı.
3. 150xg devirde 5 dk santrifüj yapılıp ölü hücreler süpernatan ile birlikte uzaklaştırıldı.
4. Pelleti oluşturan hücreler bir miktar besiyeri ile muamele edilip hücre kültür kabına aktarıldı.

ÜÇ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ

İlaç direnci gelişiminden sonra direnç kazanan hücreler ile normal PC3 hücreleri ile üç boyutlu hücre kültürü hazırlandı. Bu amaç doğrultusunda 96 kuyucuklu kültür kaplarının (Nest Scientific) tabanları hücrelerin yapışmasını engellemek amacıyla % 1,5'luk agaroz (Sigma-Aldrich) solüsyonu ile kaplandı (5). Bunun için her kuyucuğa 70 µl hacimde % 1,5'luk agaroz eklendi. Daha sonra her kuyucuğa $2x10^3$ adet hücre olacak şekilde ekildi. Her kuyucuk için 100 µl besiyeri kullanıldı. Hücreler kültür kabı tabanına yapışamayınca birbirleriyle etkileşip sferoidal küresel yapılar oluşturdu ve besiyerinde askıda kalabilmesi sağlandı. Bu durum, çalışmamızı canlı organizma kullanmadan doku ortamına benzer koşullarda yürütebilmemizi sağladı. *İn vivo* modellerde kanserli dokuların iç kısımlarında bulunan hücrelerde hipoksi koşulları egemen olmaktadır. Oluşturulan üç boyutlu hücre kültürü ortamı iç kısımdaki hücreler üzerinde hipoksi koşullarını sağlamada yardımcı oldu (5). İlaç direnci kazanmış hücreler sferoid yapılarını oluşturduklarında 3-AP ve mitoksantron (MTX) kombinasyon dozları kullanılarak çalışmalar gerçekleştirildi.

HÜCRE SAĞKALIM ANALİZLERİ

Triapin ve mitoksantron uygulamalarının hücre canlılığı üzerine olan etkileri MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, C18H17N5S) canlılık tayini (sağkalım, viyabilite) yöntemi ile test edildi. MTT adlı molekül, canlı hücrelerdeki mitokondri zarında yerleşik olan mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimine bağlanarak formazan kristalleri meydana getirdi. Kristallerin çözdürülmesi ile ortaya çıkan absorbans derecesi ile canlı hücre miktarı doğru orantı göstermektedir. Bu doğrultuda daha önce verilen deney grupları halinde hücreler, 96-kuyucuklu kültür kaplarına 10^4/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 16 saat boyunca 37 °C % 5 CO_2 ortamda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 3-AP için 0; 0,8; 1,6; 3,2; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µM, MTX için 0; 0,08; 0,15; 0,31; 0,61; 1,25; 2,5; 5 ve 10 µM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar uygulandı. İnkübasyon süreleri sonunda hücre sağkalım oranları MTT kullanılarak ve aşağıdaki protokole bağlı kalınarak spektrofotometrik yöntemle kantitatif olarak saptandı:

1. Katı haldeki toz MTT, 1 mg/ml PBS kullanılarak çözdürüldü. Kullanılıncaya kadar karanlık ortamda +4 °C'de muhafaza edildi.
2. 96-kuyucuklu kültür kabındaki eski medyum uzaklaştırıldı ve yerine 100 µl yeni medyum eklendi.

3. 50 µl MTT her kuyucuğa eklendi ve 3 saat 37 °C'de inkübasyon yapıldı. Daha sonra MTT içeren medyum pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Yerine 200 µl DMSO ilave edilerek MTT ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enziminin oluşturduğu formazan kristalleri çözdürüldü.
4. 5 dk oda koşullarında inkübasyon sağlandı. Ardından absorbans okuyucu (Thermo Scientific, microplate reader, Finland) 570 nm (nanometre) dalga boyunda absorbans analizi yapıldı.

GEN İFADESİ ANALİZLERİ

İlaç direncinin gelişmiş olduğunu göstermek ve çalışmada kullanılan ajanların hücre içi moleküler yolaklar üzerinde nasıl bir etki meydana getirdiğini inceleyebilmek için moleküler genetik yöntemlerden yararlanıldı. Bu amaçla kullanılan hücrelerden ilk aşamada total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için kullanılan protokol aşağıda verildi:

Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu işlemi ticari kit (GeneJET RNA Purification Kit - Thermo Fisher Scientific, Lithuania) ile gerçekleştirildi. İşlem öncesinde % 2 merkaptoetanol (Sigma-Aldrich) içeren lizis tamponu (1000 µl LB + 20 µl merkaptoetanol) ve % 70 etil alkol (Sigma-Aldrich) hazırlandı.

1. Kültür kaplarından besiyeri uzaklaştırıldı ve inkübasyon sonunda hücreler 2 defa soğuk PBS ile yıkandı (T75 kültür kabı için 6 ml PBS, T25 kültür kabı için 2 ml PBS). Daha sonra her bir T25 kültür kabına 600 µl lizis tamponu eklendi. 15 dk oda sıcaklığında bekletildi.
2. Kültür kabındaki homojenat 1,5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp 12.000Xg'de 4 °C'de 2 dk yüksek devirli ve soğutmalı santrifüj cihazı (Heraeus) kullanılarak santrifüj yapıldı.
3. Hücre artıkları pellette toplanırken hücre içeriği süpernatanta kaldı. Süpernatan 1,5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.
4. Süpernatan üzerine eşit hacimde % 70 etil alkol eklenip hemen vorteks (ISOLAB) kullanılarak karıştırıldı.

5. Karışım spin kolona 700'er µl halinde 2 kerede aktarıldı. Her bir aktarımda 12.000Xg'de 4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı ve toplama tüpüne geçen kısım her seferinde uzaklaştırıldı.
6. Ardından spin kolona 700 µl yıkama tamponu 1 konuldu. 12.000Xg'de 4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki kısım uzaklaştırıldı.
7. Spin kolona 500 µl yıkama tamponu 2 konuldu. 12.000Xg'de 4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki kısım uzaklaştırıldı.
8. Spin kolona 500 µl yıkama tamponu 2 konuldu. 12.000Xg'de 4 °C'de 2 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpü atıldı.
9. Daha sonra spin kolon, 1,5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpün içine yerleştirildi ve kolonu yıkamak amacıyla 50 µl nükleaz içermeyen su kolonun tam ortasına pipetlendi. Ardından 12.000Xg'de 4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı.
10. Alt kısımdaki 1,5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpün içinde 50 µl RNA karışımı bulunmaktadır.

Elde edilen RNA örnekleri uzun süreli muhafaza amacıyla derin dondurucuda (Thermo Scientific) -80 °C'de saklandı. İzolasyon sonucunda elde edilen RNA örnekleri ile aşağıdaki protokol kullanılarak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildi:

cDNA Sentezi ve RT-qPCR Analizi

İnkübasyonlar sonrası elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları spektrofotometrik okuyucu (Optizen Nano Q Micro Volume Photometer) kullanılarak ölçüldü ve sentez reaksiyonunda her bir örnek için 1 000 ng (nanogram) RNA kullanılacak şekilde ayarlama yapıldı. Reaksiyon ticari kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit - Applied Biosystems) kullanılarak oluşturuldu. cDNA sentez reaksiyonu; 10X RT tamponu (2,0 µl), 25X dNTP karışımı (0,8 µl), 10X RT random primerler (2,0 µl), revers transkriptaz (1,0 µl), nükleaz içermeyen su (4,2 µl) ve bir örneklik cDNA sentez karışımı 10,0 µl şeklindedir. Reaksiyon karışımı ise (herbir örnek için): RNA (1000 ng olacak), su ve karışım için toplam 20 µl olarak hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazında gerçekleştirildi (ProFlex PCR System). 25 °C'de 10 dk, 37 °C'de 120 dk ve 85 °C'de 5 dk olacak şekilde reaksiyon protokolü uygulandı. Sentezlenen cDNA molekülleri kalıp olarak kullanılıp analiz edilmesi istenen genler için özgül primerler (Tablo 2) yardımıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR) oluşturuldu. Bu

reaksiyon RT-qPCR için uygun cihazda gerçekleştirildi (Applied Biosystems, StepOnePlus Real Time PCR System). 95 °C 5 dk (ilk denatürasyon), 95 °C 15 saniye, 60 °C 40 saniye, 70 °C 45 saniye (40 döngü) olacak şekilde reaksiyon protokolü uygulandı. Böylece mRNA seviyesi analiz edilerek ilaç direnci, apoptoz, hücre döngüsünde duraklama ve ER stresiyle ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki ifade seviyeleri analiz edildi. İlaç direnci göstermeyen hücrelerle de bu analizler yapılıp dirençli hücrelerin farkı gösterildi.

Tablo 2. RT-qPCR analizinde araştırılan genler

Gen	Primer	Gen	Primer
GAPDH	F: 5'-TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3'	*BID*	F: 5'-CCTACCCTAGAGACATGGAGAAG-3'
	R: 5'-TGTCATCATATTTGGCAGGTTT-3'		R: 5'-TTTCTGGCTAAGCTCCTCACG-3'
ABCG2	F: 5'-TGACGGTGAGAGAAAACTTAC-3'	*BCL-XL*	F: 5'-GTAAACTGGGGTCGCATTGT-3'
	R: 5'-TGCCACTTTATCCAGACCT-3'		R: 5'-TGGATCCAAGGCTCTAGGTG-3'
ABCB1	F: 5'-GGCAAAGAAATAAAGCGACTGAA-3'	*P21*	F: 5'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA-3'
	R: 5'-GGCTGTTGTCTCCATAGGCAAT-3'		R: 5'-GACTCTCAGGGTCGAAAACG-3'
ABCC1	F: 5'-CTACCTCCTGTGGCTGAATCTG-3'	*TNFA*	F: 5'-CCATGTTGTAGCAAACCCTCAAGCTG-3'
	R: 5'-CATCAGCTTGATCCGATTGTCT-3'		R: 5'-AGACTCGGCAAAGTCGAGATAGTCGG-3'
EIF2AK3	F: 5'-GAACCAGACGATGAGACAGAG-3'	*FAS*	F: 5'-CAAGGGATTGGAATTGAGGA-3'
	R: 5'-GGATGACACCAAGGAACCG-3'		R: 5'-TGGAAGAAAAATGGGCTTTG-3'
ERN1	F: 5'-TGCTTAAGGACATGGCTACCATCA-3'	*FASL*	F: 5'-TGGGGATGTTTCAGCTCTTC-3'
	R: 5'-CTGGAACTGCTGGTGCTGGA-3'		R: 5'-CAGAGGCATGGACCTTGAGT-3'
RNRM1	F: 5'-GAGGAATTGGTGTTGCTGTG-3'	*P53*	F: 5'-CACGAGCGCTGCTCAGATAGC-3'
	R: 5'-ACTCTCAGCATCGGTACAAGG-3'		R: 5'-ACAGGCACAAACACGCACAAA-3'
BAX	F: 5'-TTCATCCAGGATCGAGCAGA-3'	*P27*	F: 5'-CCGGCTAACTCTGAGGACAC-3'
	R: 5'-GCAAAGTAGAAGGCAACG-3'		R: 5'-TGGATCCAAGGCTCTAGGTG-3'
APAF1	F: 5'-GATATGGAATGTCTCAGATGGCC-3'	*CDK2*	F: 5'-GTACCTCCCCTGGATGAAGAT-3'
	R: 5'-GGTCTGTGAGGACTCCCCA-3'		R: 5'-CGAAATCCGCTTGTTAGGGTC-3'
CASP3	F: 5'-GGTATTGAGACAGACAGTGG-3'	*CDK4*	F: 5'-CTGGTGTTTGAGCATGTAGACC-3'
	R: 5'-CATGGGATCTGTTTCTTTGC-3'		R: 5'-GATCCTTGATCGTTTCGGCTG-3'
BCL-2	F: 5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3'	*CDK6*	F: 5'-AGACCCAAGAAGCAGTGTGG-3'
	R: 5'-ACAGTTCCACAAAGGCATCC-3'		R: 5'-AAGGAGCAAGAGCATTCAGC-3'
CASP8	F: 5'-CTGCTGGGGATGGCCACTGTG-3'	*CYCLIND1*	F: 5'-CGTCCATGCGGAAGATC -3'
	R: 5'-TCGCCTCGAGGACATCGCTCTC-3'		R: 5'-CAGAGGGCAACGAAGGT-3'
BAK	F: 5'-TTTTCCGCAGCTACGTTTTT-3'	*CYCLINE1*	F: 5'-TGAAGAAATGGCCAAAATCGA-3'
	R: 5'-TGGTGGCAATCTTGGTGAAGT-3'		R: 5'-ATTGTCCCAAGGCTGGCTC-3'
Sitokrom c	F: 5'-AGTGGCTAGAGTGGTCATTCATTTACA-3'		
	R: 5'-TCATGATCTGAATTCTGGTGTATGAGA-3'		

F: İleri pirmer dizisi

R: Geri primer dizisi

HÜCRE APOPTOZ ORANI ANALİZİ

Deney gruplarına uygulanan ajanların apoptotik yolakları tetikleme yeteneğini belirlemek amacıyla görüntüleme temelli sitometre tekniğinin kullanıldığı TALİ analizi

yapıldı. Analiz yapılırken ticari kit (Tali® Cell Cycle Kit – Molecular Probes) ve görüntüleme cihazı (Tali® Image-Based Cytometer - Ref. T10796 / Invitrogen) kullanıldı. Bu analiz, hücre canlılığının ve apoptotoik hücre miktarının; canlı ve apoptotik hücrelere özgü boyalarla boyanmasıyla belirlendiği bir yöntemle yapıldı. Annexin canlı hücre zarlarına fosfolipid bağları ile bağlanan protein yapıda bir bileşiktir. Propidium iodid ise canlı hücrelere geçemeyen ancak ölü hücrelere girip nükleik asitlere bağlanarak floresan ışıma yaymalarını sağlayan bir boyadır. Analiz aşağıdaki protokole göre yapıldı:

1. Annexin tamponunun hazırlanması: Ticari kit içindeki 5X stok halde bulunan annexin tamponu 1X olacak şekilde sulandırılarak karanlık ortamda ve 4 °C'de muhafaza edildi.
2. Kültür ortamındaki hücreler tripsin ile muamele edilerek 750Xg'de 1 dk santrifüj yapıldı. Gerekli durumlarda tripsin ile muamele öncesinde besiyeri de muhafaza edilerek TALİ analizi besiyeri için de gerçekleştirilebilir. Bunun nedeni besiyerinde bulunan ölü hücrelerin de analizine başvurmaktır.
3. Süpernatan tamamen uzaklaştırıldı ve her $5x10^6$ hücre için 100-300 µl kadar annexin tamponu ilave edildi.
4. Her 100 µl örnek için 5 µl Annexin V Alexa Flour 488 maddesi ilave edilip karıştırıldı.
5. 20 dk oda koşullarında ve karanlıkta inkübasyon sağlandı.
6. Hücreler 750Xg'de 1 dk santrifüj yapılarak süpernatan tamamen uzaklaştırıldı. Pellet 100 µl annexin tamponu içerisinde süspansiyon hale getirildi.
7. Her 100 µl örnek için 1 µl propidium iodide ilave edilip ve karıştırıldı.
8. TALİ görüntüleme lamına 20-25 µl hacimde örnek koyulup 1-5 dk sonra cihaz (Tali® Image-Based Cytometer) yardımıyla görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.

HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

Hücresel DNA içeriğinin analizi, hücre döngüsü evrelerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hücre döngüsü boyunca DNA miktarı replikasyondan dolayı ikiye katlanır. Bu katlanma izlenebilir ve hücre döngüsünü belirlemek için kullanılabilir. G1 evresindeki hücreler bir çift kromozom grubuna sahiptir. S fazı boyunca hücresel DNA replikasyona uğrar, böylece DNA miktarı G1'deki miktarın bir ile iki katı arasında saptanır. G2/M fazındaki hücrelerdeki durum ise G1'deki hücrelere kıyasla iki katı DNA miktarı

bulunmasıdır. Böylece, hücrelerdeki DNA miktarı hücrelerin döngünün hangi evresinde bulunduğunu doğrudan yansıtır. Propidyum iyodür, RNaz A, Triton® X-100 ve Tali® Image-Based Cytometer ticari kitin içinde bulunmaktadır.

Analiz 10^5 – $5x10^6$ hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonunda kullanılabilir. PBS, soğuk durumdaki % 70 etanol ve Tali® Hücresel Analiz Slaytları (Kat Kodları T10794, T10795) kullanıldı.

1. Hücreler 500Xg'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatan uzaklaştırıldı ve pelet PBS yardımıyla tekrar süspansiyon hale getirildi.
2. Hücreler 500Xg'de 5 dk santrifüj edildi ve tüpler buz üzerine alındı.
3. PBS uzaklaştırılıp soğuk durumdaki % 70 etil alkolde tekrar süspanse edildi. İşlem vorteks eşliğinde gerçekleştirildi. Ardından -20 °C'de bir gece boyunca hücreler inkübe edildi.
4. Ertesi gün hücre süspansiyonu boyama ve analiz için 4 °C'de 5 dk 1.000Xg'de santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırılıp pelet 1 ml PBS içinde süspanse edildi.
5. Hücre süspansiyonu 500Xg'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. PBS uzaklaştırıldı ve hücreler, 200 µl Tali® hücre döngüsü çözeltisi (Tali® Cell Cycle Solution) ile süspanse edildi.
6. Karanlık ortamda hücreler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
7. Hücre döngüsü analizinden önce vorteks yardımıyla hücreler tekrar süspansiyon haline getirildi cihaz yardımıyla (Tali® Image-Based Cytometer) görüntüleme yapıldı.

PROTEİN DÜZEYİ ANALİZİ

PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP uygulamasının gen ifadesi üzerine olan etkisi protein düzeyinde de araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda JNK (p-JNK (14.Thr 183/Tyr 185): sc-293136 Santa Cruz Biotechnology, INC.), NF-κB (Nüklear Faktör Kappa B) (NFkB p105/p50 Antibody (2J10D7) NB100-56583 novusbio), IRE1a (IRE1 alpha [p Ser724] Antibody NB100-2323 novusbio), ABCG2 (ABCG2/CD338 Antibody (3G8) NBP2-22124 novusbio) ve ACTB (β-aktin) (beta-Actin Antibody NB600-503 novusbio) proteinlerine özgül antikorlar kullanıldı. Protein düzeyi analizi yapmak amacıyla western blotting tekniği ticari kit (Invitrogen) yardımıyla kullanıldı. Western blotting, protein düzeyi analiz etmek amacıyla kullanılan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Teknik uygulanırken şu basamaklar takip edildi:

1. Protein ekstraksiyonu ve protein miktarının belirlenmesi
2. Reaksiyon karışımı hazırlama ve protein denatürasyonu
3. Proteinlerin jele yüklenmesi
4. Jel elektroforezi
5. Jelden membrana aktarım
6. Bloklama
7. Primer antikor bağlanması ve yıkama
8. Sekonder antikor bağlanması ve yıkama
9. Kemilüminesans bağlanması ve görüntüleme
10. Analiz

Protein Ekstraksiyonu

Protein ekstraksiyonu işlemi aşağıdaki protokole uygun olarak yapıldı:

1. Yüksek devirli soğutmalı santrifüj 4 °C'ye ayarlandı.
2. İnkübasyon sonunda hücreler 2 defa soğuk PBS ile yıkandı (T75 kültür kabı için 6 ml PBS, T25 kültür kabı için 2 ml PBS).
3. RIPA tamponuna (her 1 ml RIPA için) 10 µl PMSF, 10 µl sodyum ortovanat ve 10-20 µl PIC (proteaz inhibitör kokteyli) eklendi.
4. T75 kültür kabına 1000 µl, T25 kültür kabına 400 µl RIPA tamponu eklendi.
5. 15 dk soğuk ortamda bekletildi (buz üzerinde veya 4 °C'de).
6. Daha sonra kültür kabındaki homojenat mikrosantrifüj tüplerine alındı.
7. 12.000Xg'de 4 °C'de 10 dk santrifüj yapıldı.
8. Süpernatanlar yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
9. Protein konsantrasyonları spektrofotometrik olarak analiz edildi.
10. Yeterli protein bulunması halinde her bir örnek ikişer adet mikrosantrifüj tüpüne bölündü.
11. Kısa süreli depolama için örnek 4 °C'de, uzun süreli depolama için ise -80 °C'de muhafaza edildi.

Reaksiyon Karışımı Hazırlama ve Protein Denatürasyonu

Protein denatürasyonu için aşağıda belirtilen oranlarda bileşenleri içeren reaksiyon karışımı hazırlandı: 6,5 µl örnek için (protein (125 µg olacak şekilde eşitlendi.)+ su); 2,5 µl LDL Sample Buffer (4X) NuPAGE (seyreltme yok) ve 1 µl SRA (Sample reducing Agent) (10X) Bolt TM (seyreltme yok) kullanılarak 10 µl reaksiyon karışımı hazırlandı.

Hazırlanan numuneler PCR cihazında 95 °C'de 5 dk denatüre edildi. Bu aşamada katlanmış haldeki protein zincirleri arasındaki bağlar kırılarak proteinler düz zincirli forma dönüştü ve bu durum jelde hızlı yürümeyi sağladı. Denatürasyondan sonra örnekler soğuk blok üzerine alındı ve bir süre soğumaları için beklendi.

Proteinlerin Jele Yüklenmesi

Proteinlerin jele yüklenmesi ve gerekli tamponların hazırlanması aşağıdaki gibi gerçekleştirildi: MES SDS Running bafır (20X) çözeltisi 1X'e seyreltildi. 1000 ml tampon tank için yeterli oldu.

950 ml deiyonize su + 50 ml (20X) yürütme tamponu=1X SDS yürütme tamponu (1000 ml)

- Elektroforez tankının içine running bafır (Tris-Glisin- SDS) dolduruldu.
- Jel paketten çıkarılıp jel kasetinin altındaki bant çıkarıldı.
- Taraklar her iki taraftan tutularak dikkatlice çıkarıldı.
- Jel mini jel tankı içerisine oturtuldu. Kuyucukların ön kısma bakan tarafta olmasına dikkat edildi.

Not: Taraklar 15 kuyucukludur.

-Magic marker XP western protein standart (ışık altında görünebilmesi için) 7 µl.

-See Blue Plus 2 presteined standart (Jelde görünürlüğü sağlar) 5 µl ve 8 µl denatüre protein olacak şekilde en fazla 20 µl hacimde belirli yerlere yükleme gerçekleştirildi.

Jel Elektroforezi

100 V 90 dk kadar yürütme yapıldıktan sonra kontrollü bir şekilde yürütme yapıldı. Bantların düzgün yürümesine özen gösterildi. Yüksek voltajdan kaçınıldı.

Jelden Membrana Aktarım

Jelden membrana aktarma işlemi aşağıdaki gibi yapıldı:

1. Yürütme işleminden sonra jel kasetleri tanktan alınarak spatula ile yanlardan kaldırılarak açıldı. Jelin üst ve alt kısımları düzgün bir şekilde kesilip atıldı.
2. Jelin kurumaması için kasetin alt kısmıyla beraber jel saf su içerisine alındı.
3. Blotlama cihazı (Invitrogen) açıldı.
4. Kapak kısmına sünger, metal kısmı sağ üst köşeye gelecek şekilde yerleştirildi.
5. "NC anode Stack Bottom Regular" üst folyosu açılarak cihaza tablasıyla beraber oturtuldu. Üst kısmında mebran olduğundan dokunulmamalı.
6. Jel kaseti jelle beraber su içinde hafifçe çalkalanarak jel ve kaset arasına hava girmesi sağlandı ve kolay ayrım gerçekleştirilmesi sağlandı. Jel sudan iki elle yavaşça ileri ve yukarı yönde sudan ayrılarak kaldırıldı.
7. Bottom üzerine alt uçtan başlanarak yavaşça hava boşluğu bırakmadan serilip yerleştirildi ve rulo ile kabarcıklar tek yönlü rulo yapılarak uzaklaştırıldı.
8. Filtre kağıdı suda ıslatılarak jelin üzerine serilip ve rulo ile kabarcıklar uzaklaştırıldı.
9. Cathode stack top filtre kağıdının üzerine konularak (iç kısmına dokunulmamalıdır) kapatıldı. 25 V (volt) 1,3 A (amper) 7 dk'lık transfer programı seçilip işlem başlatıldı.
10. Bu süreç sonunda proteinler membrana geçmiş oldu.
11. Bottom plaka alınarak jel atıldı. Membran belirlenen yerlerden jilet ile kesilip ayrıldı ve kurumaması için suya kondu.
12. Su boşaltılarak bloklama işlemi gerçekleştirildi. Membran üzerine 20 ml bloklama solüsyonu eklendi.
13. 23 °C'de 300 (speed) 120 dk inkübatörde çalkalandı.
14. İşlem sonunda bloklama solüsyonu tekrar kullanılmak üzere falkona alındı.
15. Birkaç kez su ile yıkama yapıldı.

Bloklama

14 ml ultra saf su + 4 ml Bloklama bileşeni A + 2 ml Bloklama bileşeni B = total 20 ml olacak şekilde bloklama solüsyonu hazırlandı.

- Bloklama solüsyonu ile istenmeyen bağlanmaların önüne geçilmiş oldu.
- Membran üzerine birincil antikor dökülerek 1 gece bekletildi.
- Karıştırıcı 4 °C'de muhafaza edilerek membran kapları karıştırıcıya bant ile sabitlendi ve en düşük devirde çalkalandı.

Primer Antikor Bağlanması ve Yıkama

150 ml ultra saf su + 10 ml antikor yıkama solüsyonu (16X) bir araya getirilerek yıkama tamponu hazırlandı. Bir gece primer antikorda bekleyen membranların antikor çözeltileri tekrar kullanılmak üzere falkona toplandı. 3 kere 5 dk yıkama tamponu ile yıkama yapıldıktan sonra 1 kere 5 dk ultra saf su ile yıkama yapıldı.

Sekonder Antikor Bağlanması ve Yıkama

Sekonder antikor çözeltisi membran üzerine dökülerek oda sıcaklığında 1 saat 300 devirde inkübasyon yapıldı. İkinci antikor işlem sonrası falkona toplandı. 3 kere 5 dk yıkama tamponu ile yıkama yapıldıktan sonra 1 kere 5 dk ultra saf su ile yıkama yapıldı.

Kemilüminesans Bağlanması ve Görüntüleme

1 membran için; 2,375 ml kemilüminesans substrat + 0,125 ml enhancers= total 2,5 ml kemilüminesans çözeltisi hazırlanıp alimünyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu. Membran karanlık bir yere alındıktan sonra kemilüminesans çözeltisi tüm yüzeye yayılarak uygulandı. 4 dk beklenildikten sonra görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.

HÜCRE GÖÇÜ ANALİZİ

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran yüksek oranda çoğalma gibi özelliklerin yanında bir başka özellik de bulundukları bölgeden farklı doku ve organlara göç edebilme yeteneğidir. Kanser hücrelerinin bu yeteneklerine hücre göçü denir. Araştırma kapsamında kullanılan ajanların hücre göçü yeteneği üzerindeki etkisi de araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda T25 hücre kültürü kaplarından her birine $9x10^5$ hücre ekildi. Bu aşamada kültür kabının taban alanının hücreler tarafından tamamen kaplanmasına özen gösterildi. Ekim işleminden 16-24 saat sonra kültür kabının tabanı pipet ucu yardımıyla çizilerek çizilen bölgedeki hücrelerin tabandan serbestleşmesi sağlandı. Yoğun bir şekilde hücre ekiminin amacı tabanda oluşturulan boşluğun görüntülemede daha net görünmesidir. Kalkan hücreler PBS ile yıkanarak kültür kabından uzaklaştırıldı. Kontrol ve uygulama grupları için serum içermeyen besiyeri kullanılarak ajanlar belirlenen IC50 dozlarında uygulandı. Ardından 0, 24 ve 30. saatlerde mikroskop yardımıyla fotoğraflama işlemi yapıldı. Hücre kültürü kabının tabanındaki boşluğun o bölgeye göç eden hücreler sayesinde kapanma durumu gözlendi.

HOESCHT BOYAMA İLE APOPTOZ GÖRÜNTÜLEME

Hoescht boyası DNA ile etkileşip onu görünür yapabilmektedir. Bu özellikten dolayı hoescht boyama ile nüklear DNA'nın ve nükleusun boyanması gerçekleştirildi. Boyama işleminden 72 saat önce deney gruplarına uygulamalar yapıldı. Görüntüleme işleminden önce hücre kültürü kaplarından besiyeri uzaklaştırılıp kap tabanı PBS ile yıkandı. Ardından PBS içerisinde çözdürülmüş hoescht boyası karşımı kültür kabına uygulandı ve flouresans mikroskop yardımıyla görüntüleme yapıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Gerçekleştirilen analizlerle hücre sağkalım oranı, gen ifadesi, apoptoik hücre oranı, hücre döngüsü, protein düzeyi ve RT-qPCR verilerine dayalı olarak elde edilen sonuçlar, SPSS 18 (PASW Statistics) programı üniversite lisanslı (IBM, ABD) kullanılarak istatistiksel analiz ile değerlendirildi. RT-qPCR analizlerinde ΔΔCt metodundan yararlanıldı. SPSS 18 programında ise "One Way Anova" ve "Duncan" testlerinden yararlanıldı.

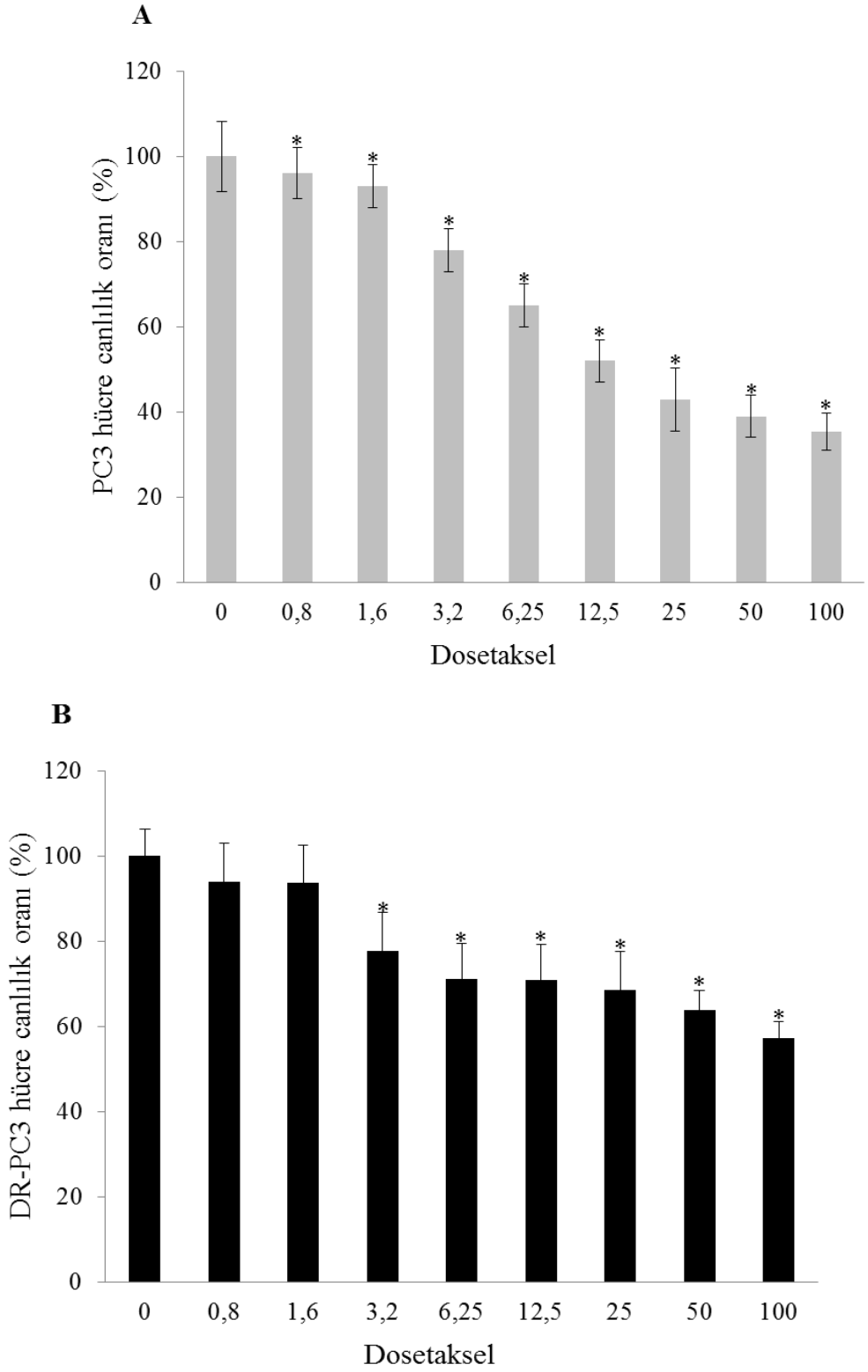
BULGULAR

PC3 HÜCRELERİNDE DOSETAKSEL DİRENCİ GELİŞTİRİLMESİ

PC3 hücrelerinde uygun ve artan derişimlerde ilaç uygulaması yapılarak ilaç direnci geliştirildi. Oluşan hücre hattı DR-PC3 olarak adlandırıldı. Meydana gelen direnci hem hücresel düzeyde hem de gen ifadesi seviyesinde kontrol etmek için analizler yapıldı.

PC3 ve DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA DOSETAKSELİN SAĞKALIM ÜZERİNE ETKİSİ

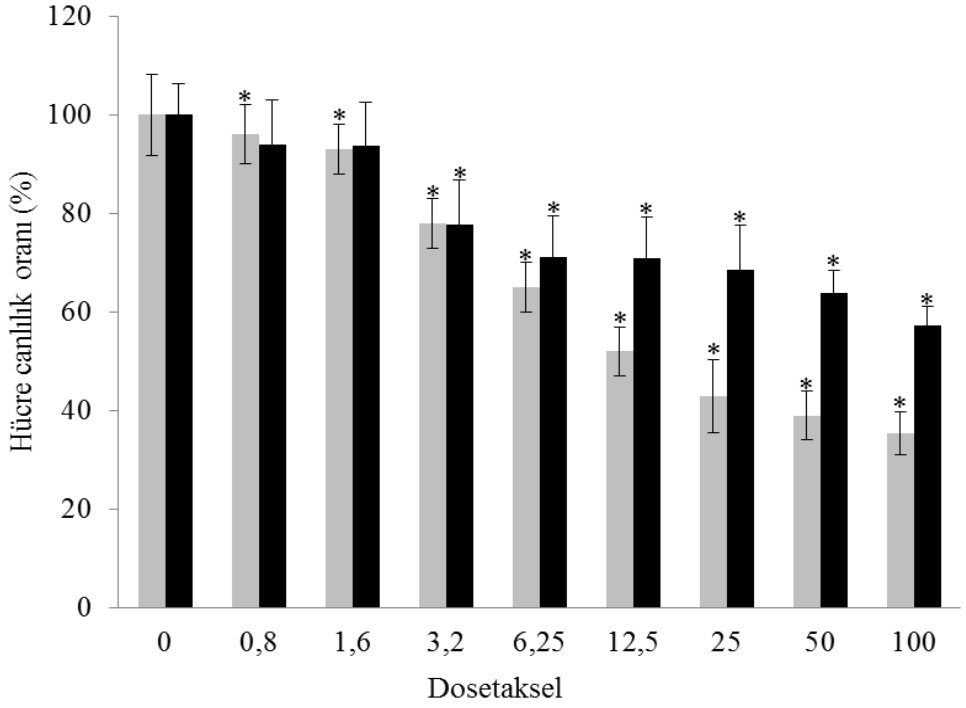
PC3 ve DR-PC3 hücre hatları kullanılarak onkoloji alanında klinikte yaygın bir şekilde kullanılmakta olan Taxotere® kemoterapi ajanının etkin maddesi olan dosetaksel için IC50 (Half Maximal Inhibitory Concentration) değeri belirlendi. Bu amaç doğrultusunda 96 kuyucuklu hücre kültürü kapları kullanılarak 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücre ekim işleminden 24 saat sonra 0-100 nM arasında değişen derişimlerde dosetaksel uygulaması yapıldı. Uygulamadan 72 saat sonra MTT analizi ile her bir derişim için hücre sağkalım oranları ölçülerek tespit edildi (Şekil 11).



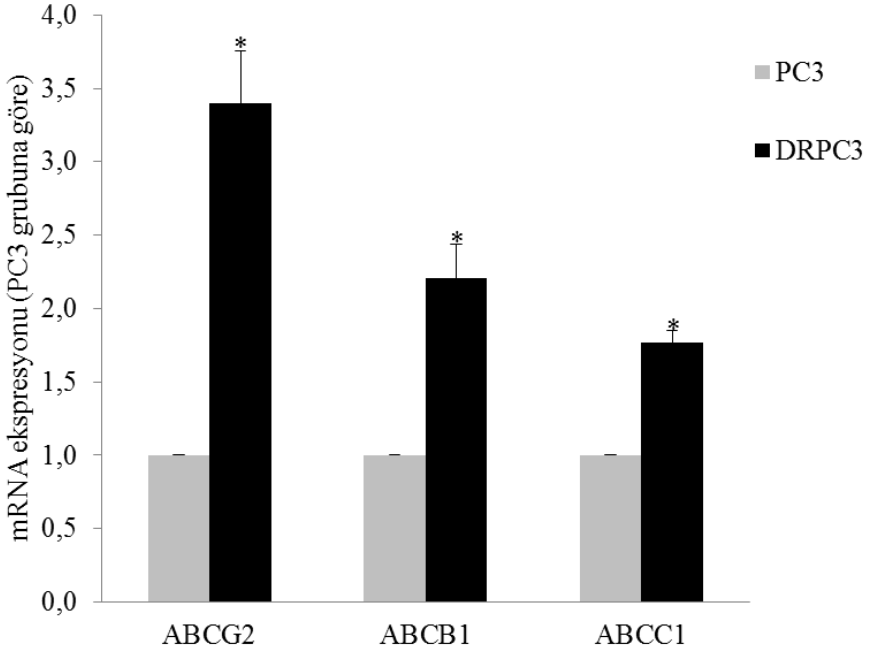
Şekil 11. PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında farklı derişimlerdeki (0-100 nM) dosetaksel uygulamasının hücre sağkalımı üzerine etkisi, *p<0,05 kontrol (0) grubuna göre.

PC3 ve DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA İLAÇ DİRENCİ KONTROLÜ

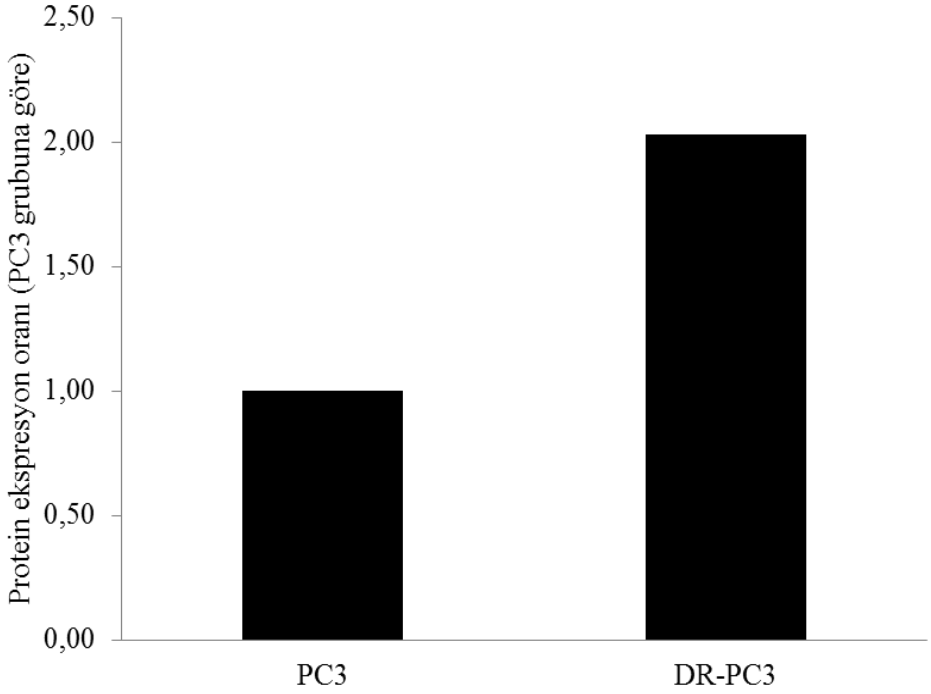
PC3 hücrelerinde ilaç direnci gelişimi tetiklenerek DR-PC3 hücre hattı oluşturuldu. Oluşan ilaç direncini kontrol etmek amacıyla öncelikle MTT testi yapıldı. Bu sayede gelişen ilaç direnci hücresel düzeyde gözlenebildi. Bunun için normal PC3 hücreleri ile DR-PC3 hücreleri karşılaştırmalı olarak çalışıldı (Şekil 12). Uygulanan dozlardan en yükseğinde 72 saat sonunda ekilen PC3 hücrelerinde % 62 oranında azalma gözlenirken DR-PC3 hücrelerinde bu oran % 36 olarak gözlendi. Daha sonra, ilaç direncinin oluşmasında görevli olan moleküler mekanizmalar moleküler genetik yöntemlerle analiz edildi. Bu amaç doğrultusunda da hücre zarında yerleşik durumda olan ABC pompalarından *ABCG2*, *ABCB1* ve *ABCC1* genlerinin mRNA seviyesindeki ifadeleri analiz edildi. Bunun için T25 kültür kapları kullanılarak PC3 ve DR-PC3 hücrelerinden her bir kültür kabı için $6x10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücre ekim işleminden yaklaşık 16 saat sonra 6 nM dosetaksel tedavisi yapılarak deney grupları oluşturuldu. Kontrol grubuna dosetakselin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'in % 0,1 düzeyi eklendi. Oluşturulan gruplardan 72 saat sonunda total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Ardından RT-qPCR analizi gerçekleştirildi. Analizin sonucunda ilgili bölgelerden sentezlenen mRNA miktarlarında DR-PC3 hücre hattında PC3 grubuna göre *ABCG2*, *ABCB1* ve *ABCC1* mRNA ifade seviyelerinde kontrol grubuna göre 3,4; 2,1 ve 1,9 kat artış olduğu tespit edildi (Şekil 13). İlaç direnci oluşumunu protein düzeyinde de araştırmak amacıyla ABCG2 proteinin sentez miktarı analiz edildi. PC3 grubuna göre DR-PC3 grubunda ABCG2 miktarında % 103 oranında artma tespit edildi (Şekil 14).



Şekil 12. PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında farklı derişimlerdeki (0-100 nM) dosetaksel uygulamasının hücre sağkalımı üzerine olan etkisinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi, *p<0,05 kontrol (0) grubuna göre.



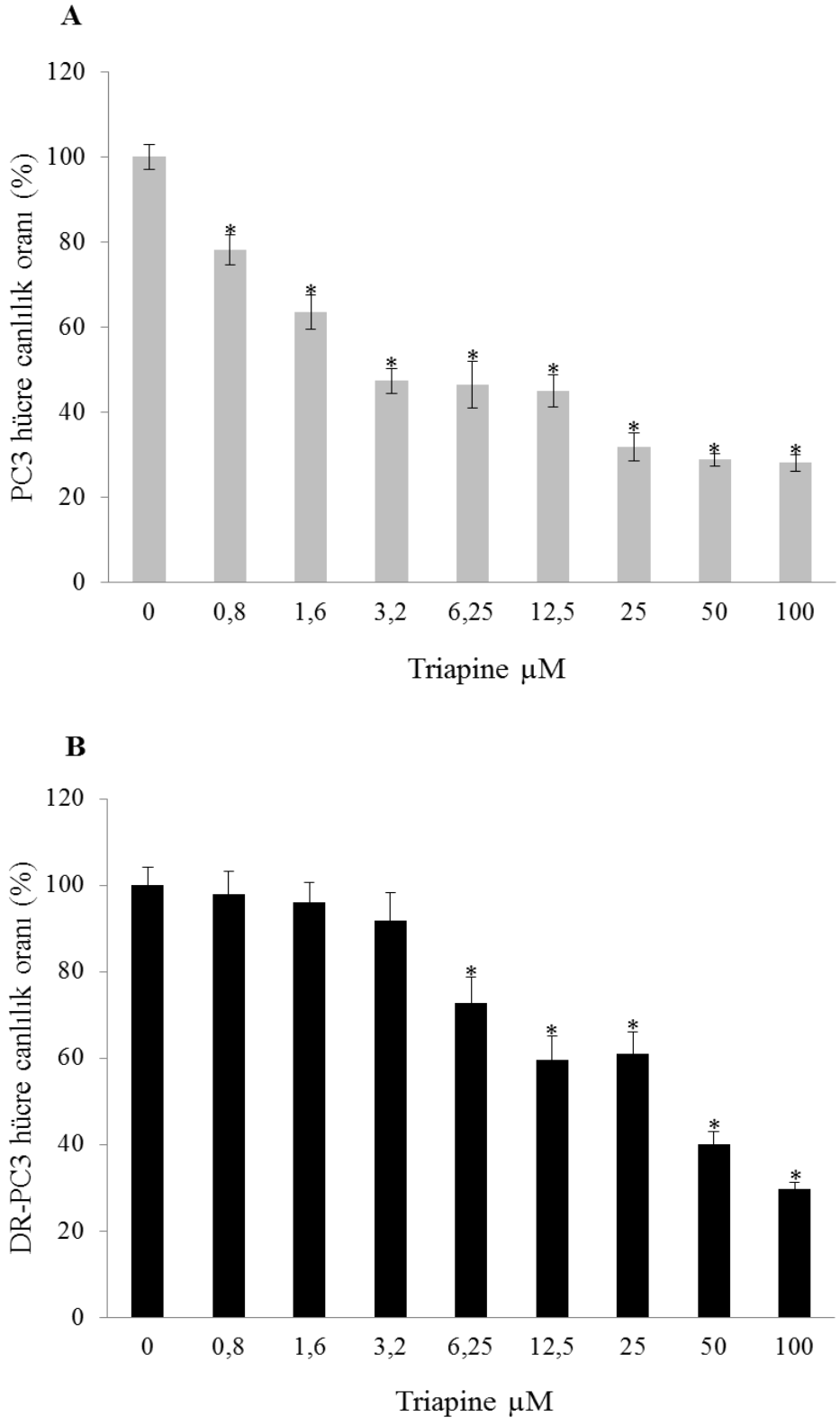
Şekil 13. PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında ilaç direnci genlerinin ifade oranları, *p<0,05 kontrol (PC3) grubuna göre.



Şekil 14. PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında ilaç direnci proteinlerinden ABCG2 seviyesindeki değişim.

PC3 ve DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA 3-AP'NİN SAĞKALIM ÜZERİNE ETKİSİ

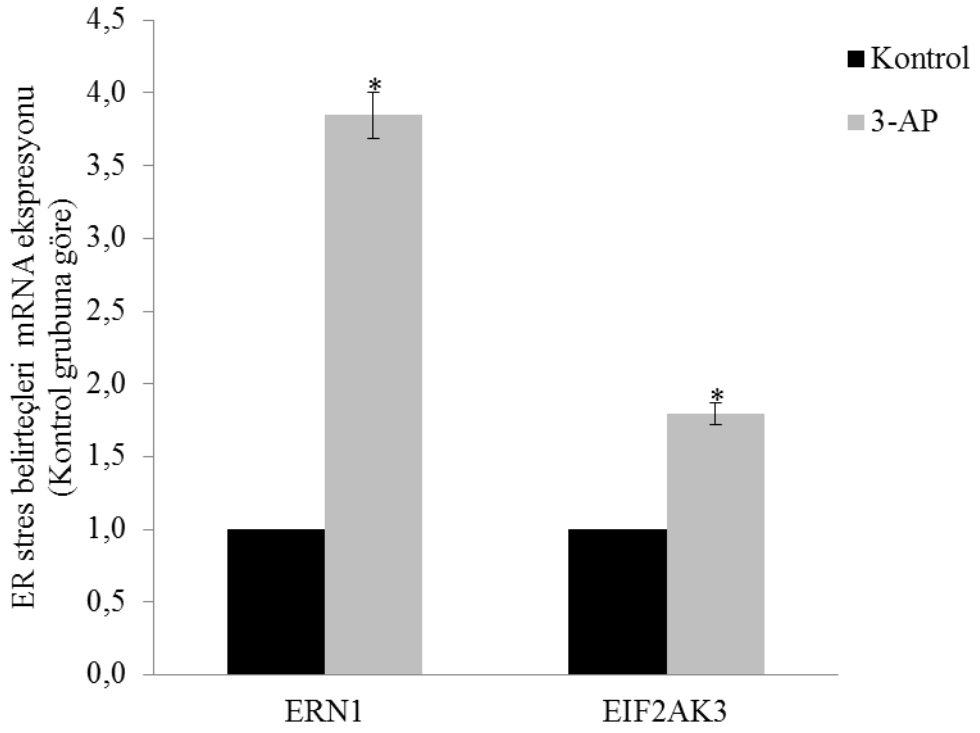
Prostat kanseri hücrelerinde ilaç direnci geliştikten sonra bu direnci zayıflatabilmek amacıyla ER stresinin tetiklenmesi amaçlandı. Bunun için bir ribonükleotid redüktaz inhibitörü olan 3-AP molekülü kullanıldı. PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde 3-AP'nin IC50 değerinin belirlenmesi için MTT testi yapılarak hücre sağkalımı üzerine olan etkisi incelendi. Bunun için PC3 (Şekil 15A) ve DR-PC3 (Şekil 15B) hücreleriyle ayrı ayrı çalışıldı. IC50 değerinin 7,5 µM olarak tespit edilmesi üzerine moleküler analizlerin 7,5 µM derişimde 3-AP uygulanarak gerçekleştirilmesine karar verildi.



Şekil 15. PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında farklı derişimlerdeki (0-100 µM) 72 saat sürede 3-AP uygulamasının hücre sağkalımı üzerine etkisi, *p<0,05 kontrol (0) grubuna göre.

TRİAPİN MOLEKÜLÜNÜN ER STRESİ ÜZERİNE ETKİSİ

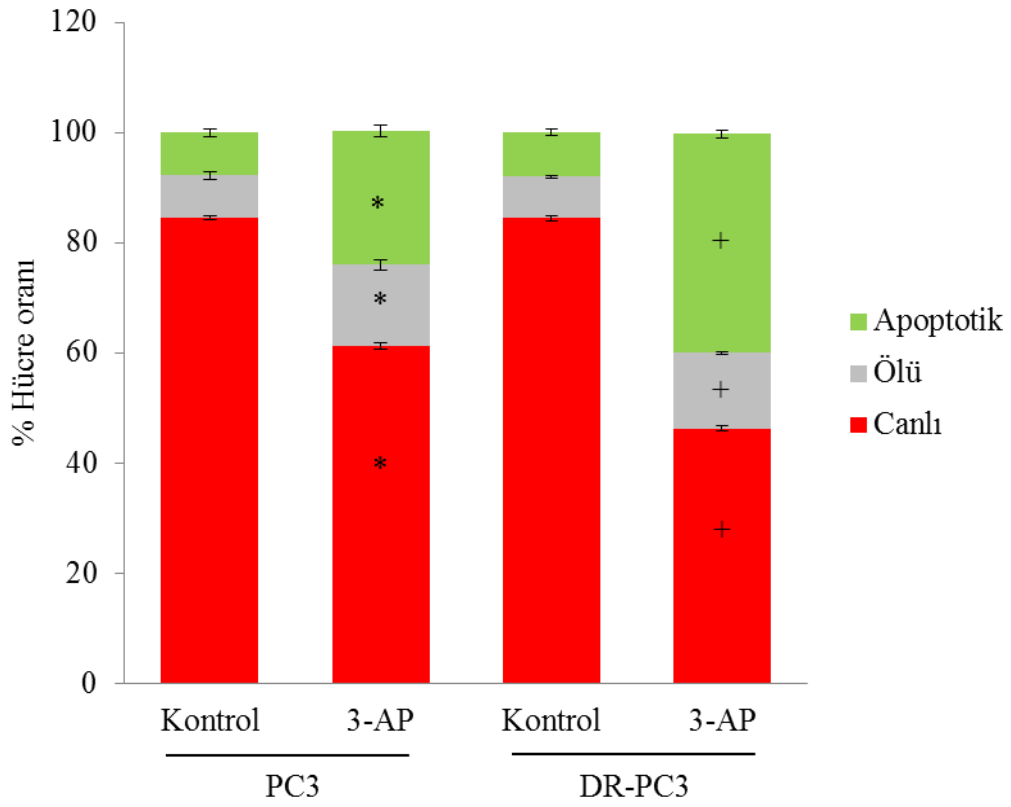
Triapin uygulaması ile oluşan ER stresinin moleküler tabanını gösterebilme amacıyla RT-qPCR analizi gerçekleştirildi. *ERN1* ve *EIF2AK3* genlerinin ifadelerindeki değişim incelendi (Şekil 16). Söz konusu genler ER stresi sırasında UPR yolağında ifadelerinde artış gözlenen genlerdir. *ERN1* geninin ifadesi 3-AP uygulamasıyla birlikte 3,9 katına çıkarken *EIF2AK3* geninin ifadesi 1,9 katına çıkmıştır.



Şekil 16. DR-PC3 hücre hattında 3-AP uygulamasının endoplazmik retikulum stresi ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine etkisi, *p<0,05 kontrol grubuna göre.

PC3 ve DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA 3-AP'NİN APOPTOTİK HÜCRE ORANINA ETKİSİ

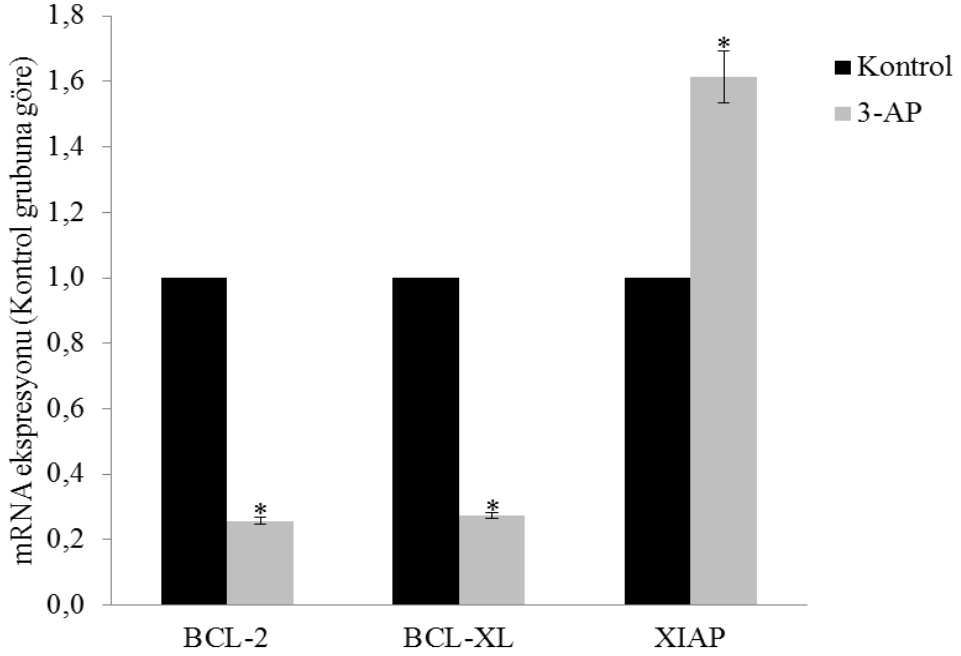
3-AP uygulamasının hücresel düzeyde apoptozu tetikleme oranını incelemek amacıyla TALİ analizi yapıldı. PC3 hücre hattında 3-AP uygulamasının kontrol grubuna göre apoptotik hücre miktarını 2 kat artırdığı, ölü hücre miktarını 1 kat artırdığı tespit edildi. DR-PC3 hücre hattında ise 3-AP uygulamasının kontrol grubuna göre apoptotik hücre miktarını 4 kat artırdığı, ölü hücre miktarını 0,75 kat artırdığı tespit edildi. (Şekil 17).



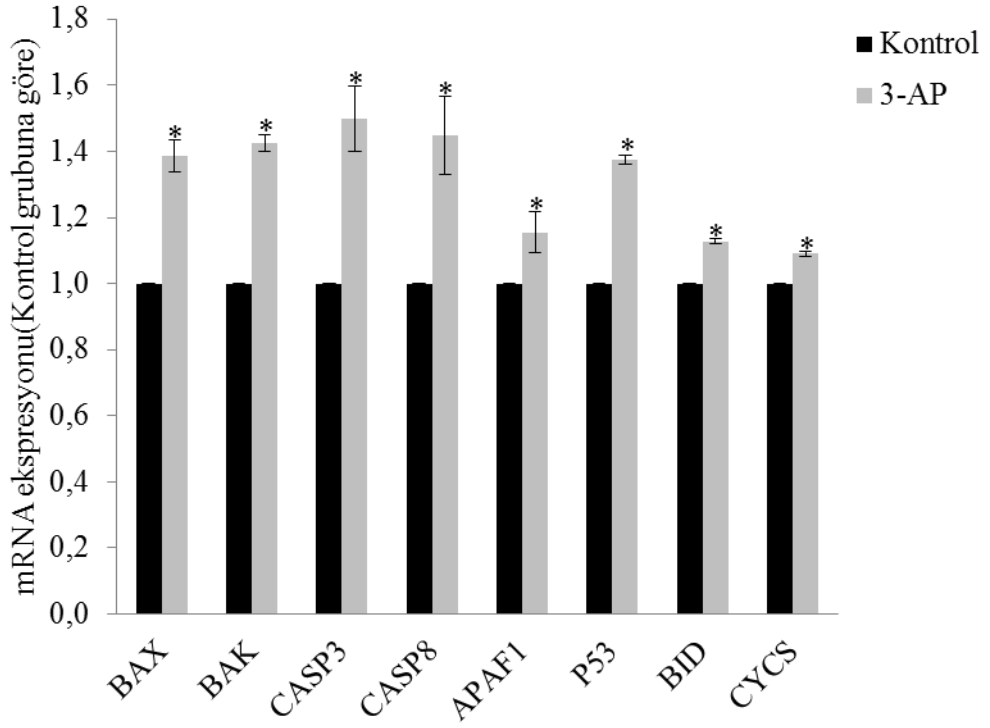
Şekil 17. PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP uygulamasının apoptotik hücre oranı üzerine etkisi, *p<0,05 PC3 grubuna göre, +p<0,05 DR-PC3 grubuna göre.

DR-PC3 HÜCRE HATTINDA 3-AP'NİN APOPTOZLA İLGİLİ GENLERİN İFADESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Kemoterapi sürecinde ilaç direnci kazanmış prostat kanseri hücrelerinde apoptoz oluşumunun moleküler tabanını incelemek için mRNA düzeyinde gen ifadesi analizi yapıldı. Analiz sırasında *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *APAF1*, *BAK*, *BCL-XL*, *XIAP*, *P53*, *BID*, *CYCS* (sitokrom c), *HSP90*, *HSP70* ve *HSP27* genlerinin ifadelerindeki 3-AP uygulaması ile meydana gelen değişimler ölçüldü. Antiapoptotik özellikteki genlerden olan *BCL-2* gen ifadesinde % 78 oranında azalma, *BCL-XL* gen ifadesinde % 76 oranında azalma ve *XIAP* gen ifadesinde % 61 oranında artma gözlendi (Şekil 18). Apoptozu indükleme yeteneği bulunan genlerden olan *BAX* gen ifadesinde % 38 oranında artma, *CASP3* gen ifadesinde % 50 oranında artma, *CASP8* gen ifadesinde % 43 oranında artma, *APAF1* gen ifadesinde % 15 oranında artma, *BAK* gen ifadesinde % 40 oranında artma, *P53* gen ifadesinde % 39 oranında artma, *BID* gen ifadesinde % 15 oranında artma ve sitokrom c gen ifadesinde % 12 oranında artma gözlendi (Şekil 19).



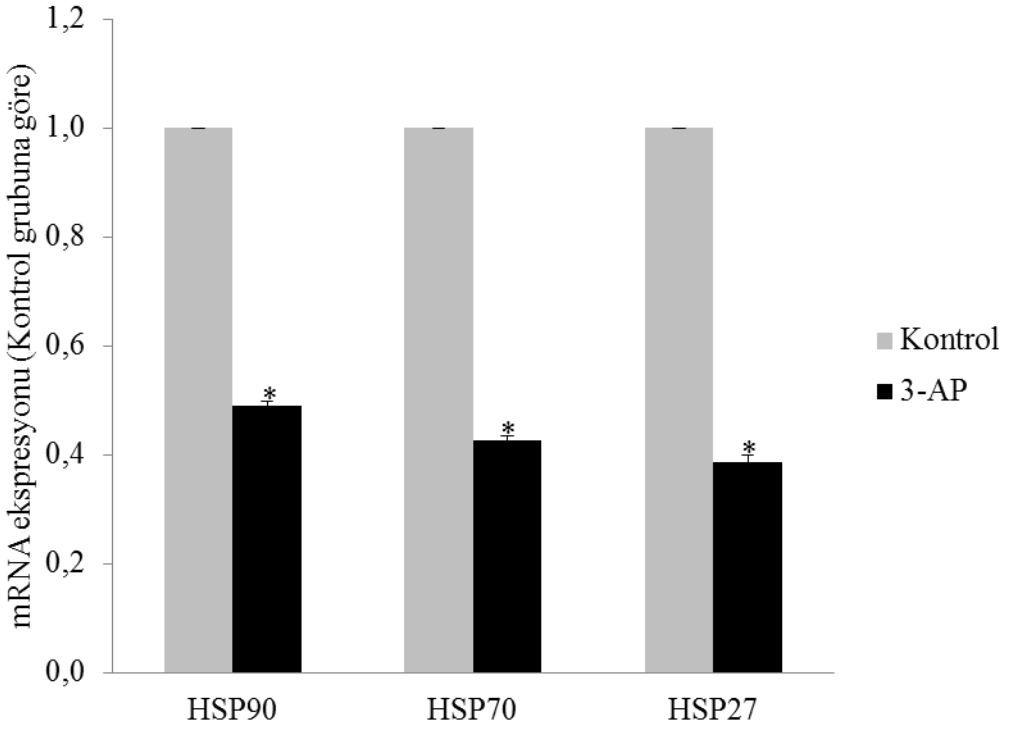
Şekil 18. DR-PC3 hücre hatında 3-AP uygulamasının antiapoptotik genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre.



Şekil 19. DR-PC3 hücre hatında 3-AP uygulamasının apoptozla ilişkili genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre.

DR-PC3 HÜCRE HATTINDA 3-AP'NİN ISI ŞOKU PROTEİNLERİ GEN İFADESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

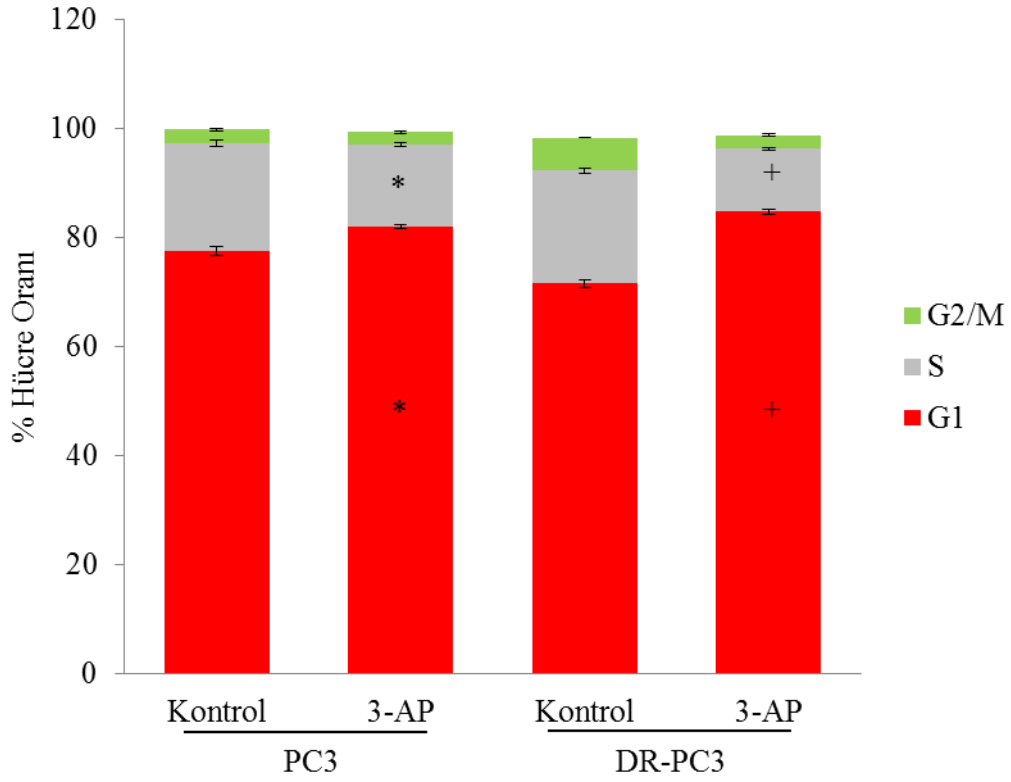
Isı şoku proteinlerinden olan *HSP90* gen ifadesinde % 55 oranında azalma, *HSP70* gen ifadesinde % 57 oranında azalma ve *HSP27* gen ifadesinde % 61 oranında azalma gözlendi (Şekil 20).



Şekil 20. DR-PC3 hücre hatında 3-AP uygulamasının ısı şoku proteinlerini (heat shock protein, HSP) sentezleyen genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre.

PC3 ve DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA 3-AP'NİN HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

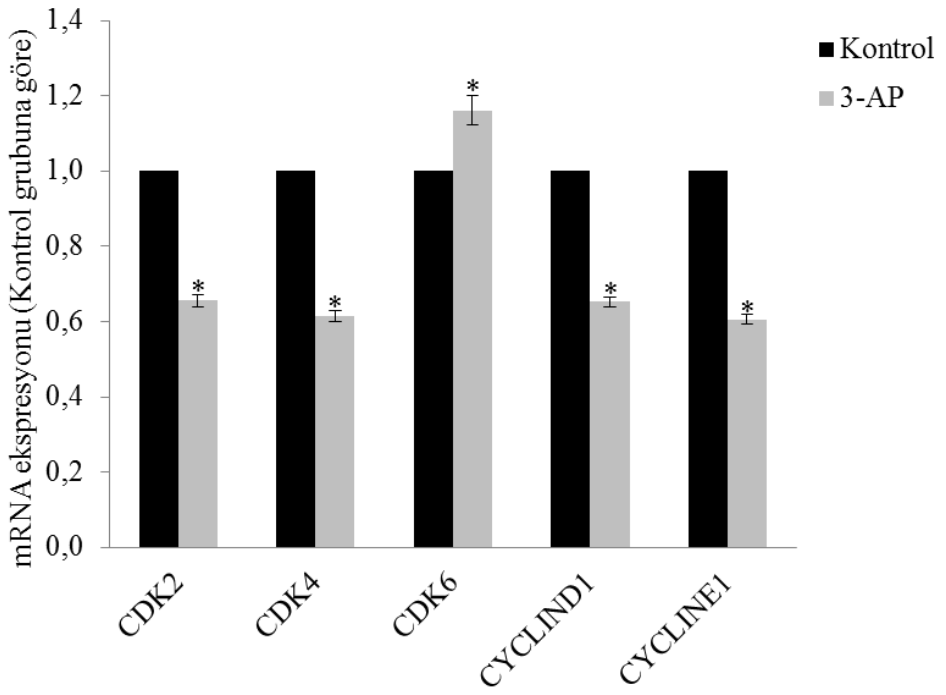
3-AP uygulamasının hücre döngüsü üzerine olan etkisini incelemek amacıyla G1, S ve G2/M evrelerinde hücre döngüsü durdurulan hücre sayısı belirlendi. PC3 hücre hattında 3-AP uygulaması G1 evresinde hücre döngüsü durdurulan hücre sayısını % 5 oranında artırırken aynı değer DR-PC3 hücre hattında % 18 olarak saptandı (Şekil 21).



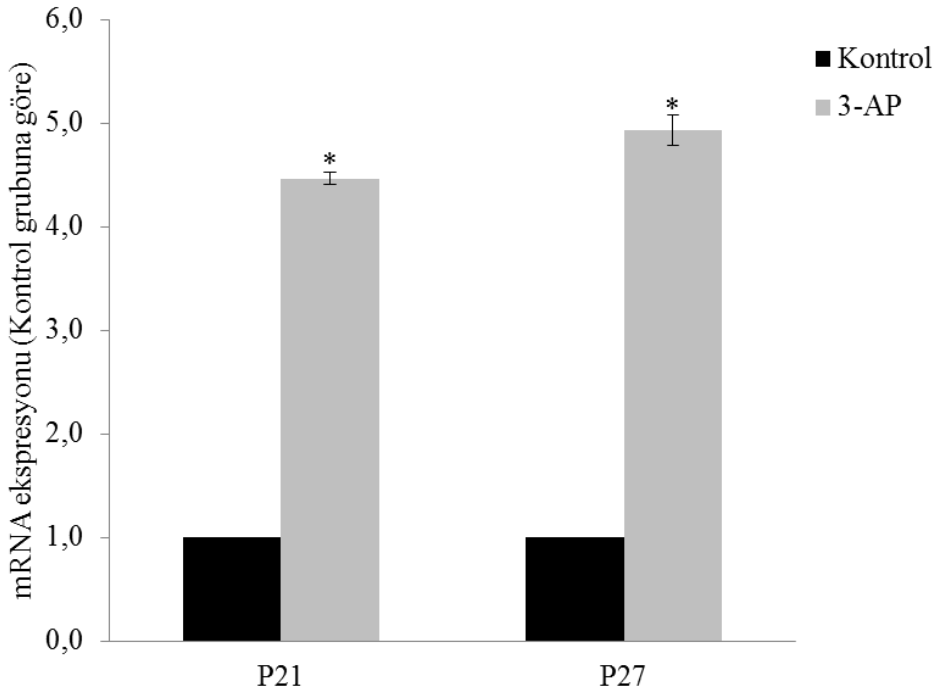
Şekil 21. PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisi, *p<0,05 PC3 grubuna göre, +p<0,05 DR-PC3 grubuna göre.

DR-PC3 HÜCRE HATTINDA 3-AP'NİN HÜCRE DÖNGÜSÜ İLE İLGİLİ GENLERİN İFADESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Triapin uygulaması ile hücre döngüsü ile ilgili olan *CDK2*, *CDK4*, *CDK6*, *CYCLIND1*, *CYCLINE1*, *P21* ve *P27* genlerinin ifadesindeki değişim analiz edildi. *CDK2* gen ifadesinde % 36 azalma, *CDK4* gen ifadesinde % 40 azalma, *CDK6* gen ifadesinde % 15 artma, *CYCLIND1* gen ifadesinde % 37 azalma, *CYCLINE1* gen ifadesinde % 39 azalma gözlendi (Şekil 22). Hücre döngüsnün durdurulmasından sorumlu genlerden olan *P21* gen ifadesinin 4,4 katına çıktığı saptanırken *P27* gen ifadesi için bu değer 4,9 olarak belirlendi (Şekil 23).



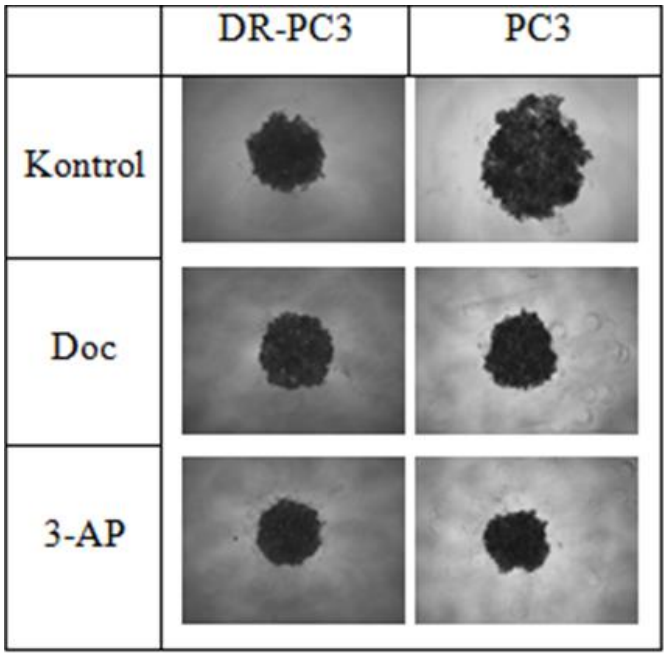
Şekil 22. DR-PC3 hücre hattında 3-AP uygulamasının hücre döngüsü ile ilgili olan genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre.



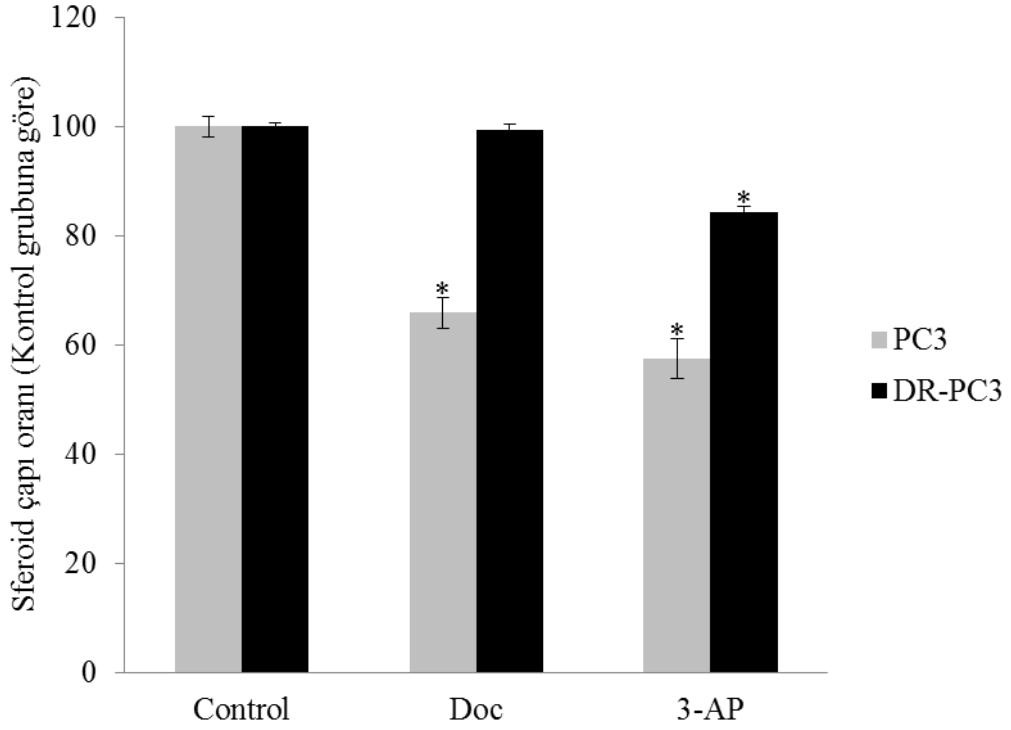
Şekil 23. DR-PC3 hücre hattında 3-AP uygulamasının hücre döngüsünün durdurulmasında görevli olan genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre.

PC3 VE DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA 3-AP İLE DOSETAKSELİN SFEROİD ÇAPINA ETKİSİ

Tümör doku ortamını modelleyerek gelişen ilaç direncini ve 3-AP'nin sferoid çapına etkisini incelemek amacıyla üç boyutlu hücre kültürü ortamı oluşturuldu. Dosetaksel ve 3-AP uygulaması yapıldıktan 10 gün sonra sferoid çapı mikroskobik olarak ölçüldü. Belirtilen sürenin sonunda PC3 hücre hattında dosetaksel uygulamasının sferoid çapını % 34 oranında küçülttüğü, 3-AP uygulamasının % 42 oranında küçülttüğü tespit edildi. DR-PC3 hücre hattında ise dosetaksel uygulamasının sferoid çapını sadece % 1 küçülttüğü, 3-AP uygulamasının sferoid çapını % 16 küçülttüğü tespit edildi (Şekil 24 ve 25).



Şekil 24. Üç boyutlu hücre kültüründe PC3/DR-PC3 hücre hatlarında dosetaksel direncinin gösterilmesi ve 3-AP uygulamasının sferoid büyüklüğüne etkisi.

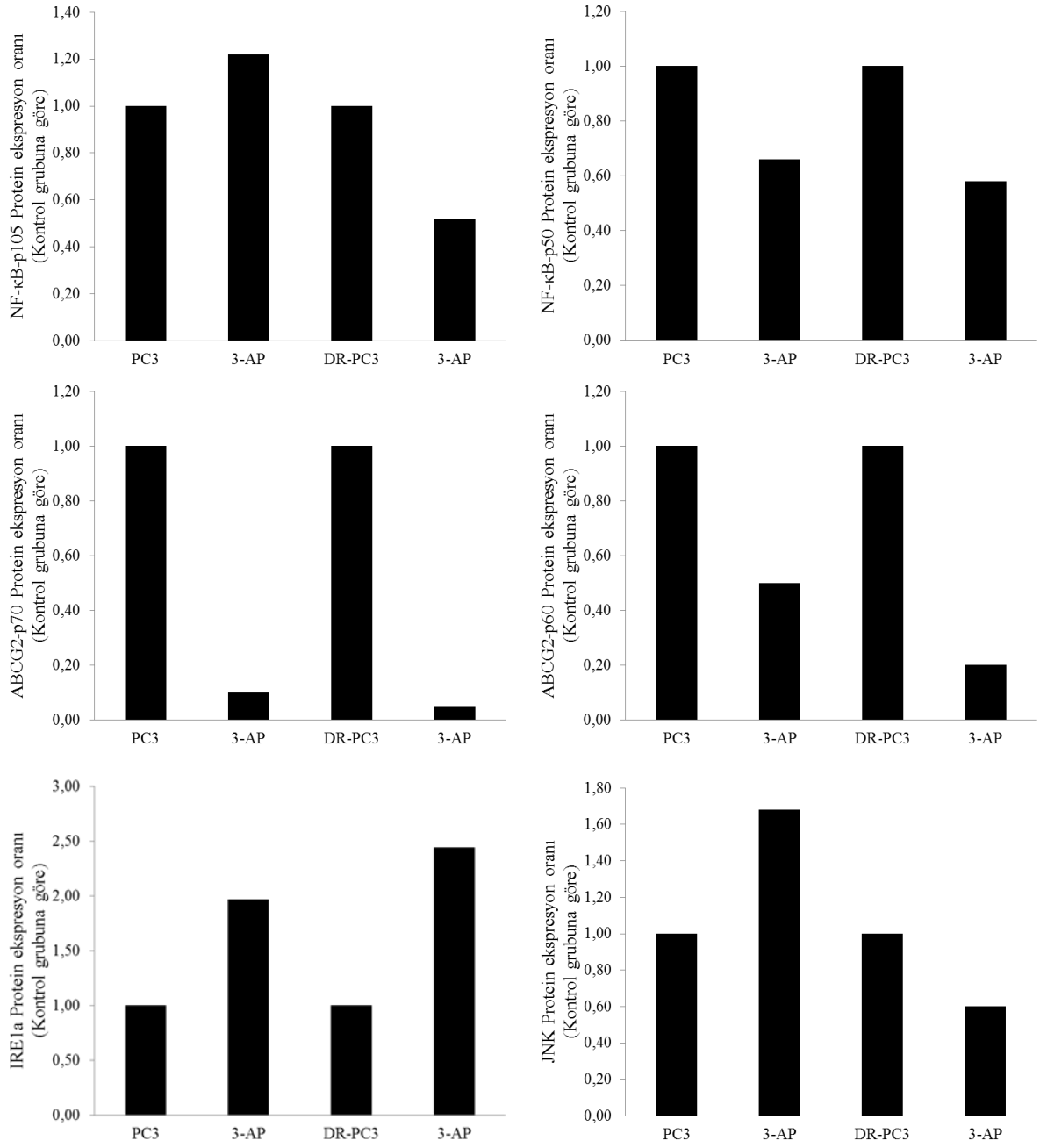


Şekil 25. Üç boyutlu hücre kültüründe PC3/DR-PC3 hücre hatlarında dosetaksel (Doc) direncinin gösterilmesi ve 3-AP uygulamasının sferoid çapı üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre.

PC3 VE DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA 3-AP'NİN PROTEİN DÜZEYİ ÜZERİNE ETKİSİ

PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP uygulamasının gen ifadesi üzerine olan etkisi protein düzeyinde de araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda JNK, NF-κB, IRE1a, ABCG2-p60, ABCG2-p70 ve β-aktin proteinlerinin seviyeleri analiz edildi. β-aktin proteini tüm hücrelerdeki protein miktarını eşitleyerek analiz yapmak amacıyla kullanıldı. PC3 örneklerinde 3-AP uygulaması ile birlikte JNK seviyesinde % 68 oranında artma, NF-κB-p105 seviyesinde % 22 oranında artma, NF-κB-p50 seviyesinde % 34 oranında azalma, IRE1a seviyesinde % 97 oranında artma, ABCG2-p60 seviyesinde % 50 oranında azalma, ABCG2-p70 seviyesinde % 90 oranında azalma tespit edildi. DR-PC3 örneklerinde 3-AP uygulaması sonrasında JNK seviyesinde % 40 oranında azalma, NF-κB-p105 seviyesinde % 48 oranında azalma, NF-κB-p50 seviyesinde % 42 oranında azalma, IRE1a seviyesinde % 144 oranında artma, ABCG2-p60 seviyesinde % 80 oranında azalma, ABCG2-p70

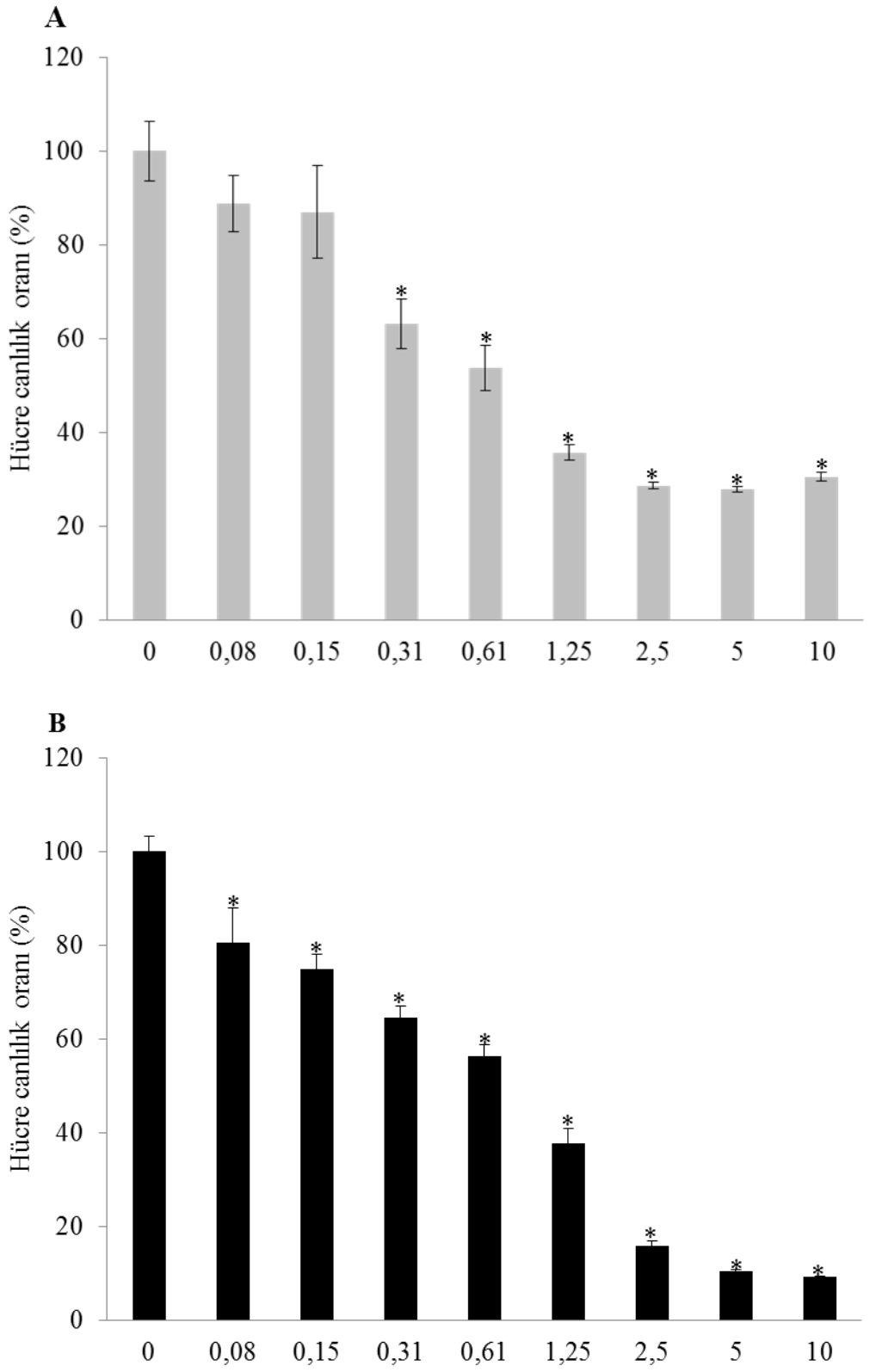
seviyesinde % 95 oranında azalma tespit edildi (Şekil 26). Protein düzeyi analiz işlemlerinde western blotting yönteminde elde edilen protein bantları analiz edildi (Şekil 38).



Şekil 26. PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP uygulamasının protein düzeyi üzerine etkisi. NF-κB-p105, NF-κB-p50, ABCG2-p70, ABCG2-p60, IRE1a ve JNK.

PC3 ve DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA MİTOKSANTRONUN SAĞKALIM ÜZERİNE ETKİSİ

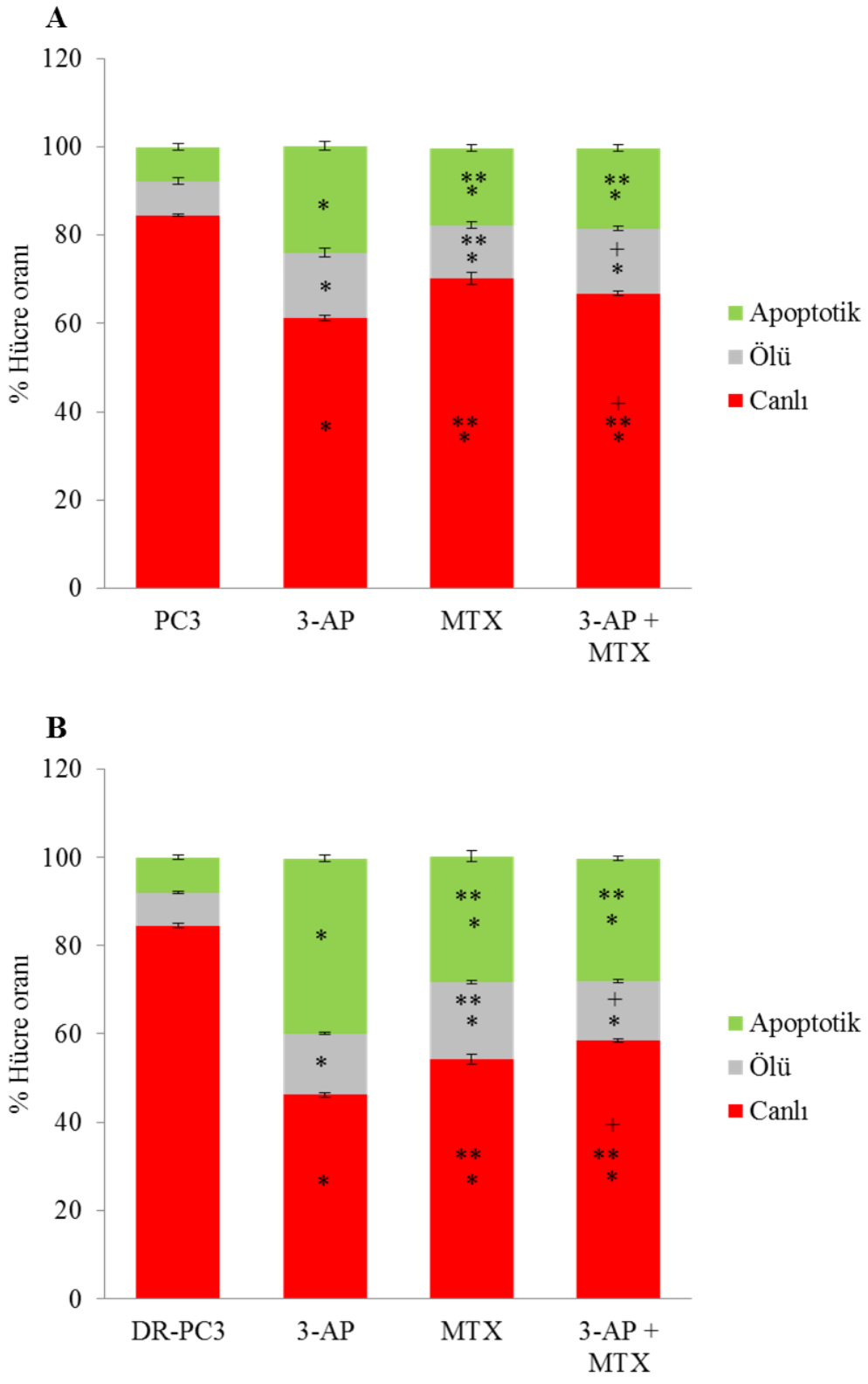
PC3 ve DR-PC3 hücre hatları kullanılarak onkoloji alanında klinikte yaygın bir şekilde kullanılmakta olan Novantrone® kemoterapi ajanının etkin maddesi olan mitoksantron (MTX) için IC50 (Half Maximal Inhibitory Concentration) değeri belirlendi. Bu amaç doğrultusunda 96 kuyucuklu hücre kültürü kapları kullanılarak 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücre ekim işleminden 24 saat sonra 0-10 μM arasında değişen derişimlerde MTX uygulaması yapıldı. Uygulamadan 72 saat sonra MTT analizi ile her bir derişim için hücre sağkalım oranları ölçülerek tespit edildi (Şekil 27).



Şekil 27. PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında farklı derişimlerdeki (0-10 µM) MTX uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi, *p<0,05 kontrol (0) grubuna göre.

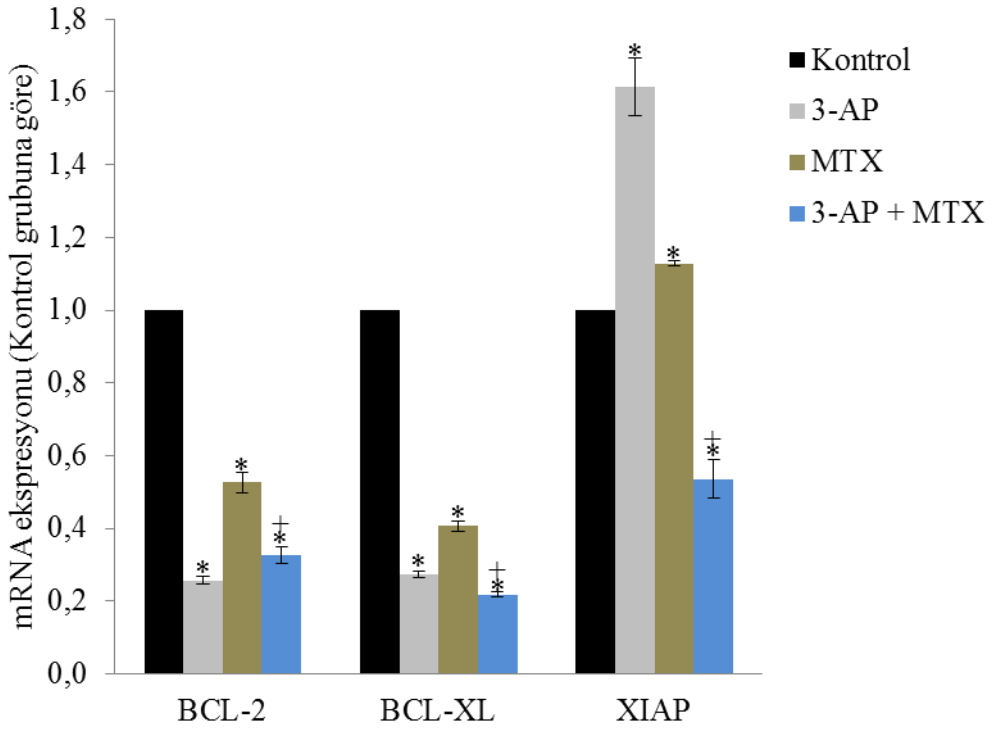
PC3 ve DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA 3-AP VE MTX'UN APOPTOTİK HÜCRE ORANINA ETKİSİ

Triapin kullanılarak elde edilen sonuçlar, MTX ile kombine tedavi oluşturularak da test edildi. Gerçekleştirilen uygulamalarda 7,5 µM 3-AP ve 1,5 µM MTX kullanıldı. 3-AP ve MTX uygulamasının hücresel düzeyde apoptozu tetikleme oranını incelemek amacıyla TALİ analizi yapıldı. PC3 hücre hattında MTX uygulamasının kontrol grubuna göre apoptotik hücre miktarını 1,25 kat artırdığı, ölü hücre miktarını 0,5 kat artırdığı tespit edildi. PC3 hücre hattında 3-AP/MTX kombinasyonunun kontrol grubuna göre apoptotik hücre miktarını 1,25 kat artırdığı, ölü hücre miktarını 0,875 kat artırdığı tespit edildi. DR-PC3 hücre hattında MTX uygulamasının kontrol grubuna göre apoptotik hücre miktarını 2,625 kat artırdığı, ölü hücre miktarını 1,25 kat artırdığı tespit edildi. DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX kombinasyonunun kontrol grubuna göre apoptotik hücre miktarını 2,5 kat artırdığı, ölü hücre miktarını 0,75 kat artırdığı tespit edildi (Şekil 28).



Şekil 28. PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında 3-AP/MTX uygulamasının apoptotik hücre oranı üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre, **p<0,05 3-AP grubuna göre, +p<0,05 MTX grubuna göre.

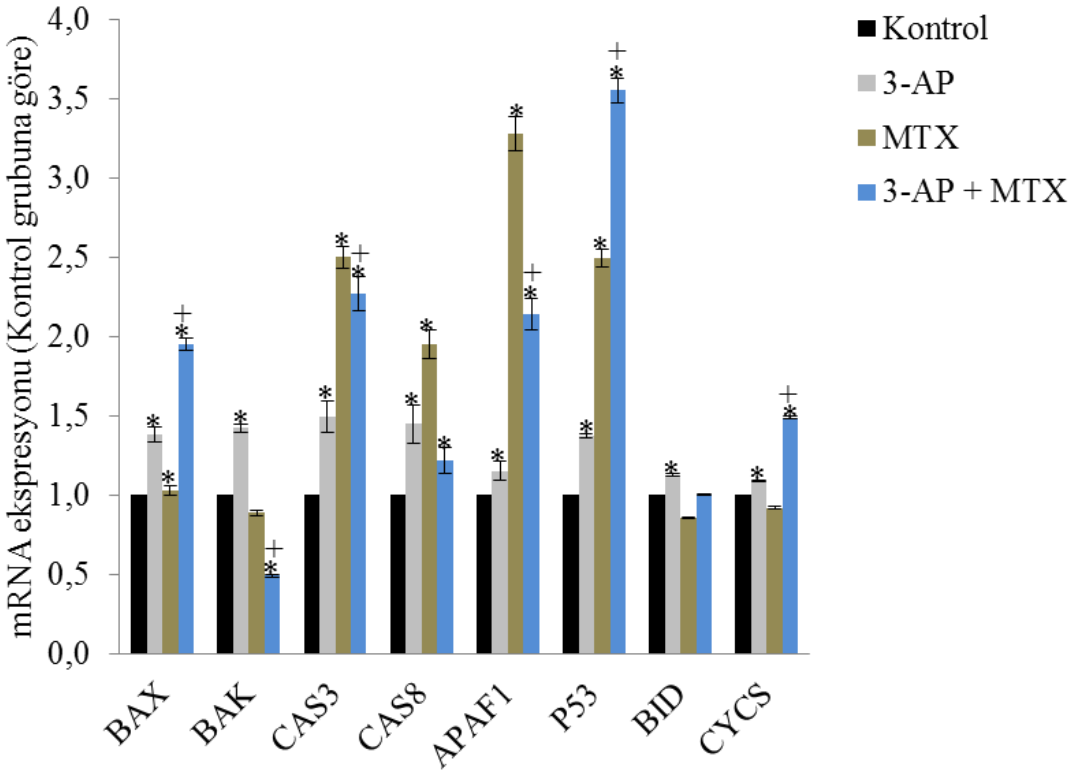
DR-PC3 HÜCRE HATTINDA 3-AP VE MTX'UN APOPTOZLA İLGİLİ GENLERİN İFADESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ



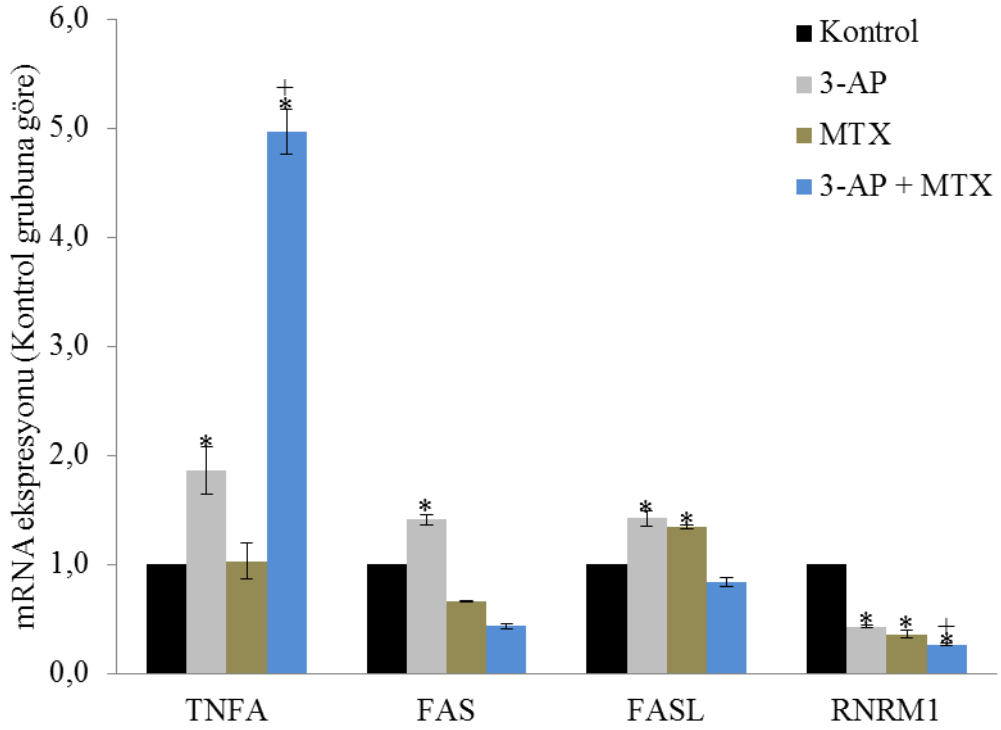
Şekil 29. DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının antiapoptotik genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre, +p<0,05 MTX grubuna göre.

DR-PC3 hücrelerinde 3-AP ve MTX kombinasyonu uygulaması ile birlikte gözlenen apoptoz oluşumunun moleküler tabanını incelemek için mRNA düzeyinde gen ifadesi analizi yapıldı. Analiz sırasında *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *APAF1*, *BAK*, *BCL-XL*, *XIAP*, *P53*, *BID*, *sitokrom c*, *HSP90*, *HSP70* ve *HSP27* genlerinin ifadesindeki değişimler araştırıldı. *BCL-2* gen ifadesinde MTX'un % 48 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kominasyonunun % 68 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *BCL-XL* gen ifadesinde MTX'un % 60 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 79 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *XIAP* gen ifadesinde MTX'un % 12 oranında artmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 47 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi (Şekil 29). *BAX* gen ifadesinde MTX'un % 3 oranında artmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 95 oranında artmaya yol açtığı tespit edildi. *CASP3* gen ifadesinde MTX'un 1,5 kat artışa, 3-AP/MTX kombinasyonunun 1,27 kat

artmaya yol açtığı tespit edildi. *CASP8* gen ifadesinde MTX'un % 95 oranında artmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 22 oranında artmaya yol açtığı tespit edildi. *APAF1* gen ifadesinde MTX'un 2,27 kat artışa, 3-AP/MTX kombinasyonunun 1,14 kat artmaya yol açtığı tespit edildi. *BAK* ifadesinde MTX'un % 12 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 51 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *P53* gen ifadesinde MTX'un 1,49 kat artmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun 2,55 kat artmaya yol açtığı tespit edildi. *BID* gen ifadesinde MTX'un % 15 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun ise hiç bir değişime yol açmadığı tespit edildi. Sitokrom c gen ifadesinde MTX'un % 8 oranında azalmaya yol açtığı, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 49 oranında artmaya yol açtığı tespit edildi (Şekil 30).



Şekil 30. DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının apoptozla ilişkili genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre, +p<0,05 MTX grubuna göre.

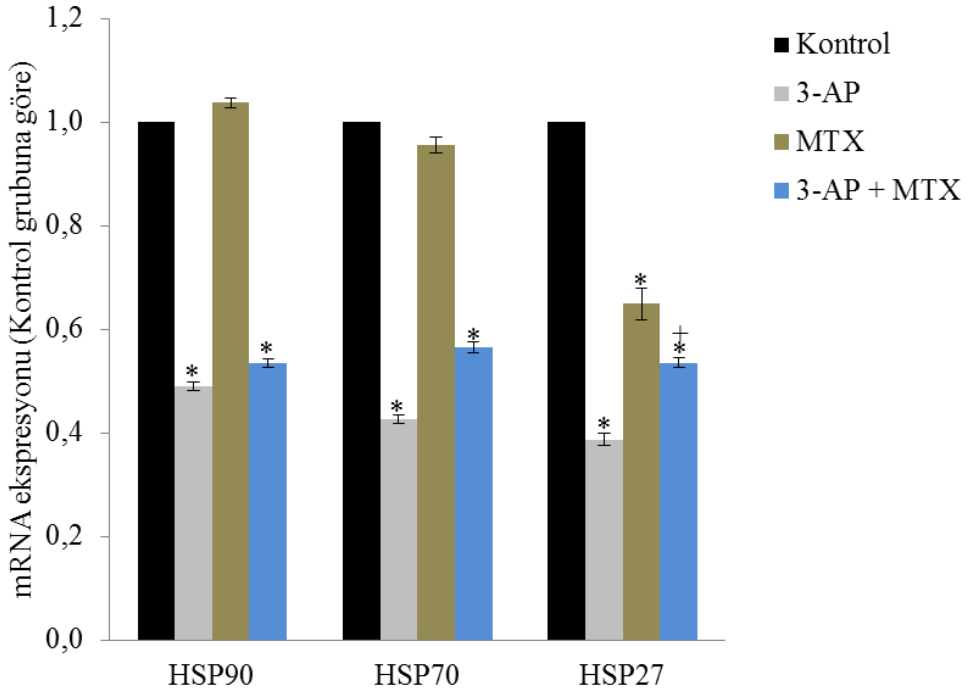


Şekil 31. DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının apoptozla ilişkili *TNFA*, *FAS* ve *FASL* genleri ile *RNRM1* geninin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre, +p<0,05 MTX grubuna göre.

DR-PC3 hücrelerinde 3-AP ve MTX kombinasyonu uygulaması ile birlikte gözlenen apoptoz oluşumunun moleküler tabanını incelerken *TNFA, FAS, FASL* ve *RNRM1* genleri için mRNA düzeyinde gen ifadesi analizi yapıldı. *TNFA* gen ifadesinde 3-AP'nin % 86 oranında artmaya, MTX'un % 3 oranında artmaya, 3-AP/MTX kominasyonunun 3,37 kat artmaya yol açtığı tespit edildi. *FAS* gen ifadesinde 3-AP'nin % 41 oranında artmaya, MTX'un % 34 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 57 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *FASL* gen ifadesinde 3-AP'nin % 42 oranında artmaya, MTX'un % 34 oranında artmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 16 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *RNRM1* gen ifadesinde 3-AP'nin % 57 oranında azalmaya, MTX'un % 64 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 73 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. (Şekil 31).

DR-PC3 HÜCRE HATTINDA 3-AP VE MTX'UN ISI ŞOKU PROTEİNLERİNİN GEN İFADESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

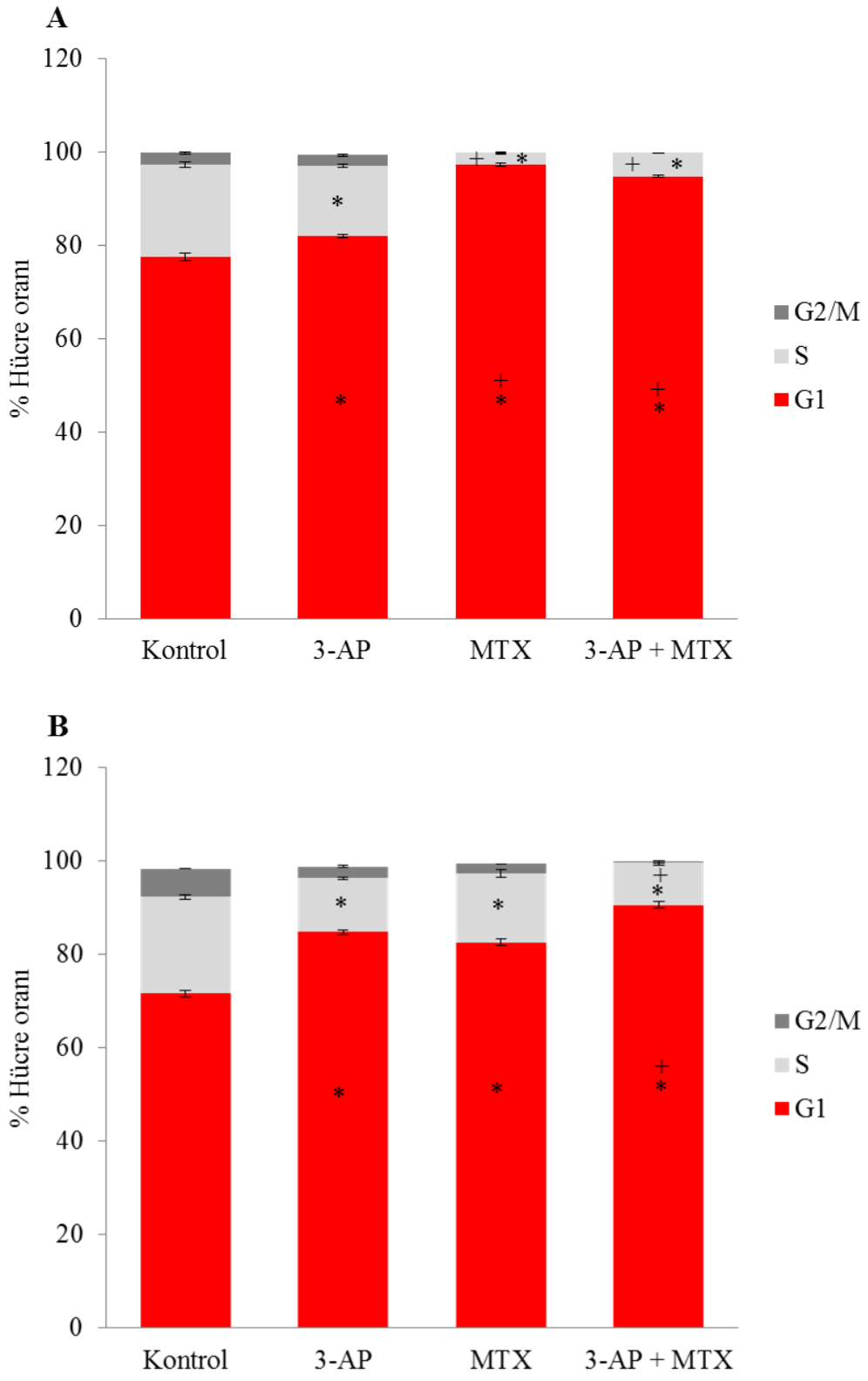
Gerçekleştirilen gen ifadesi analizleri sonucunda *HSP90* gen ifadesinde MTX'un % 3 oranında artmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 47 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *HSP70* gen ifadesinde MTX'un % 5 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 44 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *HSP27* gen ifadesinde MTX'un % 35 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 47 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi (Şekil 32).



Şekil 32. DR-PC3 hücre hatında 3-AP/MTX uygulamasının HSP sentezleyen genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre, +p<0,05 kontrol grubuna göre.

DR-PC3 HÜCRE HATTINDA 3-AP VE MTX'UN HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

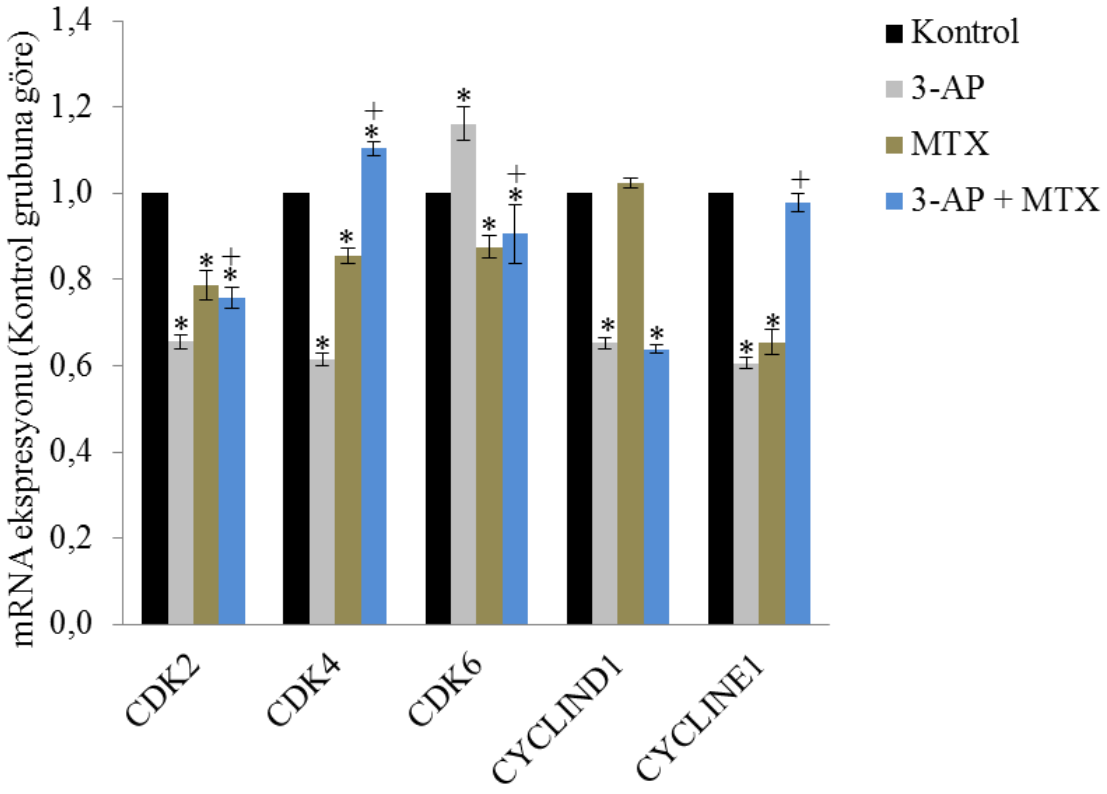
Hücre döngüsü üzerinde 3-AP/MTX kombinasyonunun sahip olduğu etkiyi incelemek amacıyla G1, S ve G2/M evrelerinde hücre döngüsü durdurulan hücre sayısı analiz edildi.



Şekil 33. PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında 3-AP/MTX uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre, +p<0,05 3-AP grubuna göre.

PC3 hücre hattında MTX'un G1 evresinde hücre döngüsü durdurulan hücre sayısını % 24 oranında artırırken 3-AP/MTX kombinasyonunun % 21 oranında artırdığı tespit edildi (Şekil 33A). DR-PC3 hücre hattında MTX'un G1 evresinde hücre döngüsü durdurulan hücre sayısını % 15 oranında artırırken 3-AP/MTX kombinasyonunun % 26 oranında artırdığı tespit edildi (Şekil 33B).

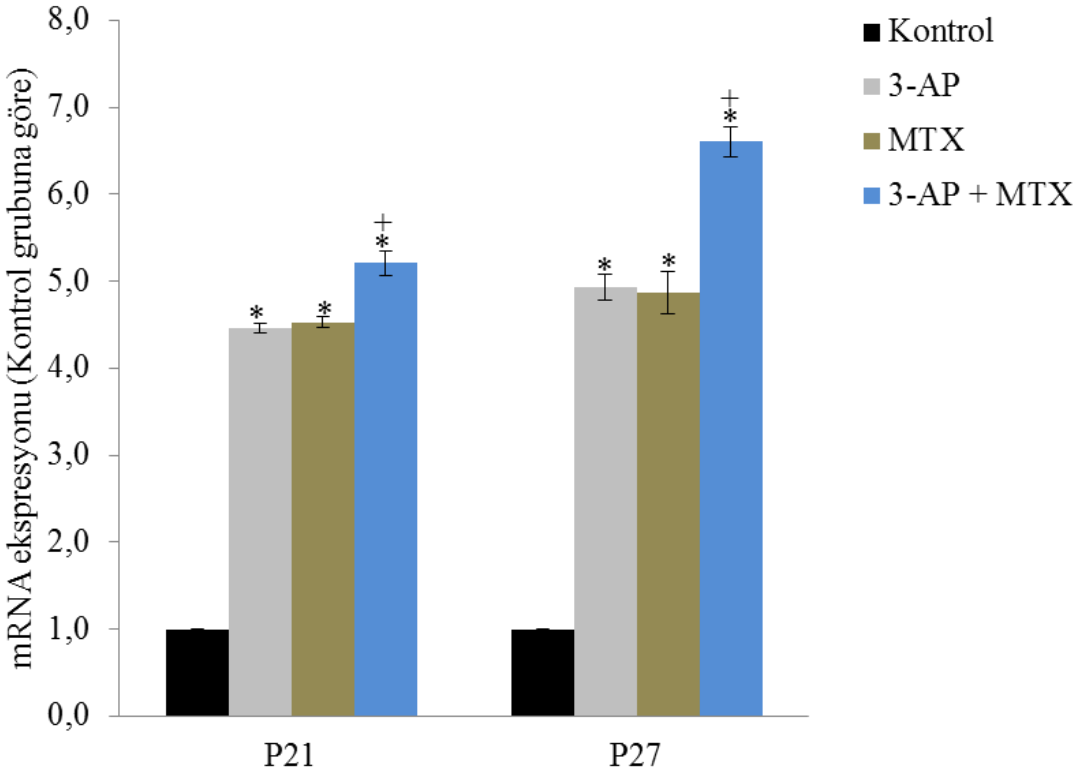
DR-PC3 HÜCRE HATTINDA 3-AP'NİN HÜCRE DÖNGÜSÜ İLE İLGİLİ GENLERİN İFADESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ



Şekil 34. DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının hücre döngüsünün yürütülmesinde görevli olan genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre, +p<0,05 3-AP grubuna göre.

Hücre döngüsü ile ilgili olan *CDK2*, *CDK4*, *CDK6*, *CYCLIND1*, *CYCLINE1*, *P21* ve *P27* genlerinin ifadelerindeki değişim analiz edildi. *CDK2* gen ifadesinde MTX'un % 22 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 25 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *CDK4* gen ifadesinde MTX'un % 15 oranında azalmaya, 3-AP/MTX

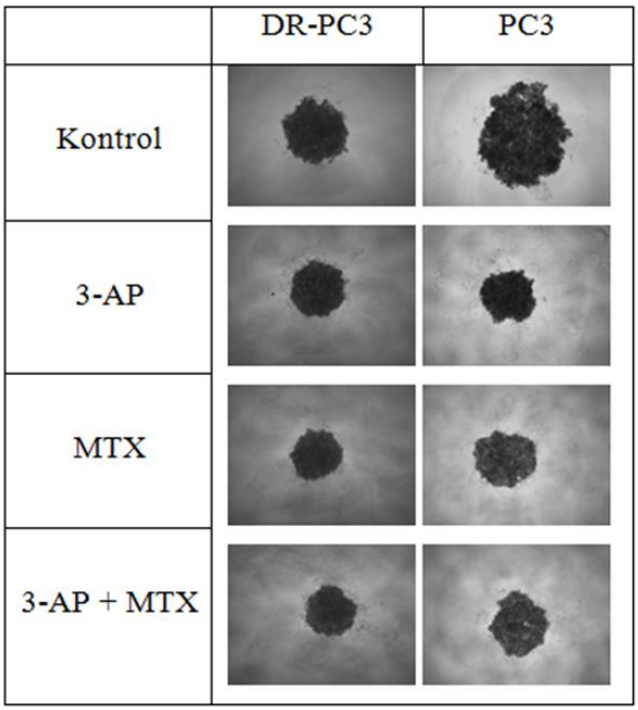
kombinasyonunun % 10 oranında artmaya yol açtığı tespit edildi. *CDK6* gen ifadesinde MTX'un % 13 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 10 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *CYCLIND1* gen ifadesinde MTX'un % 2 oranında artmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 37 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi. *CYCLINE1* gen ifadesinde MTX'un % 35 oranında azalmaya, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 3 oranında azalmaya yol açtığı tespit edildi (Şekil 34). Hücre döngüsnün durdurulmasından sorumlu genlerden olan *P21* gen ifadesinde MTX'un 3,5 kat artışa, 3-AP/MTX kombinasyonunun 4,2 kat artışa yol açarken *P27* gen ifadesinde bu değerlerin MTX için 3,9 ve 3-AP/MTX kombinasyonu için 5,6 olduğu tespit edildi (Şekil 35).



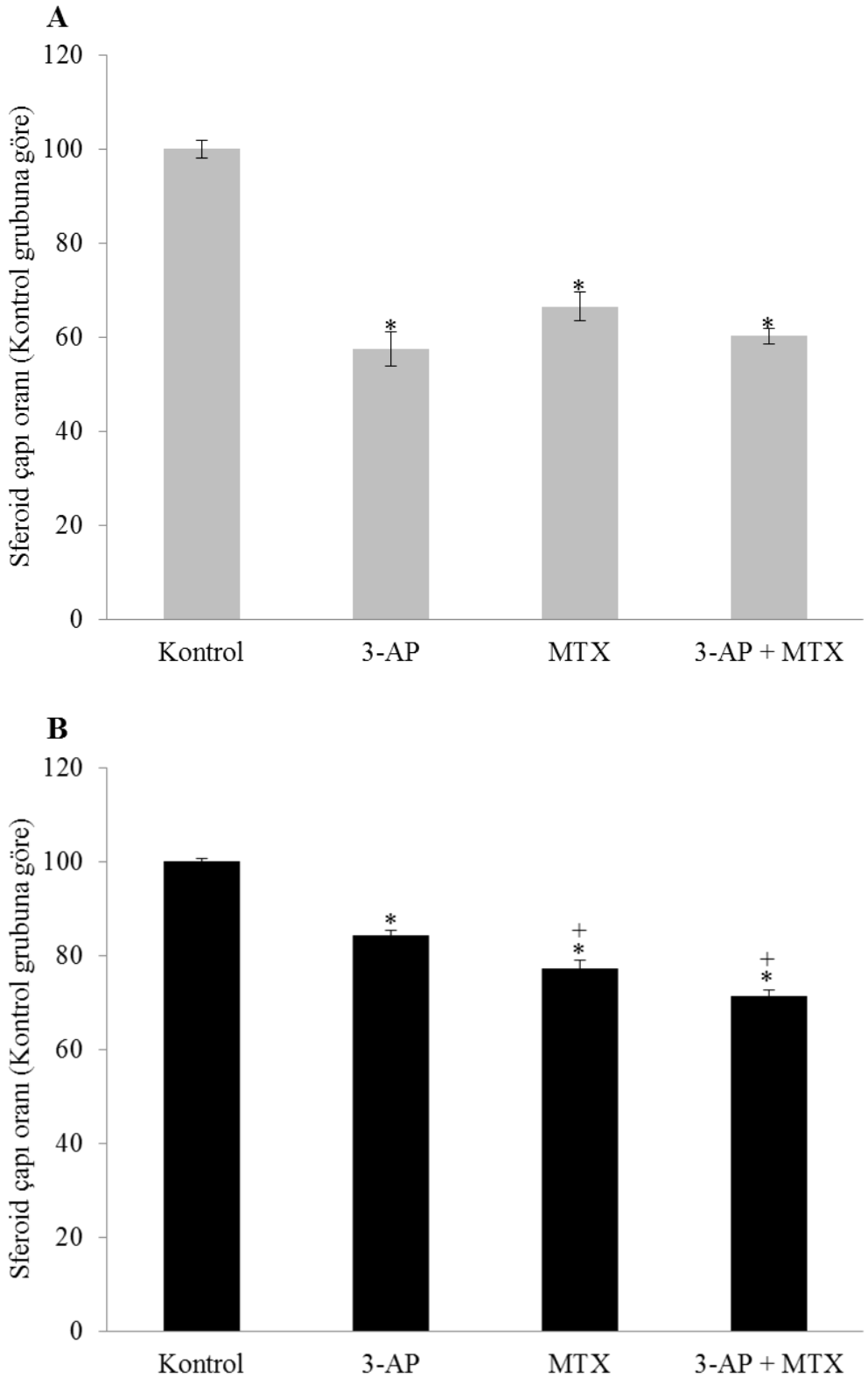
Şekil 35. DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının hücre döngüsünün durdurulmasında görevli olan genlerin ifadesi üzerine etkisi *p<0,05 kontrol grubuna göre, +p<0,05 3-AP grubuna göre.

PC3 VE DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA 3-AP VE MTX'UN SFEROİD ÇAPINA ETKİSİ

3-AP ve MTX uygulamasından 10 gün sonra sferoid çapı için mikroskobik ölçüm yapıldı. Sferoid yapılarının görsel olarak karşılaştırılması gerçekleştirildi (Şekil 36). Belirtilen sürenin sonunda PC3 hücre hattında sferoid çapını MTX'un % 34 oranında küçülttüğü, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 40 oranında küçülttüğü tespit edildi (Şekil 37A). DR-PC3 hücre hattında sferoid çapını MTX'un % 23 oranında küçülttüğü, 3-AP/MTX kombinasyonunun % 29 oranında küçülttüğü tespit edildi (Şekil 37B).



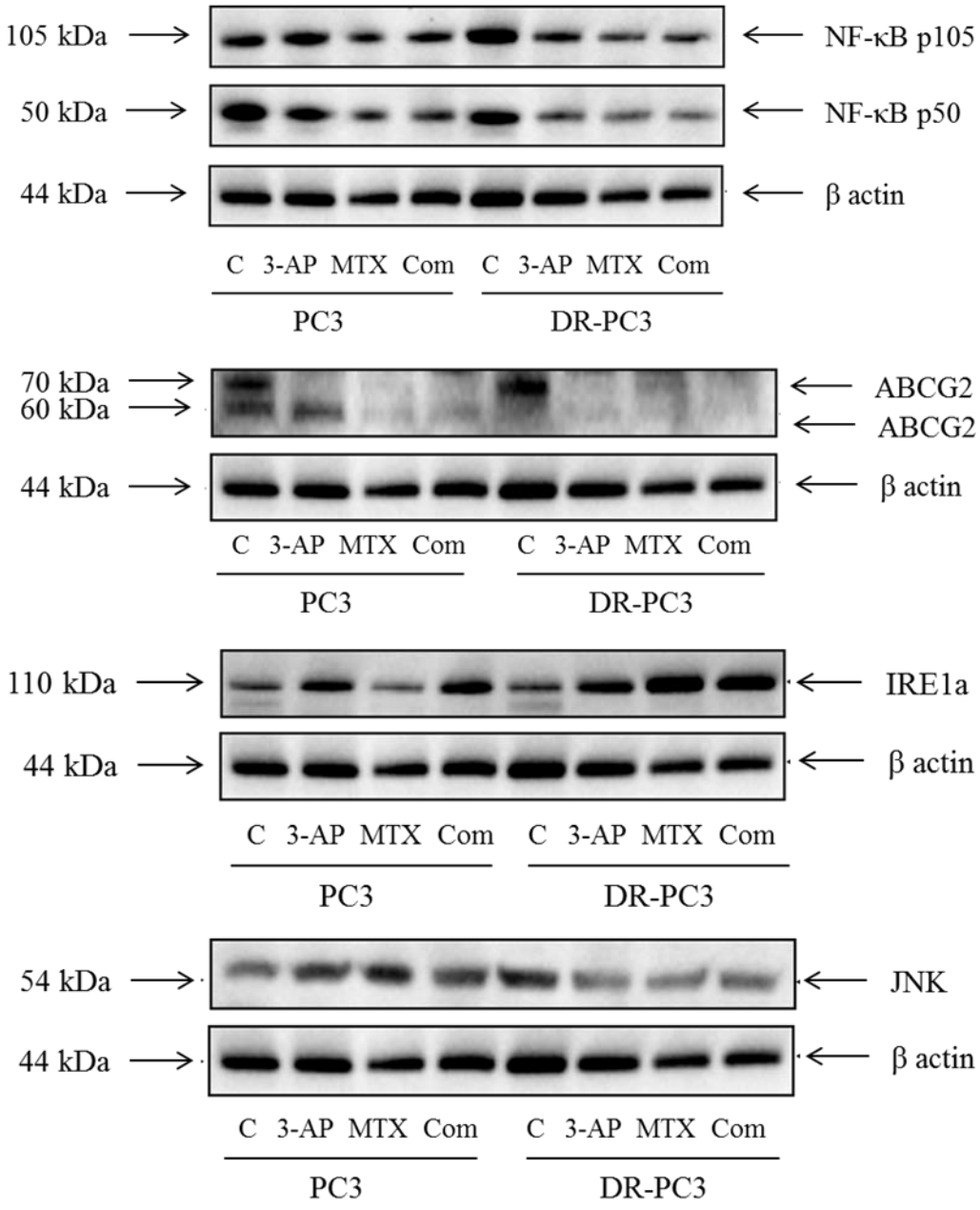
Şekil 36. Üç boyutlu hücre kültüründe PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının sferoid çapı büyüklüğüne etkisi.



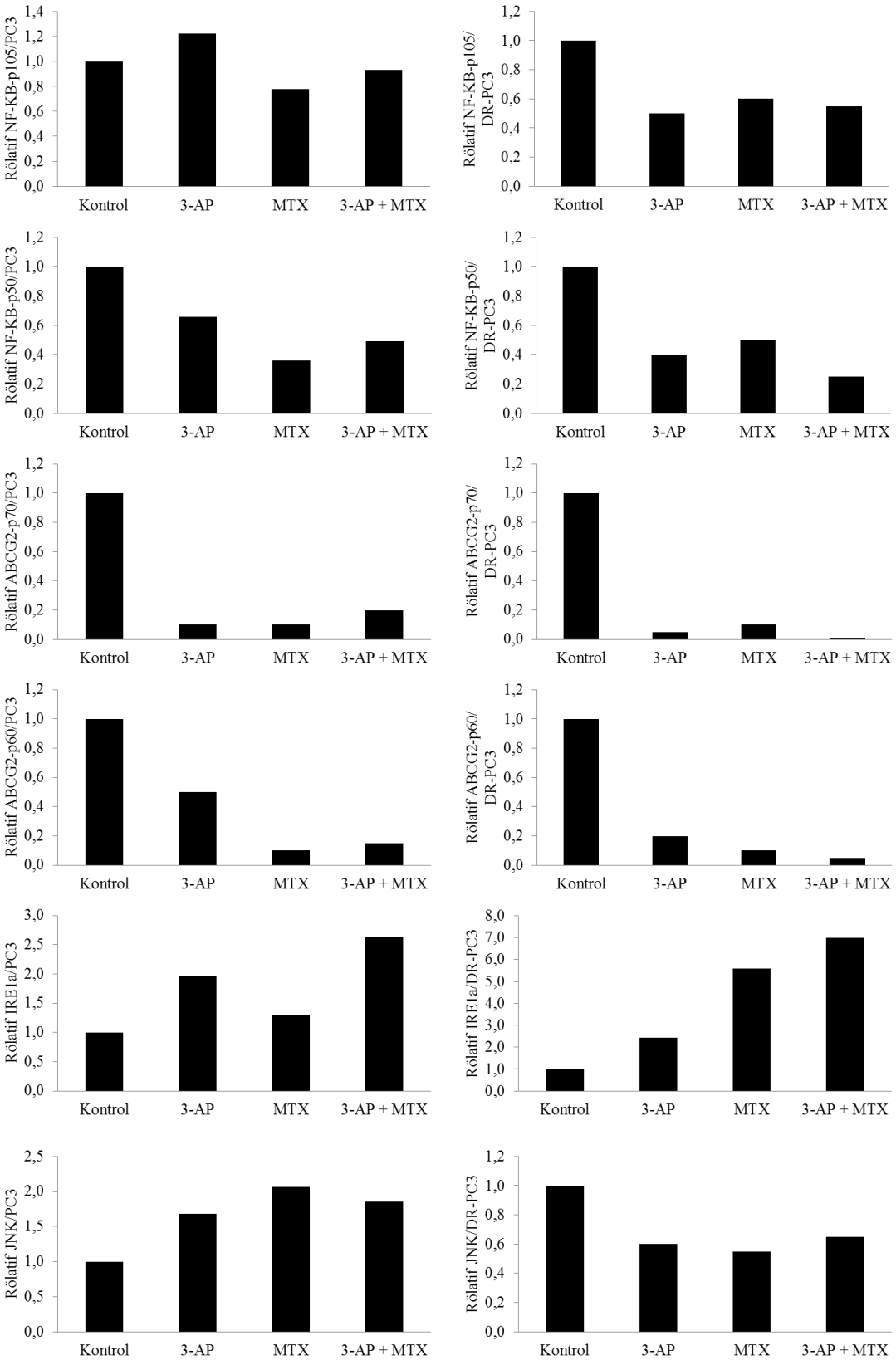
Şekil 37. Üç boyutlu hücre kültüründe PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının sferoid çapı üzerine etkisi, *p<0,05 kontrol grubuna göre, +p<0,05 3-AP grubuna göre.

PC3 VE DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA 3-AP VE MTX'UN PROTEİN DÜZEYİ ÜZERİNE ETKİSİ

PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP ve MTX uygulamalarının gen ifadesi üzerine olan etkisi protein düzeyinde de araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda JNK, NF-κB, IRE1a, ABCG2-p60, ABCG2-p70 ve β-aktin proteinlerinin seviyeleri analiz edildi. β-aktin proteini tüm hücrelerdeki protein miktarını eşitleyerek analiz yapmak amacıyla kullanıldı. PC3 örneklerinde MTX uygulaması ile birlikte kontrol grubuna göre JNK seviyesinde % 106 oranında artma, NF-κB-p105 seviyesinde % 22 oranında azalma, NF-κB-p50 seviyesinde % 74 oranında azalma, IRE1a seviyesinde % 31 oranında artma, ABCG2-p60 seviyesinde % 90 oranında azalma, ABCG2-p70 seviyesinde % 90 oranında azalma tespit edildi. PC3 örneklerinde 3-AP ve MTX kombinasyonu uygulandığında ise kontrol grubuna göre JNK seviyesinde % 85 oranında artma, NF-κB-p105 seviyesinde % 7 oranında azalma, NF-κB-p50 seviyesinde % 51 oranında azalma, IRE1a seviyesinde % 163 oranında artma, ABCG2-p60 seviyesinde % 80 oranında azalma, ABCG2-p70 seviyesinde % 80 oranında azalma tespit edildi. DR-PC3 örneklerinde MTX uygulaması sonrasında JNK seviyesinde % 40 oranında azalma, NF-κB-p105 seviyesinde % 40 oranında azalma, NF-κB-p50 seviyesinde % 50 oranında azalma, IRE1a seviyesinde 4,59 kat artma, ABCG2-p60 seviyesinde % 90 oranında azalma, ABCG2-p70 seviyesinde % 90 oranında azalma tespit edildi. DR-PC3 örneklerinde 3-AP ve MTX kombinasyonu uygulandığında ise kontrol grubuna göre JNK seviyesinde % 40 oranında azalma, NF-κB-p105 seviyesinde % 44 oranında azalma, NF-κB-p50 seviyesinde % 70 oranında azalma, IRE1a seviyesinde 6 kat artma, ABCG2-p60 seviyesinde % 90 oranında azalma, ABCG2-p70 seviyesinde % 95 oranında azalma tespit edildi (Şekil 39). Protein düzeyinin analiz işlemlerinde western blotting yönteminde elde edilen protein bantları analiz edildi (Şekil 38).



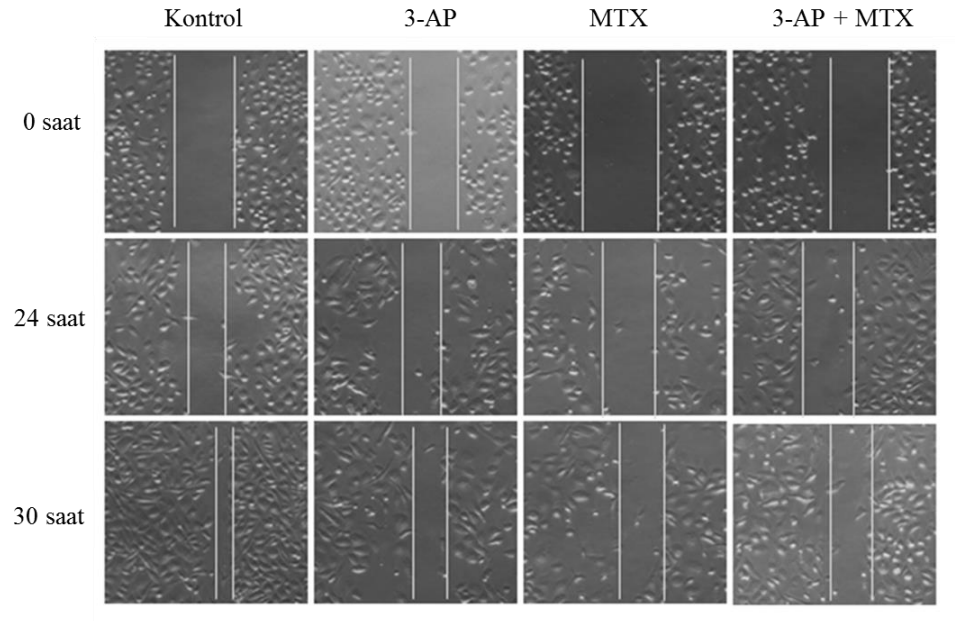
Şekil 38. PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP/MTX uygulamasının JNK, NF-κB, IRE1a, ABCG2-60, ABCG2-70 ve B-aktin (β actin) proteinlerinin düzeyi üzerine etkisinin analiz edildiği protein bantları. (C: KONTROL, Com: 3-AP + MTX).



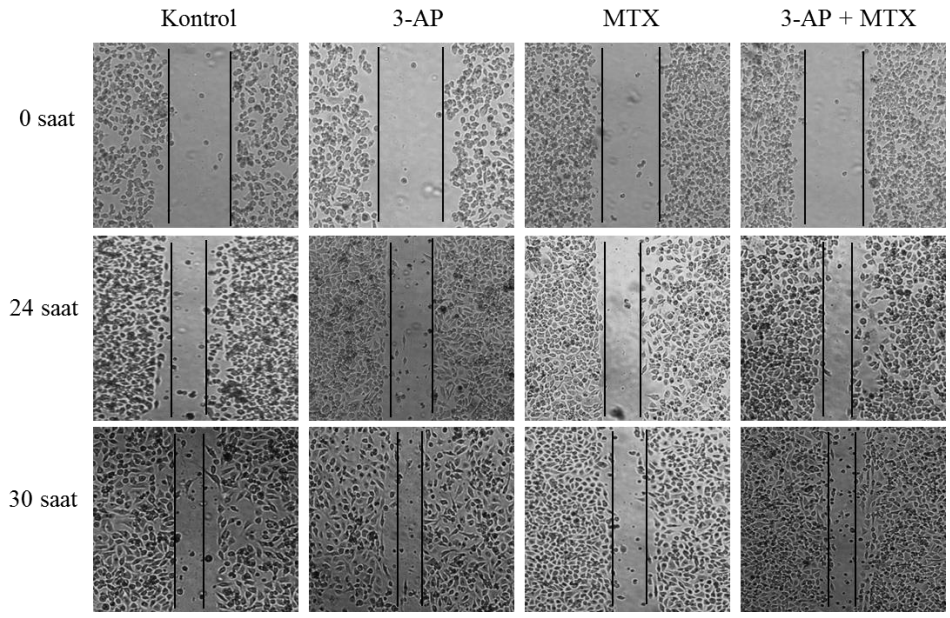
Şekil 39. PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının protein düzeyine etkisi. NF-κB-p105, NF-κB-p50, ABCG2-p70, ABCG2-p60, IRE1a ve JNK.

PC3 VE DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA 3-AP VE MTX'UN HÜCRE GÖÇÜ ÜZERİNE ETKİSİ

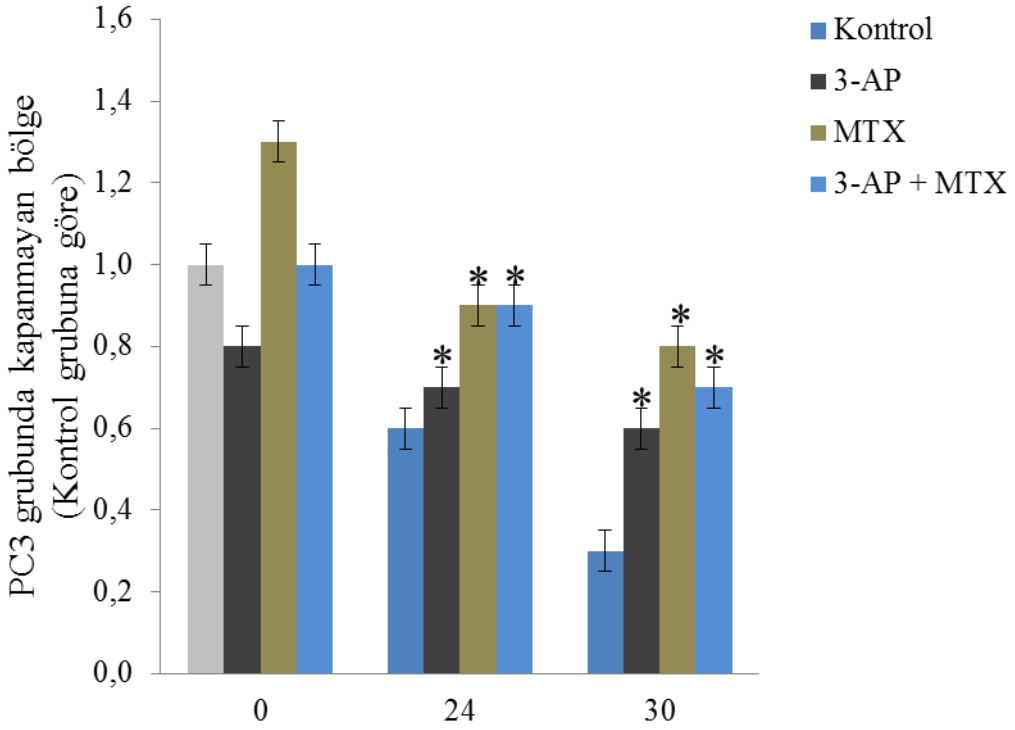
Çalışmada kullanılan ajanların kanser hücrelerini göç yeteneği yönünden nasıl etkilediği araştırıldı. Bu amaçla mikroskop altında 0, 24 ve 30. saatlerde görüntü alınarak karşılaştırma yapıldı (Şekil 40, 41, 42 ve 43).



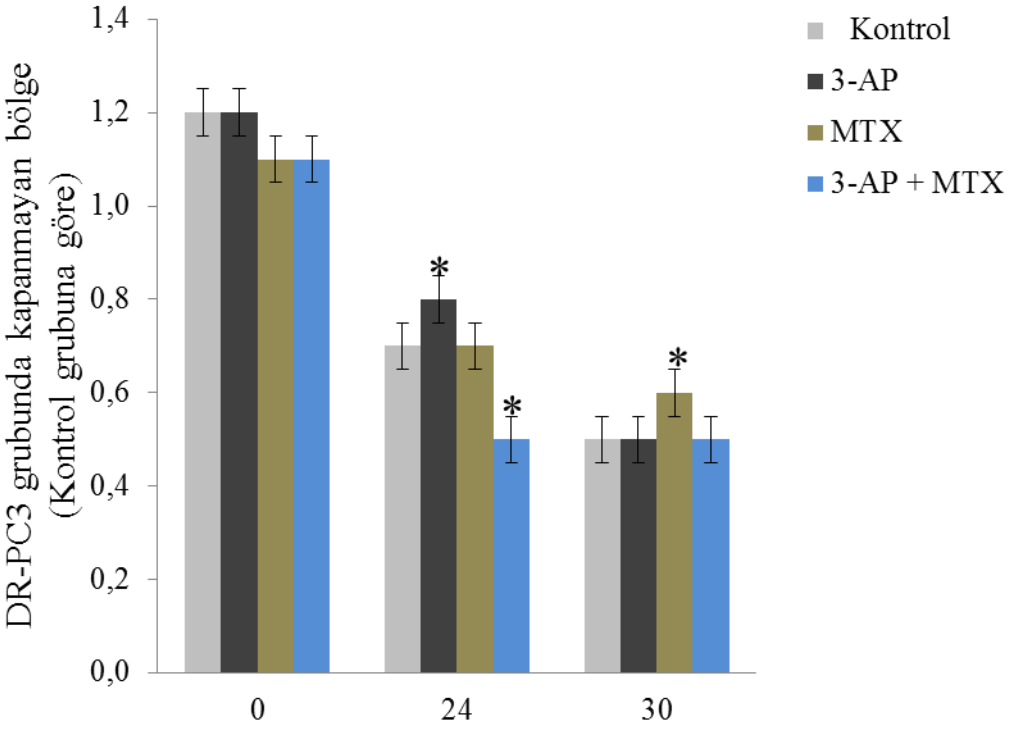
Şekil 40. PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının hücre göçü üzerine etkisi.



Şekil 41. DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının hücre göçü üzerine etkisi.



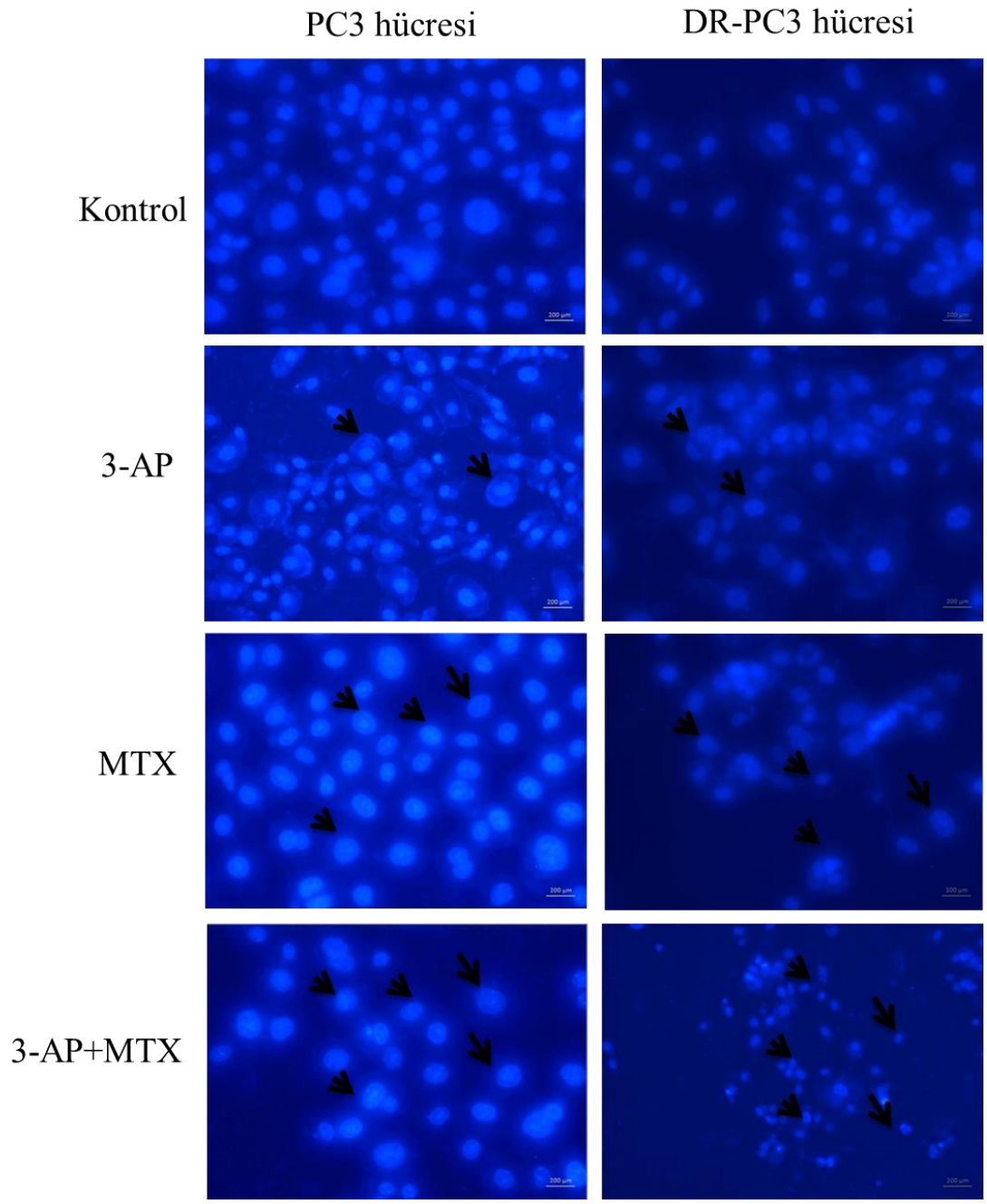
Şekil 42. PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının hücre göçü üzerine etkisi.



Şekil 43. DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının hücre göçü üzerine etkisi.

PC3 VE DR-PC3 HÜCRE HATLARINDA HOESCHT İLE APOPTOZ GÖRÜNTÜLEME

Triapin ve mitoksantron uygulamaları ile meydana gelen apoptotik hücreler hoescht boyası yardımıyla boyanarak görüntülendi (Şekil 44).



Şekil 44. PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının apoptotik hücre oluşumuna etkisinin hoescht boyaması ile tespiti.

TARTIŞMA

Prostat kanseri, dünya genelinde erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık ortaya çıkan ikinci kanser türüdür (61). Bu kanser genellikle ileri yaştaki bireylerde gözlenmektedir (62). Prostat kanseri tedavisinde hedefli veya sitotoksik kemoterapi ajanları kullanılır (89). Ancak bu süreçte bazı hastalarda ilaca verilen yanıt azalıp hastalığın ilerleme gösterdiği ilaç direnci gelişebilir (63, 90).

Triapin (3-AP), DNA replikasyonu sırasında substrat olarak kullanılan deoksiribonükleotidlerin sentezinden sorumlu ribonükleotid redüktaz (RNR) enziminin inhibitörüdür (59). RNR inhibisyonu, DNA tamir ve replikasyonunu aksatarak hücrenin G1 evresinde durdurulmasına ve metal iyonlarıyla etkileşip ER içi ile dışı arasındaki iyon dengesinin bozulmasına sebep olur. 3-AP, RNR inhibisyonu yoluyla ER stresini tetikleme özelliğine de sahiptir (60). Bu özellikleri farklı hücre tiplerinde yapılan çalışmalarla aydınlatılmıştır (29, 30, 31). Ancak dosetaksel dirençli prostat kanseri hücrelerinde yapılmış bir çalışma henüz literatürde mevcut değildir.

Dosetaksele karşı direnç kazandırılan PCa hücreleri (DR-PC3) ile ilaç direnci göstermeyen PC3 hücrelerinde 3-AP'nin IC50 değerini (72 saat) belirlemek amacıyla karşılaştırmalı olarak hücre sağkalım analizleri gerçekleştirildi. Alvero ve ark. (58) buna benzer bir çalışmayı epitelyal over kanser (EOC) hücre hattında çalıştıklarını rapor etmişlerdir. DR-PC3 hücre hattının PC3'ye göre dosetaksel için elde edilen IC50 değerinde artış olduğu saptandı. Bu sebeple gelişen ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının ortaya konulması için hem mRNA ifade analizi hem de protein düzeyi analizi gerçekleştirilerek dosetaksel direncinin geliştiği gösterildi. Böylece ilaca karşı dirençli hatların kontrolünde ve

tanımlanmasında kabul gören teknikler kullanıldı. Duan ve ark. (87) dosetaksel direnci kazanmış MCF-7 (meme kanseri) hücrelerinde *ABCG-2* geninin kontrol grubuna göre ifadesinin yükseldiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda da bu genin ifadesinde 3,4 kat artış tespit edildi. Özellikle protein düzeyindeki analizler gelişen direnç hakkında ayrıntılı fikir vermektedir. Gerçekleştirilen bir başka çalışmada Canovas ve ark. (91) ilaç direnci gelişimini tespit etmek için ABCB1 proteininin düzeyini Western blot yöntemi ile analiz edip artış olduğunu tespit etmişlerdir. Tez çalışmasında da ABCG2 proteini analiz edildiğinde % 103 oranında artış tespit edildi. İlaç direnci alanında çalışmalar yapan başka araştırıcılar da direnci test etmek için protein ve mRNA düzeyinde analizler gerçekleştirmiştir (64).

DR-PC3 hücrelerinin 3-AP'e olan duyarlılığını ve IC50 değerini belirlemek için hücre sağkalım analizi yapıldı ve 7,5 μM olarak tespit edildi. Triapin ve serviks kanseri hücrelerinde yapılan çalışma (31) ile bu çalışmadan elde edilen sitotoksisite sonuçları benzerlik göstermektedir. Benzer 3-AP dozları DR-PC3 hücre hattında % 65 oranında hücre çoğalmasını engellerken 5 μM 3-AP (72 saat) ile tedavi edilen serviks kanseri hücrelerinde % 55 oranında sağkalım inhibisyonu gelişmektedir. Bu sonuç 3-AP molekülünün farklı kanser türlerinde benzer antikanser etki gösterebildiğine işarettir. Triapin kullanımının hedeflenen amaca uygun olarak ER stresi oluşturup oluşturmadığını kontrol etmek amacıyla ER stresinden sorumlu *ERN1* ve *EIF2AK3* genlerinin mRNA ifade değişimleri RT-qPCR yöntemi ile analiz edildi. Daha önce yapılan bir araştırmada UPR yolağının kontrolünden sorumlu bu genlerin ER stresi esnasında ifadelerinin yaklaşık 5 kat arttığı gösterilmiştir (5). Bu çalışmada da söz konusu genlerin ifadelerinin 3-AP uygulaması ile birlikte sırasıyla 3,9 ve 1,9 kat arttığı tespit edildi. Triapin tedavisinde PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde apoptoz düzeyi sitometrik Annexin V/PI yöntemi ile değerlendirildi. Elde edilen verilere göre her iki hücre grubunda da apoptotik (sırasıyla 2 ve 4 kat) ve ölü hücre (sırasıyla 1 ve 0,75 kat) oranında kontrol gruplarına göre önemli düzeyde artış olduğu tespit edildi. Gelişen apoptozun moleküler mekanizmasını tespit etmek amacıyla apoptotik ve antiapoptotik genlerin mRNA ifade analizleri incelendi. DR-PC3 hücrelerinde 3-AP uygulanmış grupta kontrol grubuna göre *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *APAF1*, *BAK*, *XIAP*, *P53*, *BID* ve *CYCS* (sitokrom c) genlerinin mRNA ifadelerinde meydana gelen artma; *HSP90*, *HSP70* ve *HSP27*, *BCL-2* ve *BCL-XL* genlerinin mRNA ifadelerinde meydana gelen azalma, 3-AP tedavisinin DR-PC3 hücrelerinde bazı apoptotik genlerin ifadelerini tetiklediğini ve antiapoptotik genlerin ifadelerini ise engellediğini gösterdi. RNR inhibisyonu üzerinde çalışan araştırıcılar da apoptoza yönlenen

hücrelerde sıkça yaşanan bu değişiklikleri rapor etmişlerdir. Dai ve ark. (88) lenfoma hücreleri üzerinde çalıştıklarında RNR inhibisyonu sonucu P53 artışı ile apoptozun tetiklendiğini rapor etmişlerdir. Triapin aracılı apoptotik etkinin hem içsel hem de dışsal yolaklar üzerinden tetiklendiği bu çalışmada gösterilmiştir (78). Tespit edilen bu durum daha önceden yapılan çalışmalardaki verilerle de paralellik göstermektedir (66). Örneğin, ER stresinin indüklendiği bir araştırmada, Kim ve ark. (65) incelediği HSP25 gen ifadesi ve protein düzeyinde artma meydana geldiğini saptamışlardır. Diego ve ark. (92) da benzer sonucu HSP27 için rapor etmişlerdir. Ancak, bu çalışmada *HSP90*, *HSP70* ve *HSP27* gen ifadeleri azalma yönünde olup, önceki sonuçlardan farklılık göstermektedir. Azalan HSP ifade oranlarının sebebi de apoptoz indüksiyonu ile bağlantılı olarak görülebilir (92). Çünkü ısı şoku proteinlerinin antiapoptotik özellikte davrandıkları literatürde mevcuttur (52). Özellikle HSP70 (GRP78) proteininin ifadesindeki azalma, hücrenin ER stresi ile başa çıkamayıp stresi engelleyemediği durumlarda apoptotik yolakların tetiklenmesiyle açıklanmaktadır (93). Isı şoku proteinleri, hatalı protein katlanması durumunda artış gösterse de 3-AP tedavisinin apoptozu indüklerken HSP seviyesini azalttığı yaptığımız çalışmada tespit edildi.

PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde gerçekleştirilen 3-AP tedavisinin hücre döngüsü üzerinde olan etkisini incelemek amacıyla hücre döngüsü analizleri yapıldı. DR-PC3 hücre hattında PC3 hücrelerine göre 3-AP tedavisinin, hücreleri G1 evresinde durdurduğu belirlendi. Elde ettiğimiz sonuçlar Dai ve ark.'nın (67) lenfoma hücrelerinde RNR inhibisyonu üzerine yaptığı araştırmadan elde ettiği sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bu sonuç RNR inhibisyonunun hücre sağkalım oranını düşürücü etkisinde nekroza bağlı hücre ölümünde etkili olabileceğini göstermektedir. Hücre döngüsü üzerindeki etkinin moleküler seviyede anlaşılması amacıyla *CDK2*, *CDK4*, *CDK6*, *CYCLIND1*, *CYCLINE1*, *p21* ve *p27* genlerinin mRNA ifadeleri analiz edildi. DR-PC3 hücrelerinde 3-AP uygulandığında gözlenen *CDK2*, *CDK4*, *CYCLIND1* ve *CYCLINE1* gen ifadelerindeki düşüş; *CDK6*, *p21* ve *p27* genlerinin ifadelerindeki sırasıyla 0,15; 3,4 ve 3,9 kat artış, RNR üzerine araştırma yapan Le ve Richardson'un sunduğu derleme ile paralellik sergilemektedir (68). Ancak *CDK6*'daki azalmanın sebebi tam olarak aydınlatılamadı. Gen ifadesi seviyesindeki değişimler hücre döngüsü kontrolünün 3-AP uygulaması ile kaybolduğuna işaret etmekle birlikte özellikle *p21* ve *p27* genlerinin ifadesindeki artış hücrelerin G1 evresinde hücre döngülerinin durdurulmasına işaret etmektedir (44).

Üç boyutlu *in vitro* hücre kültürü modeli tümoral dokunun *in vivo* şartlarına benzerlik göstermesi bakımından uygulanmaktadır (74). Bu çalışmada da Lama ve ark. (6)'na göre prostat kanseri PC3 ve DR-PC3 hücrelerinin üç boyutlu hücre kültürü oluşturularak tedaviye yanıtı analiz edildi. Literatürde 3-AP tedavisinin kullanıldığı prostat kanserinde üç boyutlu hücre kültür modeli yer almamaktadır. Üç boyutlu hücre kültüründe 6 nM dosetaksel ve 7,5 μM 3-AP uygulaması ile birlikte 10 günlük süreçte gelişen sferoidlerin çaplarında meydana gelen değişimler incelendi. Bu tekniğin kullanıldığı Takagi ve ark. (75)'nın LNCaP prostat kanseri hücrelerinde VEGF üretimi ile tümör büyümesinin ilişkisini gözlemledikleri çalışmada *in vitro* ortamda tümör çapının ölçülerek *in vivo* ortamdaki tümör dokusunun zamana bağlı olarak büyüme oranıyla karşılaştırıldığında, her iki sonucun paralel olduğu görülmüştür. DR-PC3 hücrelerinde ilaç direncinin diğer bir belirteci olarak dosetaksel uygulaması sonucunda sferoid çapında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Diğer yandan 3-AP uygulamasının ardından 10 gün sonra DR-PC3 hücrelerinde PC3'ye göre sferoid çapında önemli oranda bir küçülme (% 16) meydana geldiği tespit edildi. Gelişen ilaç direnci, dosetaksel ile yapılan kemoterapinin tümör büyüklüğü üzerinde etkisiz kalmasıyla gösterilmiştir. PC3 hücrelerinde sferoid çapında küçülmeye yol açan dosetaksel, DR-PC3 hücrelerinde böyle bir etki oluşturmamıştır. İlaç direnci gelişmiş PC3 hücrelerindeki 3-AP uygulamasının tedavide etkin olabileceği de gösterilmiştir.

Triapin tedavisinden alınan sonuçlar, bu molekülün ilaç direnci gelişmiş prostat kanseri hücre hatlarında bir kemoterapotik ajan ile kombinasyon tedavi stratejisi umut verici sonuçlar gösterdi. Bu yönde elde edilen sonuçlarımız daha önce yapılan Mannargudi ve Deb'in çalışmasını desteklemektedir (70). Ayrıca Mannargudi ve Deb RNR inhibisyonunu siRNA aracılığıyla da sağlayarak kanser terapisinde yeni bir tedavi alanı oluşturulacağına dikkat çekmişlerdir. Ancak literatürde prostat kanseri hastalarında güncel kemoterapide kullanılan mitoksantron (MTX) (Novantrone®) (71, 72) ile 3-AP kombinasyonunun PCa ve ilaç direnci kazanmış kanser hücrelerinde araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Tez çalışması kapsamında MTX için gerçekleştirilen hücre sağkalım analizlerinde 72 saat inkübasyon için IC50 değerinin 1,5 μM olarak tespit edildi. Daha sonra 3-AP ve MTX kombinasyon tedavisinin PC3 ve DR-PC3 hücrelerindeki apoptoz oranlarında MTX tedavisine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdi. MTX uygulaması antiapoptotik *BCL-2* ve *BCL-XL* gen ifadelerini azaltırken 3-AP/MTX kominasyonu da benzer etki gösterdi. Ayrıca *XIAP* gen ifadesinde de azalmaya yol açtı. Bazı antiapoptotik

genlerin baskılanmasının MTX ile ilgili olduğu sonuçlar literatürde mevcuttur. Guissi ve ark. (81) meme kanseri hücrelerinde MTX'un apoptozda indükleyici olarak yer aldığını göstermişlerdir. Apoptozu teşvik edici *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *APAF1* ve *p53* genlerinin ifade düzeyleri MTX tarafından artırıldı. MTX'un H1299 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde de içsel apoptoz yolağı üzerinde görevli *p53* genini indükleyici etkiye sahip olduğu literatürdeki çalışmalarla da desteklenmiştir (73). Triapine ve mitoksantron kombinasyon tedavisinin de apoptotik genlerin ifadelerini tetiklediği tespit edildi. Ayrıca bu moleküllerin kombinasyonlarının etkilerinin ayrı ayrı kullanılmalarından anlamlı fark oluşturdukları da istatistiksel olarak saptandı. Triapin ve mitoksantron molekülleri ayrı ayrı *CYCS* (sitokrom c) gen ifadesine önemli düzeyde etki göstermezlerken, kombinasyon tedavilerinin gen ifadesini anlamlı düzeyde uyardıkları gözlemlendi. Gen ifadelerindeki bu değişimler içsel ve dışsal yolak üzerinden apoptoz aktivasyonunun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır (82).

Dosetaksel direnci geliştirilmiş PCa hücre hattında 3-AP, MTX ve 3-AP/MTX uygulamalarının RNR enziminin katalitik altünitesi olan RNRM1'in üzerindeki etkisi mRNA düzeyinde analiz edildi. Her üç uygulamanın da *RNRM1* gen ifadesinde azalmaya sebep olduğu ve özellikle kombinasyon tedavisinin istatistiksel olarak daha anlamlı bir azalma ortaya koyduğu saptandı. Böylece 3-AP ve kemoterapotik bir ajan olan MTX'un kombinasyon tedavisinin sonucunda PCa hücre hatlarında RNR fonksiyonunu azalttığı bu hücrelerde ilk kez tespit edilmiş oldu. MTX, DNA replikasyonu sırasında işlev gören DNA topoizomeraz enziminin işlevini inhibe ederek kanser hücrelerinin DNA replikasyonuna engel olmaktadır (83). Bu durum da hücreleri apoptoza yönlendirmektedir. Taksanlar sınıfından olan dosetaksele karşı direnç geliştiren hücrelerde DNA replikasyonu ve onarımında kullanılan substratların sentezinden sorumlu RNR enziminin inhibisyonu da MTX'un etkisini artırmaktadır (84).

Kombinasyon tedavisi sonucu gelişen apoptotik ve ölü hücre düzeyleri PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında analiz edildi. 3-AP/MTX tedavisi hücre döngüsünü G1 evresinde tutarak hücre sayısını her birinin ayrı uygulamasına göre istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu saptandı. Hücre döngüsünden sorumlu olan genlerin mRNA seviyeleri, RT-qPCR analizlerine göre 3-AP ile yapılan uygulamalardan elde edilen sonuçlarla MTX ve kombinasyonlarından elde edilen sonuçların literatür ile uygunluk gösterdiği tespit edildi. Lu ve arkadaşlarının HeLa hücreleri üzerinde DNA topoizomeraz inhibisyonu oluşturdukları

çalışmada da hücre döngüsünde G1 evresinde durma tespit edilmiştir (85). Hücre döngüsünün durdurulmasında etkili olan *p21* ve *p27* genlerinin mRNA seviyelerinde ise hem MTX hem de 3-AP/MTX kombinasyonu istatistiksel olarak önemli bir artışı tetikledi. Çalışmamızda kullandığımız bu moleküllerin kanser hücrelerini sadece apoptoza yönlendirerek değil, aynı zamanda hücre döngülerini G1 evresinde durdurarak antikanser etki gösterdikleri söylenebilir. Vijayaraghavalu ve ark. (86), antikanser ilaçlara karşı direnç geliştirilmiş meme kanseri hücrelerinde *p21* geninin aktivasyonuyla hücre döngüsünü G2/M evresinde durdurmayı başarmışlardır. Bu çalışmamızda biz de prostat kanseri hücrelerinde bu durumu sağladık.

Üç boyutlu hücre kültürüne yapılan 3-AP/MTX tedavisi sferoid yapının büyüklüğüne önemli bir fark oluşturmadı. Hücre göç oranı analiz edildiğinde PC3 hücrelerinde kombinasyon tedavisinin MTX tedavisine göre daha fazla etki edip hücre göçünü önemli derecede azalttı. DR-PC3 hücrelerinde bu bakımdan istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmedi. Hücrelere yapılan 3-AP ve MTX uygulamalarından sonra hoescht boyası ile apoptoz düzeyi floresan mikroskopta incelendi. Literatürde PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde, hücre göç oranının analizi ve hoescht boyaması ile apoptotik hücre tespitinin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. Ancak, Cabrespine ve arkadaşları paklitaksel, karboplatin, mitoksantron ve bunların kombinasyon tedavisinin PC3 ile DU145 prostat kanseri hücre hatlarındaki apoptotik etkilerini araştırmak için hoescht boyamasından faydalanmışlar ve apoptotik hücrelerin mitoksantron tedavisi ile arttığını göstermişlerdir (93). Bu çalışmada da MTX tedavisi yapılan PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde apoptoz oranının arttığı gösterildi.

PC3 ve DR-PC3 hücrelerinin 7,5 μM 3-AP ve 1,5 μM MTX (72 saat) tedavisi sonrasında JNK, NF-κB, IRE1a, ABCG2-p60 ve ABCG2-p70 proteinlerinin düzey değişimleri Western blot ile incelendi. PC3 hücre örneklerinde 3-AP uygulaması ile birlikte JNK, NF-κB-p105 ve IRE1a protein seviyelerindeki artma, NF-κB-p50, ABCG2-p60 ve ABCG2-p70 seviyelerinde ise azalma tespit edildi. IRE1a artışı, JNK artışı ve NF-κB-p50 azalışı ER stresi ile birlikte apoptoz aktivasyonunun meydana geldiğini göstermektedir. Bu durum da literatür ile uygunluk göstermektedir (79). Zhang ve ark. (95) HCT-116 ve HT-29 kolorektal kanser hücrelerine sodyum butirat uygulayarak ER stresi oluşumunu test etmek amacıyla IRE1a proteininin western blot analizini yapmışlardır. Araştırıcılar IRE1a proteini artışı ile ER stresini göstermişlerdir. DR-PC3 ve PC3 hücrelerine 3-AP/MTX tedavisi yaptığımız bu çalışmada da IRE1a protein seviyesinde artış olduğunu tespit ettik. Li ve ark. (96) LNCaP ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde Guttiferon F uygulayarak apoptoz

oluşumunu incelerken JNK proteininin seviyesini analiz etmişlerdir. Araştırıcılar, JNK artışı ile apoptoz oluşumunun ilişkili olduğunu belirtmişler ve bu proteinin apoptoz belirteci olarak çalışmalarında kullanmışlardır. 3-AP ile yaptığımız bu çalışmada da JNK seviyesinin artışından apoptozdaki etkiyi tespit ettik.

DR-PC3 örneklerinde 3-AP uygulaması sonucunda JNK, NF-κB-p105, NF-κB-p50, ABCG2-p60 ve ABCG2-p70 seviyelerinde azalma, IRE1a seviyesinde artma gözlendi. ABCG2-p70 ve ABCG2-p60 seviyelerindeki azalma ilaç direncinin zayıflatıldığına işaret ederken IRE1a seviyesindeki artma ise ER stresinin indüklendiğini göstermektedir. Bu değişimlerden ulaştığımız yorumlar literatürdeki verilerle paraleldir (80). Protein düzeyindeki tüm sonuçlar ele alındığında çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler kısmen literatür ile örtüşmektedir (5, 69). Postiglione ve ark. (97)'nın PC3 hücrelerine 5-aminolaevulinik asit uyguladıkları çalışmada ABCG2 protein düzeyi western blot yöntemi ile analiz etmişler. Araştırıcılar bu proteini, hücre içine giren ilaç aktif maddelerini hücre dışına püskürten moleküler pompalar olarak değerlendirmişler. ABCG2 inhibisyonu ilaç etkinliğini artırıcı bir özellik sağlamaktadır.

Eldeki sonuçlar ve literatürden sağlanan bilgiler ışığında PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde meydana gelen protein düzey farklılıklarının apoptoz ve ER stresi gelişimi ile ilgili gen ifadelerindeki değişimlerin tamamının protein ürününe yansımadığı sonucuna varıldı. Çünkü apoptoz ve ER stresi indüklenmesinin farklı hücresel yolakların farklı tekniklerle analiz edilmesiyle gösterildiği açıktır. PC3 örneklerinde MTX ve 3-AP/MTX uygulanması sonrasındaki analizlerde gözlenen JNK seviyesindeki artma apoptoz aktivasyonuna, NF-κB-p105 ve NF-κB-p50 seviyelerindeki azalma antiapoptotik proteinlerin inaktivasyonuna, IRE1a seviyesindeki artma ER stresi aktivasyonuna, ABCG2-p60 ve ABCG2-p70 seviyelerindeki azalma ise ilaç etkinliğinin artmasına işaret etmektedir. DR-PC3 örnekleri kullanıldığı durumda ise MTX uygulaması ilaç etkinliği, apoptoz ve ER stresi üzerinde yeterli bir miktarda artırıcı etki göstermezken 3-AP/MTX uygulaması tüm bu aşamalarda MTX uygulamasına göre daha fazla etkinlik göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlara göre 3-AP molekülü DR-PC3 hücrelerinin çoğalma yeteneğini engelleyici bir etkiye sahiptir. Çalışmanın temel ve özgün değeri olarak dosetaksel kemoterapotik ajanına karşı direnç geliştirilmiş PC3 hücrelerinde RNR inhibisyonu yoluyla ER stresi ve apoptoz yolaklarının tetiklenmesinin temel alındığı tedavi imkanı test edildi. MTX gibi kemoterapotik ajanlar ile birlikte kullanımda da bu tedavi

imkanı artmaktadır. *İn vitro* koşullarda yapılan tüm bu çalışmalar *in vivo* ortamda gerçekleştirilecek çalışmalar için de umut verici sonuçlar ortaya koymuştur.

SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında elde edilen verilere göre,

1) 3-AP ve MTX ile yapılan uygulamalar ve elde edilen sonuçlar ışığında prostat kanseri tedavisindeki kemoterapi sürecinde ilaç direncini geriletip ilaç etkinliğini artırma noktasında bu iki maddenin kombinasyon halinde ve uygun dozda kullanılması potansiyel faydalar barındırmaktadır.
2) 7,5 μM 3-AP ve 1,5 μM MTX uygulamaları ilerleyen süreçlerde bu iki maddenin *in vivo* koşullarda da çalışılabileceğini gösterdi. *İn vitro* ortamda 3-AP maddesinin tümör çapı üzerindeki düşürücü etkisi *in vivo* tümör dokusu çalışmalarında da kullanılma potansiyelini ortaya koydu. Bu maddenin MTX ile kombinasyon uygulamasında da aynı sonuç ortaya çıktı.
3) PC3 ve DR-PC3 hücreleri üzerinde kullanılan 3-AP ile MTX maddelerinin apoptozu tetikleyerek kanser hücrelerini ölüme yöneltti. Apoptozun yanı sıra hücre döngüsünü G1 evresinde durdurduğu da gözlendi. Apoptoz ve hücre döngüsü hakkındaki yargılara hücre sağkalım analizleri, Annexin V/PI analizi ile mRNA ve protein düzeyi analizlerinin sonuçlarıyla varıldı. Kullanılan maddelerin apoptotik etkileri moleküler genetik ve proteomik analizlerle birlikte hoescht boyası yardımıyla mikroskobik açıdan da gözlendi.
4) Triapin maddesinin ER stresi üzerindeki indükleyici, apoptoz üzerindeki tetikleyici ve hücresel döngünün durdurulmasına yol açma özellikleri tespit edildi.

5) Çalışma kapsamında 3-AP ve MTX maddelerinin JNK, NF-κB, kaspazlar, APAF1 ve P53 proteinlerinin sentezinden sorumlu olan genlerin apoptoza teşvik edici özellikte etkilediği anlaşıldı.
6) Apoptoz mekanizmasının *CASP8* aracılığıyla dışsal yolak üzerinden; *BAX*, *CASP3*, *APAF1*, *BAK*, *P53* ve *BID* aracılığıyla da içsel yolaktan tetiklendiği gösterildi.

ÖZET

Kemoterapi direnci, erkeklerde prostat kanseri (PCa) tedavisinin başlıca problemidir. Kanser hücreleri, protein homeostazı bozan, açılmış protein tepkisi yoluyla endoplazmik retikulum (ER) stresi üreten çeşitli çevresel faktörlere maruz kalırlar. Bir ribonükleotid redüktaz inhibitörü olan triapin (3-aminopiridin-2-karboksaldehit tiyosemikarbazon, 3-AP), bir dizi kanserde güçlü anti-kanser aktivitesi sergilemektedir. Ancak, ilaca dirençli PCa hücrelerinin etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, dosetaksel dirençli PCa (DR-PC3) hücrelerinde 3-AP'nin etkisini araştırmaktır.

Bu çalışmada insan kastrasyon dirençli PCa hücre hattı PC3 kullanıldı. İlaç direnci, dosetaksel ile hücrelerin tedavisi ile geliştirildi. Hücre canlılığı MTT testi ile belirlendi. Apoptoz ve hücre döngüsü ilerlemesi görüntü tabanlı sitometrelerle analiz edildi. mRNA ifade analizleri RT-qPCR ile yürütülmüştür. Üç boyutlu (3B) hücre kültürü, 3-AP tedavisinin tümör hacmi üzerindeki etkisini tahmin etmek için oluşturulmuştur.

DR-PC3 hücreleri 72 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda 3-AP ile tedavi edildi. 3-AP tedavisi 7.5 uM'lik bir IC50 ile 72 saat boyunca hücre sağkalımını önemli ölçüde düşürdü ve ER-strese neden oldu. 3-AP'nin, hücre döngüsü durması ve / veya indüklenmiş apoptotik hücre ölümüyle hücre sayısını azaltıp azaltmadığını ortaya çıkarmak için, DR-PC3 hücreleri 72 saat boyunca 7.5 uM 3-AP ile muamele edildi. Sonuçlar, 3-AP'nin apoptoza yol açtığını ve hücrelerin G1 fazı durdurmasına neden olduğunu gösterdi. Hücrelerin 10 gün boyunca 3-AP ile muamele edilmesi sferoid çapını % 16 düşürdü.

Önceki çalışmalar, 3-AP'nin çeşitli hematolojik kanserlerin sistemik tedavisi için umut verici bir ilaç adayı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, ileri evre katı tümör taşıyan hastalarda 3-AP güvenle sisplatin ile kombinasyon tedavisinde kullanılabilir. Öte yandan, gemsitabin ile 3-AP kombinasyonu, ileri küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde etkilidir.

ER stresi kanser tedavisinde potansiyel bir hedef olduğundan, 3-AP'nin ER stresi tepkisini indükleme ve DR-PC3 hücrelerinde apoptozu aktive etme kabiliyeti bu molekülü PCa tedavisi için umut verici bir anti kanser ajanı haline getirmektedir. Bununla birlikte, *in vivo* etkinliklerini değerlendirmek için ileri araştırmalara gerek vardır.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, ER stresi, ilaç direnci, triapin

CHEMOTHERAPEUTIC SENSITIZATION BY ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN DRUG-RESISTANT PROSTATE CANCER CELLS

SUMMARY

Chemotherapy resistance is the major problem for prostate cancer (PCa) therapy in men. Cancer cells are exposed to various environmental factors that disrupt protein homeostasis, producing endoplasmic reticulum (ER) stress via unfolded protein response. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, 3-AP), a ribonucleotide reductase inhibitor, demonstrates potent anti-cancer activity in a range of cancers. However, it is effect in drug-resistant PCa cells has never been investigated. The aim of this study was to investigate the effect of 3-AP in Docetaxel-resistant PCa (DR-PC3) cells.

Human castration-resistant PCa cell line PC3 was used in this study. Drug resistance was developed by treatment of the cells with docetaxel. The cell viability was determined by MTT test. Apoptosis and cell cycle progress were analyzed by image-based cytometer. The mRNA expression analyzes were conducted by RT-qPCR. Three-dimensional (3D) cell culture was established to estimate the effect of 3-AP treatment on tumor volume.

DR-PC3 cells were treated with different concentrations of 3-AP for 72 h. 3-AP treatment significantly reduced cell survival at 72 h with an IC50 of 7.5 μM, and induced ER-stress. In order to reveal whether 3-AP decreased cell number through cell cycle arrest and/or induced apoptotic cell death, DR-PC3 cells were treated with 7.5 μM of 3-AP for 72 h. The results indicated that 3-AP induced apoptosis pathway, and caused to G1 phase arrest of the

cells. Treatment of the cells with 3-AP for 10 days reduced the volume of spheroid diameter by 16 %.

Previous studies have shown that 3-AP is a promising drug candidate for the systemic treatment of several hematological malignancies. Furthermore, 3-AP may safely be used in combination treatment with cisplatin in patients with advanced-stage solid tumor malignancies. On the other hand, 3-AP combination with gemcitabine is effectiveness in advanced non-small-cell lung cancer.

ER stress is a potential target in cancer treatment, so the ability of 3-AP to induce ER stress response and to activate apoptosis in DR-PC3 cells make this molecule become a promising anticancer agent for PCa treatment. However, further investigations are required to evaluate its in vivo efficacies.

Key words: Prostate cancer, ER stress, drug resistance, triapine

KAYNAKLAR

1. Takeda M, Mizokami A, Mamiya K, Li Y Q, Zhang J, Keller E T, Namiki M. The establishment of two paclitaxel-resistant prostate cancer cell lines and the mechanisms of paclitaxel resistance with two cell lines. The Prostate 2007;67:955-967.

2. Petrylak D P. Docetaxel for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. Reviews in Urology 2003;5(3):14-21.

3. Zhang W, Meng Y, Liu N, Wen X F, Yang T. Insights into chemoresistance of prostate cancer. International Journal of Biological Sciences 2015;11(10):1160-1170.

4. Adamowicz J, Pakravan K, Bakhshinejad B, Drewa T, Babashah S. Prostate cancer stem cells: From theory to practice. Scandinavian Journal of Urology 2017;51:95-106.

5. Trondl R, Flocke L S, Kowol C R, Heffeter P, Jungwirth U, Mair G E, Steinborn R, Enyedy É A, Jakupec M A, Berger W, Keppler B K. Triapine and a more potent dimethyl derivative induce endoplasmic reticulum stress in cancer cells. Molecular Pharmacology 2014;85:451-459.

6. Lama R, Zhang L, Naim J M, Williams J, Zhou A, Su B. Development, validation and pilot screening of an in vitro multi-cellular three-dimensional cancer spheroid assay for anti-cancer drug testing. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013;21:922-931.

7. Seydel G Ş, Aksoy K. Endoplazmik retikulum stresi ve apoptozis mekanizması. Archives Medical Review Journal 2012;21(4):221-235.

8. Janssen K, Horn S, Niemann M T, Daniel P T, Schulze-Osthoff K, Fischer U. Inhibition of the ER Ca2+ pump forces multidrug-resistant cells deficient in Bak and Bax into necrosis. Journal of Cell Science 2009;122:4481-4491.

9. Ebnöter E. Prostat kanseri. 2010.

10. Şentürk A B. Prostat embriyolojisi, fizyolojisi ve anatomisi. 2015 doi: 10.4328/DERMAN.3362.

11. Güneş S, Bağcı H, Sarıkaya Ş. Prostat kanseri genetiği. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi 2003;20(3):152-158.

12. Şahin C. Yetişkin ve çocuk ürolojisi. http://www.profcoskunsahin.com/

13. Aydın S. Türkiye'de üriner sistem kanserlerin görülme sıklığı. Türk Üroloji Dergisi 2007;33(4):392-397.

14. Türkiye kanser istatistikleri. Ankara, 2017.

15. Akınsal E, Sofikerim M. Prostat kanseri ve kemoterapi. Türk Üroloji Seminerleri 2010;1:207-210.

16. Cleveland Clinic. Prostat kanseri tedavi kılavuzu. 2009.

17. Demirkazık A, Özal G. Prostat kanserinde hedefe yönelik tedavinin yeri. Üroonkoloji 2010;2:64-68.

18. Chang S S. Treatment options for hormone-refractory prostate cancer. Reviews in Urology 2007;9(2):13-18.

19. Dirican A, Atmaca H, Bozkurt E, Erten C, Karaca B, Uslu R. Clinical and Translational Oncology 2015;17:145–151.

20. Higgins C F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. Research in Microbiology 2001;152:205–210.

21. Singh S, Chitkara D, Mehrazin R, Behrman S W, Wake R W, Mahato R I. Chemoresistance in prostate cancer cells is regulated by miRNAs and hedgehog pathway. PLoS ONE 2012;7(6): e40021. doi:10.1371/journal.pone.0040021.

22. Hsieh I S, Huang W H, Liou H C, Chuang W J, Yang R S, Fu W M. Upregulation of drug transporter expression by osteopontin in prostate cancer cells. Molecular Pharmacology 2013;83:968–977.

23. Kartal-Yandim M, Adan-Gokbulut A, Baran Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. Critical Reviews in Biotechnology 2015 doi: 10.3109/07388551.2015.1015957.

24. Sobue S, Mizutani N, Aoyama Y, Kawamoto Y, Suzuki M, Nozawa Y, Ichihara M, Murate T. Mechanism of paclitaxel resistance in a human prostate cancer cell line, PC3-PR, and its sensitization by cabazitaxel. Biochemical and Biophysical Research Communications 2016;479:808-813.

25. Dai C L, Tiwari A K, Wu C P, Su X D, Wang S R, Liu D G, Ashby C R Jr, Huang Y, Robey R W, Liang Y J, Chen L M, Shi C J, Ambudkar S V, Chen Z S, Fu L W. Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2. Cancer Research 2008;68(19):7905–7914.

26. Li F, Danquah M, Singh S, Wu H, Mahato R I. Paclitaxel- and lapatinib-loaded lipopolymer micelles overcome multidrug resistance in prostate cancer. Drug Delivery and Translational Research 2011;1:420–428.

27. Collins D M, Crown J, O'Donovan N, Devery A, O'Sullivan F, O'Driscoll L, Clynes M, O'Connor R. Tyrosine kinase inhibitors potentiate the cytotoxicity of MDR-substrate anticancer agents independent of growth factor receptor status in lung cancer cell lines. Investigational New Drugs 2010;28:433–444.

28. Nussbaum R L, McInnes R R, Willard H F. Thompson & Thompson genetics in medicine. 7th ed. Canada: Elsevier, 2007.

29. Weinberg R A. The biology of cancer. Garland Science, 2007.

30. Schelman W R, Meadows S M, Marnocha R, Lee F, Eickhoff J, Huang W, Pomplun M, Jiang Z, Alberti D, Kolesar J M, Ivy P, Wilding G, Traynor A M. A phase I study of triapine® in combination with doxorubicin in patients with advanced solid tumors. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 2009;63(6):1147–1156.

31. Zeidner J F, Karp J E, Blackford A L, Smith B D, Gojo I, Gore S D, Levis M J, Carraway H E, Greer J M, Ivy S P, Pratz K W, McDevitt M A. A phase II trial of sequential ribonucleotide reductase inhibition in aggressive myeloproliferative neoplasms. Haematologica 2014;99(4):672-678.

32. Kunos C A, Radivoyevitch T, Pink J, Chiu S M, Stefan T, Jacobberger J, Kinsella T J. Ribonucleotide reductase inhibition enhances chemoradiosensitivity of human cervical cancers. Radiation Research. 2010;174(5):574–581.

33. Kunos C, Radivoyevitch T, Abdul-Karim F W, Fanning J, Abulafia O, Bonebrake A J Usha L. Ribonucleotide reductase inhibition restores platinum-sensitivity in platinum-resistant ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. Journal of Translational Medicine 2012;10:79.

34. Kunos C A, Ferrisa G, Pyatka N, Pink J, Radivoyevitchc T. Deoxynucleoside salvage facilitates DNA repair during ribonucleotide reductase blockade in human cervical cancers. Radiation Research 2011;176(4):425–433.

35. Kolesar J, Huang W, Eickhoff J, Hahn K, Alberti D, Attia S, Schelman W, Holen K, Traynor A, Ivy P, Wilding G. Evaluation of mRNA by q-RTPCR and protein expression by AQUA of the M2 subunit of ribonucleotide reductase (RRM2) in human tumors. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 2009;64(1):79–86.

36. Lin Z P, Belcourt M F, Cory J G, Sartorelli A C. Stable suppression of the R2 subunit of ribonucleotide reductase by R2-targeted short interference RNA sensitizes p53(-/-) HCT-116 colon cancer cells to DNA-damaging agents and ribonucleotide reductase inhibitors. The Journal of Biological Chemistry 2004;279(26):27030–27038.

37. Ishiguro K, Lin Z P, Penketh P G, Shyam K, Zhu R, Baumann R P, Zhu Y L, Sartorelli A C, Rutherford T J, Ratner E S. Distinct mechanisms of cell-kill by triapine and its terminally dimethylated derivative Dp44mT due to a loss or gain of activity of their copper(II) complexes. Biochemical Pharmacology 2014;91(3):312–322.

38. Aye Y, Long M J C, Stubbe J. Mechanistic studies of semicarbazone triapine targeting human ribonucleotide reductase in vitro and in mammalian cells. The Journal of Biological Chemistry 2012;287(42):35768–35778.

39. Xu Y, Ohms S J, Li Z, Wang Q, Gong G, Hu Y, Mao Z, Shannon M F, Fan J Y. Changes in the expression of miR-381 and miR-495 are inversely associated with the expression of the MDR1 gene and development of multi-drug resistance. PLoS ONE 2013;8(11):e82062. doi:10.1371/journal.pone.0082062.

40. Marcellino T, Srinivasan V. Biophysical methods toolbox to study ABC exporter structure and function. Biological Chemistry 2016; doi:10.1515/hsz-2016-0244.

41. Tuğlu M M, Melli M. İmatinib:Etki mekanizması ve direnç geliştirme mekanizmaları. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2012;65(2): doi: 10.1501/Tıpfak_000000813.

42. Campbell, Reece J B, Urry L A, Cain M L, Wasserman S A, Minorsky P V, Jackson R B. Campbell biyoloji. 9. baskı. Ankara 2015.

43. Pana Q, Sathe A, Black P C, Goebell P J, Kamat A M, Draeger B S, Nawroth R. CDK4/6 inhibitors in cancer therapy: A novel treatement strategy for bladder cancer. Bladder Cancer 2017;3:79–88.

44. Peyressatre M, Prével C, Pellerano M, Morris M C. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: From small molecules to peptide inhibitors. Cancers 2015;7:179-237.

45. Lim S, Philipp Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. Development 2013;140:3079-3093.

46. Palabıyık B. Hücre döngüsü. Hücre biyolojisi ders notları 2011.

47. Schmidt M K, Broek A J V D, Tollenaar R A E M, Smit V T H B M, Westenend P J, Brinkhuis M, Oosterhuis W J W, Wesseling J, Heijnen M L J, Jobsen J J, Jager A, Voogd A C, Leeuwen F E V, Veer L J V. Breast cancer survival of BRCA1/BRCA2 mutation carriers in a hospital-based cohort of young women. Journal of the National Cancer Institute 2017;109(8) doi: 10.1093/jnci/djw329.

48. Cooper G M, Hausman R E. The cell. 4th ed. USA, ASM Press 2007.

49. Vermeulen K, Bockstaele D R V, Berneman Z N. Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. Annals of Hematology 2005;84:627–639.

50. Chen C, Zhang X. IRE1α‐XBP1 pathway promotes melanoma progression by regulating IL‐6/STAT3 signaling. Journal of Translational Medicine 2017;15:42.

51. Kimura K, Yamada T, Matsumoto M, Kido Y, Hosooka T, Asahara S, Matsuda T, Ota T, Watanabe H, Sai Y, Miyamoto K, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Endoplasmic reticulum stress inhibits STAT3-dependent suppression of hepatic gluconeogenesis via dephosphorylation and deacetylation. Diabetes 2012;61:61-73.

52. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. Moleküler biyoloji. Geliştirilmiş 2. baskı. Nobel tıp kitabevi, 2010.

53. Dean D, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Genome Research 2001;11:1156–1166.

54. Luqmani Y A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. Medical Principles Practice 2005;14:35–48.

55. Sancar A, Lindsey-Boltz L A, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annual Review Biochemistry 2004;73:39-85.

56. Saito G, Swansonb J A, Lee K D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. Advanced Drug Delivery Reviews 2003;55:199–215.

57. Radin N S. The development of aggressive cancer: A possible role for sphingolipids. Cancer Investigation 2002;20(5-6):779-786.

58. Alvero A B, Chen W, Sartorelli A C, Schwartz P, Rutherford T, Mor G. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) induces apoptosis in ovarian cancer cells. Journal Society for Gynecol Investigation 2006;13(2):145-152.

59. Finch R A, Liu M C, Grill S P, Rose W C, Loomis R, Vasquez K M, Cheng Y C, Sartorelli A C. Triapine (3-Aminopyridine-2-carboxaldehydethiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. Biochemical Pharmacology 2000;59:983–991.

60. Ratner E S, Zhu Y L, Penketh P G, Berenblum J, Whicker M E, Huang P H, Lee Y, Ishiguro K, Zhu R, Alan C Sartorelli A C, Lin Z P. Triapine potentiates platinum-based combination therapy by disruption of homologous recombination repair. British Journal of Cancer 2016;1–10.

61. Sritharan J, Pahwa M, Demers P A, Harris S A, Cole D C, Parent M E. Prostate cancer in firefighting and police work: A systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. Environmental Health 2017;16(1):124.

62. Goncalves S C, Siqueira R D M, Nogueira M V F, Pereira-Correia J A, Vaz F P, Peres W A F. The relationship between prostate cancer aggressiveness and glycemic levels in patients submitted to radical prostatectomy. World Journal of Oncology 2013;4(2):87-94.

63. Alison M R, Lim S M, Nicholson L J. Cancer stem cells: Problems for therapy. Journal of Pathology 2011;223:147–161.

64. Tang H, Zeng L, Wang J, Zhang X, Ruan Q, Wang J, Cui S, Yang D. Reversal of 5-fluorouracil resistance by EGCG is mediate by inactivation of TFAP2AVEGF signaling pathway and down-regulation of MDR-1 and P-gp expression in gastric cancer. Oncotarget 2017;8(47):82842-82853.

65. Kim J E, Hyun H W, Min S J, Kang T C. Sustained HSP25 expression induces clasmatodendrosis via ER stress in the rat hippocampus. Frontiers in Cellular Neuroscience 2017;11:47.

66. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding H P, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science 2000;287(5453):664-666.

67. Dai L, Lin Z, Qiao J, Chen Y, Flemington E K, Zhiqiang Qin Z. Ribonucleotide reductase represents a novel therapeutic target in primary effusion lymphoma. Oncogene 2017;36(35):5068–5074.

68. Le N T V, Richardson D R. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. Biochimica et Biophysica Acta 2002;1603:31– 46.

69. Chaston T B, Lovejoy D B, Watts R N, Richardson D R. Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: Multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 3111. Clinical Cancer Research 2003;9:402-414.

70. Mannargudi M B, Deb S. Clinical pharmacology and clinical trials of ribonucleotide reductase inhibitors: Is it a viable cancer therapy. Journal of Cancer Research Clinical Oncology 2017;143:1499–1529.

71. Xu Y, Asghar S, Gao S, Chen Z, Huang L, Yin L, Ping Q, Xiao Y. Polysaccharide-based nanoparticles for co-loading mitoxantrone and verapamil to overcome multidrug resistance in breast tumor. International Journal of Nanomedicine 2017;12:7337–7350.

72. Zaloga J, Feoktystov A, Garamus V M, Karawacka W, Ioffe A, Brückel T, Tietze R, Alexiou C, Lyer S. Studies on the adsorption and desorption of mitoxantrone to lauric acid/albumin coated iron oxide nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 161 2018;161:18–26.

73. Pawlik A, Szczepanski M A, Klimaszewska-Wisniewska A, Gackowska L, Zuryn A, Grzanka A. Cytoskeletal reorganization and cell death in mitoxantrone-treated lung cancer cells. Acta Histochemica 2016;118:784–796.

74. Baek N, Seo O W, Kim M, Hulme J, An S S. Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time. Onco Targets and Therapy 2016;9:7207-7218.

75. Takagi A, Watanabe M, Ishii Y, Morita J, Hirokawa Y, Matsuzaki T, Shiraishi T. Three-dimensional cellular spheroid formation provides human prostate tumor cells with tissue-like features. Anticancer Research 2007;27:45-53.

76. Boucher P D, Im M M, Freytag S O, Shewach D S. A novel mechanism of synergistic cytotoxicity with 5-fluorocytosine and ganciclovir in double suicide gene therapy. Cancer Research 2006;66(6):3230-3237.

77. Rodrigue C M, Arous N, Bachir D, Smith-Ravin J, Romeo P H, Galacteros F, Garel M C. Resveratrol, a natural dietary phytoalexin, possesses similarproperties to hydroxyurea towards erythroid differentiation. British Journal of Haematology 2001;113(2):500-507.

78. Lin Y J, Peng S F, Lin M L, Kuo C L, Lu K W, Liao C L, Ma Y S, Chueh F S, Liu K C, Yu F S, Chung J G. Tetrandrine induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 076 cells through reactive oxygen species accompanied by an endoplasmic reticulum stress signaling pathway. Molecules. 2016;21:1353.

79. Guo H, Lin W, Zhang X, Zhang X, Hu Z, Li L, Duan Z, Zhang J, Ren F. Kaempferol induces hepatocellular carcinoma cell death via endoplasmic reticulum stress-CHOP-autophagy signaling pathway. Oncotarget 2017;8(47):82207-82216.

80. Gerakis Y, Hetz C. Emerging roles of ER stress in the aetiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. FEBS Journal 2017. doi: 10.1111/febs.14332.

81. Guissi N E, Li H, Xu Y, Semcheddine F, Chen M, Su Z, Ping Q. Mitoxantrone- and Folate-TPGS2k conjugate hybrid micellar aggregates to circumvent toxicity and enhance efficiency for breast cancer therapy. Molecular Pharmacology 2017;14(4):1082-1094.

82. Li Y, Guo Y, Tang J, Jiang J, Chen Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. Acta Biochimica et Biophys Sinica 2014;46(8):629-640.

83. Osowski A, Kasparek A, Wieczorek Z, Amarowicz R, Szabelski M. Evaluation of the characteristics of some plant polyphenols as molecules intercepting mitoxantrone. Food Chemistry 2017;227:142–148.

84. Pawlak A, Ziolo E, Fiedorowicz A, Fidyt K, Strzadala L, Kalas W. Long-lasting reduction in clonogenic potential of colorectal cancer cells by sequential treatments with 5- azanucleosides and topoisomerase inhibitors. BMC Cancer 2016;16(1):893.

85. Lu L Y, Kuang H, Korakavi G, Yu X. Topoisomerase II regulates the maintenance of DNA methylation. The Journal of Biological Chemistry 2015;290(2):851-860.

86. Vijayaraghavalu S, Dermawan J K, Cheriyath V, Labhasetwar V. Highly synergistic effect of sequential treatment with epigenetic and anticancer drugs to overcome drug resistance in breast cancer cells is mediated via activation of p21 gene expression leading to G2/M cycle arrest. Molecular Pharmacology 2013;10(1):337–352.

87. Duan Z, Lamendola D E, Duan Y, Yusuf R Z, Seiden M V. Description of paclitaxel resistance-associated genes in ovarian and breast cancer cell lines. Cancer Chemotherapy Pharmacology 2005;55:277–285.

88. Dai L, Trillo-Tinoco J, Cao Y, Bonstaff K, Doyle L, Del Valle L, Whitby D, Parsons C, Reiss K, Zabaleta J, Qin Z. Targeting HGF/c-MET induces cell cycle arrest, DNA damage, and apoptosis for primary effusion lymphoma. Blood 2015;126(26):2821-2831.

89. Dragomir A, Rocha J, Vanhuyse M, Cury F L, Kassouf W, Hu J, Aprikian A G. Treatment patterns and trends in patients dying of prostate cancer in Quebec: A population-based study. Current Oncology 2017;24(4):240-248.

90. Kirby M, Hirst C, Crawford E D. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: A systematic review. International Journal of Clinical Practice 2011;65(11):1180-1192.

91. Cánovas V, Puñal Y, Maggio V, Redondo E, Marín M, Mellado B, Olivan M, Lleonart M, Planas J, Morote J, Paciucci R. Prostate tumor overexpressed-1 (PTOV1) promotes docetaxelresistance and survival of castration resistant prostate cancer cells. Oncotarget 2017;8,35:59165-59180.

92. Rodriguez D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat. Biochimica et Biophysica Acta 2011;1813,564–574.

93. Lamoureux F, Thomas C, Yin M J, Fazli L, Zoubeidi A, Gleave M E. Suppression of heat shock protein 27 using OGX-427 induces endoplasmic reticulum stress and potentiates heat shock protein 90 inhibitors to delay castrate-resistant prostate cancer. European Urology 2014;66(1):145-155.

94. Cabrespine A, Bay J O, Barthomeuf C, Curé H, Chollet P, Debiton E. In vitro assessment of cytotoxic agent combinations for hormone-refractory prostate cancer treatment. Anticancer Drugs 2005;16(4):417-422.

95. Zhang J, Yi M, Zha L, Chen S, Li Z, Li C, Gong M, Deng H, Chu X, Chen J, Zhang Z, Mao L, Sun S. Sodium butyrate induces endoplasmic reticulum stress and autophagy in colorectal cells: Implications for apoptosis. PLoS One. 2016;11(1):e0147218.

96. Li X, Lao Y, Zhang H, Wang X, Tan H, Lin Z, Xu H. The natural compound guttiferone F sensitizes prostate cancer to starvation induced apoptosis via calcium and JNK elevation. BMC Cancer 2015;15:254.

97. Postiglione I, Barra F, Aloj S M, Palumbo G. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid and DNA damage: Unravelling roles of p53 and ABCG2. Cell Proliferation 2016;49(4):523-538.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Tümör oluşumu sonrası prostat dokusunun karşılaştırılması ..4
Şekil 2: Erkeklerde en sık karşılaşılan kanserler ..5
Şekil 3: Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık karşılaşılan bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları ..5
Şekil 4: ABC taşıyıcı proteinlerinin şematik yapısı ..8
Şekil 5: İlaç direnci oluşumunda etkin olarak rol alan başlıca mekanizmalar ..9
Şekil 6: UPR sinyal yolağının şematik olarak gösterimi 13
Şekil 7: Ribonükleotid redüktaz enziminin görevli ve ilişkili olduğu yolakların şematik olarak gösterimi 16
Şekil 8: Hücre döngüsünde interfaz (G1-S-G2) ve mitotik (M) evrenin şematik olarak gösterimi 17
Şekil 9: İçsel ve dışsal apoptoz yolaklarında kaspaz aktivasyonunun şematik olarak gösterimi 19
Şekil 10: TNFα ve NF-κB ilişkisinin şematik gösterimi 23
Şekil 11: PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında farklı derişimlerdeki (0-100 nM) dosetaksel uygulamasının hücre sağkalımı üzerine etkisi 40
Şekil 12: PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında farklı derişimlerdeki (0-100 nM) dosetaksel uygulamasının hücre sağkalımı üzerine olan etkisinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi .. 42
Şekil 13: PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında ilaç direnci genlerinin ifade oranları 42

Şekil 14: PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında ilaç direnci proteinlerinden ABCG2 seviyesindeki değişim 43
Şekil 15: PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında farklı derişimlerdeki (0-100 μM) 72 saat sürede 3-AP uygulamasının hücre sağkalımı üzerine etkisi 44
Şekil 16: DR-PC3 hücre hattında 3-AP uygulamasının endoplazmik retikulum stresi ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine etkisi 45
Şekil 17: PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP uygulamasının apoptotik hücre oranı üzerine etkisi 46
Şekil 18: DR-PC3 hücre hatında 3-AP uygulamasının antiapoptotik genlerin ifadesi üzerine etkisi 47
Şekil 19: DR-PC3 hücre hatında 3-AP uygulamasının apoptozla ilişkili genlerin ifadesi üzerine etkisi 47
Şekil 20: DR-PC3 hücre hatında 3-AP uygulamasının ısı şoku proteinlerini (heat shock protein, HSP) sentezleyen genlerin ifadesi üzerine etkisi 48
Şekil 21: PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisi 49
Şekil 22: DR-PC3 hücre hattında 3-AP uygulamasının hücre döngüsü ile ilgili olan genlerin ifadesi üzerine etkisi 50
Şekil 23: DR-PC3 hücre hattında 3-AP uygulamasının hücre döngüsünün durdurulmasında görevli olan genlerin ifadesi üzerine etkisi 50
Şekil 24: Üç boyutlu hücre kültüründe PC3/DR-PC3 hücrelerinde dosetaksel (Doc) direncinin gösterilmesi ve 3-AP uygulamasının sferoid büyüklüğüne etkisi 51
Şekil 25: Üç boyutlu hücre kültüründe PC3/DR-PC3 hücrelerinde dosetaksel direncinin gösterilmesi ve 3-AP uygulamasının sferoid çapı üzerine etkisi 52
Şekil 26: PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP uygulamasının protein düzeyi üzerine etkisi 53
Şekil 27: PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında farklı derişimlerdeki (0-10 μM) MTX uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi 55
Şekil 28: PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında 3-AP/MTX uygulamasının apoptotik hücre oranı üzerine etkisi 57
Şekil 29: DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının antiapoptotik genlerin ifadesi üzerine etkisi 58

Şekil 30: DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının apoptozla ilişkili genlerin ifadesi üzerine etkisi 59
Şekil 31: DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının apoptozla ilişkili *TNFA*, *FAS* ve *FASL* genleri ile *RNRM1* geninin ifadesi üzerine etkisi 60
Şekil 32: DR-PC3 hücre hatında 3-AP/MTX uygulamasının HSP sentezleyen genlerin ifadesi üzerine etkisi 61
Şekil 33: PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücre hatlarında 3-AP/MTX uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisi 62
Şekil 34: DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının hücre döngüsünün yürütülmesinde görevli olan genlerin ifadesi üzerine etkisi 63
Şekil 35: DR-PC3 hücre hattında 3-AP/MTX uygulamasının hücre döngüsünün durdurulmasında görevli olan genlerin ifadesi üzerine etkisi 64
Şekil 36: Üç boyutlu hücre kültüründe PC3 (A) ve DR-PC3 (B) hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının sferoid büyüklüğüne etkisi 65
Şekil 37: Üç boyutlu hücre kültüründe PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının sferoid çapı üzerine etkisi 66
Şekil 38: PC3 ve DR-PC3 hücre hatlarında 3-AP/MTX uygulamasının JNK, NF-κB, IRE1a, ABCG2-60, ABCG2-70 ve B-aktin (β actin) proteinlerinin düzeyi üzerine etkisinin analiz edildiği protein bant profilleri 68
Şekil 39: PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının protein düzeyine etkisi. NF-κB-p105, NF-κB-p50, ABCG2-p70, ABCG2-p60, IRE1a ve JNK 69
Şekil 40: PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının hücre göçü üzerine etkisi 70
Şekil 41: DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının hücre göçü üzerine etkisi 70
Şekil 42: PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının hücre göçü üzerine etkisi 71
Şekil 43: DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının hücre göçü üzerine etkisi 71
Şekil 44: PC3 ve DR-PC3 hücrelerinde 3-AP/MTX uygulamasının apoptotik hücre oluşumuna etkisinin hoescht boyaması ile tespiti 72

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: İlaç direncinde belirteç olarak kullanılmakta olan proteinler..... 8
Tablo 2: RT-qPCR analizinde araştırılan genler..... 31

ÖZGEÇMİŞ

1.Adı Soyadı : Rıza SERTTAŞ

2.İletişim Bilgileri

Telefon : 0531 244 71 57

Mail : rizaserttas_1453@hotmail.com

3. Doğum Tarihi : 04.03.1990

4. Unvanı : Moleküler Biyolog

5. Öğrenim Durumu :

Lise			**Yıl**
Kocaeli Körfez Fen Lisesi			2005-2009
Üniversite	**Derece**	**Bölüm**	**Yıl**
İstanbul Üniversitesi	Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	2009-2013
Trakya Üniversitesi	Yüksek Lisans	Tıbbi Biyoloji	2015-

6. Yayınlar

6.1. SCI-SSCI veya SCI Expanded Kapsamındaki Yayınları

Erdogan, S., Doganlar, ZB, Doganlar O., Turkekul, K., **Serttas, R**. Inhibition of Midkine Suppresses Prostate Cancer CD133 + Stem Cell Growth and Migration. The American Journal of the Medical Sciences. http://dx.doi.org/10.1016/j.amjms.2017.04.019 (Nisan 2017)

Erdogan, S. Turkekul, K., **Serttas, R**., Erdogan, Z. The natural flavonoid apigenin sensitizes human CD44+ prostate cancer stem cells to cisplatin therapy. Biomedicine & Pharmacotherapy. 88, 210-217. (Ocak 2017)

Erdogan, S., Doganlar O., Doganlar, ZB, **Serttas, R**., Turkekul, K., Dibirdik, I., Bilir, A. The flavonoid apigenin reduces prostate cancer CD44+ stem cell survival and migration through PI3K/Akt/NF-κB signaling, Life Sciences. 162, 77-86. (Ağustos 2016)

6.2. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Serttas R, Erdogan S (2017) Triapine Induces Apoptosis of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells Through Endoplasmic Reticulum Stress. Istanbul University Congress and Culture Center, Istanbul, Turkey on May 22-25, 2017., Conference: VI. International Congress Of Molecular Medicine (Mayıs 2017)

Erdogan, S., Turkekul, K., **Serttas, R**., Doganlar O., Doganlar, ZB, Dibirdik, I., Bilir, A (2017) Inhibition of Growth Factor Midkine by siRNA Enhances The Effects of Quercetin on CD133+/44+ Prostate Cancer Stem Cells. Conference: VI. International Congress Of Molecular Medicine (Mayıs 2017)

Erdogan, S., Doganlar O., Doganlar, ZB, **Serttas, R**., Turkekul, K., Dibirdik, I., Bilir, A. The flavonoid apigenin reduces survival and migration of CD44+ prostate cancer stem cells. FEBS J, 283: P-05.03.3-006. doi:10.1111/febs.13806, 2016. (Eylül 2016)

6.3. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Ferulik asidin insan meme ve prostat kanseri hücrelerinde oksidatif stres ilişkili apoptotik ve antikanserojen etkileri (Ekim 2015)

Kan Dokusunda Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Potansiyel Karsinojen Etkisi (Nisan 2015)

7. Projeler

Gebelikte Endotel Disfonksiyonuna Bağlı Genetik Komplikasyonlar (Lisans Bitirme Tezi Projesi-Teorik) Haziran-2013, Danışman: Doç. Dr. Tuba GÜNEL

Sharpin Gen Modülasyonunun Prostat Kanser Kök Hücre Kemoterapisindekli Rolü. TÜBAP 2015-65 (Temmuz 2016)

354-UYGULAMALI KANSER BİYOLOJİSİ DERSİ ÖĞRENCİ LABORATUVAR BECERİSİNİN GELİŞTİRİLMESİ (Aralık 2015)

TÜBİTAK 115S356

İlaç Dirençli Prostat Kanser Hücrelerinde Endoplazmik Retikulum Stres Aracılı İlaç Duyarlılığının Artırılması. TÜBAP/2016-04