



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**PROSTAT KANSER KÖK HÜCRELERİNDE ZOLEDRONİK ASİTİN
RAB23 GTPAZ VE SONİC-HEDGEHOG YOLAK AKTİVASYONU
ÜZERİNDE ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Günel MUKHTAROVA

Kök Hücre Anabilim Dalı Adı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**PROSTAT KANSER KÖK HÜCRELERİNDE
ZOLEDRONİK ASİTİN RAB23 GTPAZ VE SONİC-
HEDGEHOG YOLAK AKTİVASYONU ÜZERİNDE
ETKİSİ**

Günel MUKHTAROVA

Danışman
Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM

Kök Hücre Anabilim Dalı Adı
Tezli Yüksek Lisans

İzmir
2019

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.Gülperi ÖKTEM

(Danışman)



Üye : Doç.Dr. Çığır Biray Avcı



Üye : Prof.Dr. Seninç İnan



Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 23.10.2019.

Önsöz

Prostat kanseri, yeni tanı ve klinik gelişmelere rağmen hastaların %20' de tedavi başarısızlığı nedeni ile ölümlerle sonuçlanmaktadır. Zoledronik asit, prostat kanserinde kemik metastazı ve kemik-ilişkili komplikasyonları önlemek için kullanılsa da sağkalım üzerinde iyileşme etkisi gösteremeyen, bu açıdan direnç gelişimi sonucunda başarısız olan en güçlü yeni nesil bifosfonatlardan biridir. Kanser kök hücreleri, az sayıda hücreden oluşan, normal doku kök hücrelerine benzer özelliklere sahip, geleneksel tedavideki başarısızlıkların tümünden (metastaz, invazyon, ilaç direnci) sorumlu olduğu ileri sürülen hücrelerdir. Bu hücrelerin sağkalımını, proliferasyonu ve kök hücre özelliğinin devamlılığını sağlayan önemli yollardan biri olan SHH yolağının farklı kanser türlerinde çeşitli ilaçlara karşı direnç gelişimini tetiklediği bilinmektedir. Bu çalışmada tüm bu bilgiler bir araya getirilerek Zoledronik asit ile müamile sonrasında SHH yolak aktivasyonundaki olası değişiklikleri araştırmak amaçlandı. 3 boyutlu hücre kültür sistemi kullanılarak verilerin preklinik güvenilirlik değerinin artırılması hedeflendi. Çalışma sonucunda bilimsel açıdan değerli veriler elde edildi, bu veriler daha ileri yapısal ve fonksiyonel çalışmalara yol açtı. Çalışmanın bu kadarı ile sınırlı kalmayacağını, daha sonra yapılacak çalışmalarla elde edilen verilerin daha detaylı şekilde inceleneceğini umuyorum

İzmir, 22.01.2020

Günel MUKHTAROVA

Özet

Prostat Kanseri Kök Hücrelerinde Zoledronik Asit Rab23 GTPaz ve Sonic-Hedgehog Yolak Aktivasyonu Üzerinde Etkisi

Prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra ölümlü ilişkili ikinci kanser tipidir. Kanseri Kök Hücre (KKH) tümör yapısı içinde çok az sayıda hücreden oluşan, kök hücre gibi sonsuz sayıda bölünebilen ve sessiz kalabilen hücre gurubudur. KKH'i tümörün çoğalmasından, geleneksel tedavilere dirençten, invazyondan ve hatta metastazdan sorumlu tutulmaktadır. KKH'de SHH, Wnt, Notch ve BMP yolları gibi çok yönlü sinyal yollarının düzenlenmesindeki bozukluklar kanser oluşumu ve yayılması ile ilişkili bulunmaktadır. SHH sinyali bazal/kök hücrelerin KKH'e transformasyonunda yer almakta ve KKH devamlılığı, sağ kalımını düzenlemektedir. Sağlıklı dokularda Rab23 GTPaz, SuFu-bağımlı şekilde SHH yolağı aktivasyonunu negative şekilde düzenler. Çalışmamızın amacı zoledronik asit uygulanan insan prostat KKH'de Rab GTPaz ve SHH yolağı bileşenleri genlerinin ekspresyon seviyesini araştırmaktır. İnsan prostat kanser hücreleri FACS Aria flow sitometri kullanılarak sort edilmiş, prostat kanser kök hücreleri CD 133^{high}/ CD44^{high} olacak şekilde ayrıştırılmıştır. Zoledronik asit uygulanarak deney gruplarında IC50 değerleri bulunmuştur. Zoledronik asit uygulanan deney gruplarında Rab23 GTP' az ve SHH yolağı bileşenlerinin ekspresyon profilinin incelenmesi için RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) kullanılarak total mRNA izole edilmiş, cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Rab GTP'azların ekspresyonu LightCycler® 480 real-time PCR kullanılarak analiz edilmiştir. Saptanan sonuçlar zoledronik uygulanan insan prostat KKH ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmalı şekilde incelenmiştir. Bu çalışma, Zoledronik asit etkisinin Rab23 GTPaz ve SHH yolağı bileşenleri ve dolayısı ile de KKH özellikleri üzerinde etkisinin saptanması yönünde ilk olabilmeye özelliğine sahip çalışmadır.

Anahtar Kelimeler; prostat kanseri, kanser kök hücre (KKH), zoledronik asit, Sonic Hedgehog yolağı, Rab23 GTPaz

Abstract

Effect of Zoledronic acid on the Rab23 GTP ase and Sonic Hedgehog Pathway In Prostate Cancer Stem Cell

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancers among cancer-related death after lung cancer in men. The cancer stem cell is a group of cells that they exist slightly in neoplastic tissue and ability proliferation endless by itself and keeping silent such as stem cell. It is thinking that these cells are responsible for cancer proliferation, resistance to the conventional treatments, invasion ve also metastasis. The deregulation of the multiple signalling pathways in the stem cells including the Hh, Wnt, Notch and BMP pathways have been related to the formation and expansion of cancer. SHH signalling plays a role in the transformation of prostate basal/stem cells into prostate cancer stem cells (PCSCs) and regulates maintenance and survival of cancer stem cells. Rab23 GTPase negatively regulated the SHH signal pathway in a Sufu-dependent–manner in the healthy tissues. The human prostate cancer cells (Du145 and PC3) were sorted using a FACS Aria flow cytometer. Prostate cancer stem cells were sorted to be CD 133^{high}/ CD44^{high} population. IC₅₀ values were found in experimental groups by applying zoledronic acid. To investigate the expression profile of Rab23 GTP and SHH pathway components in the experimental groups treated with zoledronic acid total RNA was extracted using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) and this was followed by cDNA synthesis and expression were analyses by LightCycler® 480 real-time PCR. On the results, the expression profile of The results was compared between zoledronic administered human prostate CSCs and control groups. This study has been the first to characterize the effect of Zoledronic acid on the ability of Rab23 GTPase and SHH pathway components and consequently on CSCs properties.

Keywords; prostate cancer, cancer stem cell, zoledronic acid, Sonic Hedgehog pathway, Rab23 GTPase.

İçindekiler

Önsöz.....	1
Özet.....	3
Abstract.....	4
İçindekiler	5
Tablolar Dizini.....	7
Şekiller Dizini	8
Grafikler Dizini	9
Kısaltma Listesi	10
Giriş	11
1.1. Araştırmanın Problemi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
1.2. Araştırmanın Sorusu	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
1.6. Araştırmanın Amacı	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Genel Bilgiler	119
Gereç ve Yöntem	18
3.1. Prostat Kansere Hücre Hattı, Hücre Kültürü ve Reaktifler.....	18
3.2. CD133+ Ve CD44+ prostat KKH 'lerin İzolasyonu.....	18
3.3 Kürecik (Sferoid) Oluşturma Testi.....	19
3.5. Sitotoksikite Deneyi.....	19
Hücrelerin ZOL'e karşı apoptotik yanıtının incelenmesi.....	19
3.6. Rab23 GTPaz ve SHH yolak genlerinin PCR array analizi.....	19
3.7. İmmunofloresan Boyama.....	20
Bulgular.....	21
4.1. Du145 ve PC3 prostat KKH 'lerinin elde edilmesi.....	21

4.2. DU145 ve PC3 KKH'lerinin 3D ortamında kürecik oluşturma yetenekleri.	21
4.3. Hücre sayısı ve canlılığının belirlenmesi; IC50 değeri.....	22
4.3. Hücrelerin ZOL'a karşı apoptotic yanıtı.....	25
4.4. ZOL etkisi ile prostat KKH'leri küreciklerinde kantitatif değişiklikler.....	26
4.5. mRNA Ekspresyon Analizi, RT-PCR Bulguları.....	26
4.5. İmmunoflerasan Boyama.....	28
Tartışma	32
Sonuç ve Öneriler.....	340
Kaynaklar	39
Teşekkür	43
Özgeçmiş	44

Tablolar Dizini

4.1. Tablo 4.1. ZOL etkisi ile değişmiş mRNA ekspresyonları.....	27
--	----



Şekiller Dizini

Şekil	Sayfa
2.1 Mevolanat yolağı, etkili inhibitörler, inhibe ettiği enzimler.....	4
4.1. Du145 (A.) ve PC3 (B.) insan prostat kanser kök hücrelerinin izolasyonu...	8
4.2. DU-145 KKH ve PC-3 KKH' lerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri....	20
4.3. PC3 non- KKH'de ZOL uygulaması ve hücre canlılığının belirlenmesi.....	21
4.3. PC3 KKH'de ZOL uygulaması ve hücre canlılığının belirlenmesi.....	23
4.4. PC3 KKH (A) ve PC3 non-KKH (B) hücrelerin apoptotik yanıtları.....	24
4.5. (A-D) DU145 ve (E-H) PC3 KKH küreciklerinde 72 saat sonra gözlenen kantitatif değişimler (scale bar 100µm).....	25
4.6. ZOL etkisi ile değişmiş mRNA ekspresyonları.....	27
4.6. Rab23, SMO, SHH, PTCH1 protein ifade değişikliklerinin analizi.....	29-31

Grafikler Dizini

Şekil tablosu ögesi bulunamadı.



Kısaltma Listesi

°C	Santigrat
cm	Santimetre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
PKKH	prostat kanser kök hücre
PKH	prostat kök hücre
2D	2 dimential
3D	3 dimential
ZOL	Zoledronik asit
KKH	Kanser kök hücre
non – KKH	Kanser kök hücreler dışında kalan hücreler
KM	Kemik metastazı
CO ₂	kardon dioksit
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür
ddH ₂ O	Bidistile Saf Su
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute
DMEM-F12	Dulbecco's Modification of Eagles Medium F12
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
AR	Androgen reseptörü
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponlu
Pen-Strep	Penisilin-Streptomisin
PTCH1	Patched
SMO	Smoothened
GLI	Gli ailesi çinko parmak protein (Glioma-associated oncogene (Gli) family of latent zinc-finger transcriptional mediators)
Rab GTP' ases	Ras-related proteins in brain23

Giriş

1.1. Araştırmanın Problemleri.

Radyoterapiye, kemoterapiye veya ADT'ye (androjen yoksunluğu tedavisi) başlangıçta iyi yanıt vermesine rağmen, tedaviye direnç kazanma ve ardından hastalığın ve metastazın ilerlemesini hemen hemen tüm prostat kanser (PCa) hastalarında görülür. Bu nedenle, prostat kanseri en yaygın kanserdir ve erkeklerde kansere bağlı ikinci malignite olarak kalmaktadır (Merseburger, A.S., vd., 2013; Hammerer, P., vd., 2012; Clarke, N.W. 2012).

Zoledronik asit (ZOL), PCa hastalarında hastalıkla ilişkili iskelet komplikasyonlarını önleyen en yaygın kullanılan bifosfonattır. Fakat, ZOL tedavisinin sağkalım üzerindeki iyileştirici ve metastatik progresyon, kansere bağlı ölüm üzerindeki önleyici etkisinin PCa hastalarında yetersiz olduğu bulunmuştur (Heymann MF, vd., 2016; James ND vd., 2016; Vale CL, vd. al., 2016).

1.2. Araştırmanın Sorusu

Güncel terapötik yaklaşımların yetersizliğinin ana nedenlerinden birinin, kanseri kök hücreleri (KKH) tarafından geliştirilen ilaç direnci olduğu öne sürülmüştür (Bao S., vd., 2006). Araştırmamızda prostat KKH' leri ZOL tedavisine nasıl yanıt oluşturduğuna ve gelişenolası dirençte KKH-ilişkili SHH yolağının ve bu yolağın negatif düzenleyicisi olarak bilinen Rab23 GTP'azın olası rolüne dair sorulara cevap aradık.

1.3. Araştırmanın Hipotezi

Prostat KKH' leri (PKKH), normal prostat kök hücreleri (PKH) ile SHH, Wnt, Notch ve BMP gibi KKH' lerle ilişkili yolakları, ortak fenotipik ve fonksiyonel özellikleri paylaşan prostat kanser hücre popülasyonu içerisinde bir alt kümeni oluşturur (Chen, X., vd., 2013; Di Zazzo, E.), 2015). Önemli embriyonik sinyal yolağı olan Sonic Hedgehog (SHH) yolak aktivasyonunun postnatal dönemde önemli ölçüde azalmasına karşın, artmış aktivasyonunun normal prostat bazal/kök hücrelerin PKKH' lere dönüşmesinde etkili rol oynayan KKH ilişkili yollardan biri olduğu gösterilmiştir. SHH yolağı, ABC taşıyıcı proteinlerinin yanı sıra Epitelial

Mezenkimal Transition (geçiş) (EMT) ve kök hücre özelliklerinin devamlılığı için önemli olan Nanog, Oct4, Sox2 ve c-Myc gibi hedef genlerin GLI-1 aracılı transkripsiyonunu arttırarak prostat KKH' lerin sonsuz sayıda çoğalma, sağkalım, invazivlik, kendi kendini yenileme kapasitesinin düzenler ve KKH-ilişkili çoklu ilaç direnci, invazivlik ve metastaz gelişmesini sağlar (Han L. ve ark., 2013; Nanta R. ve ark., 2013). SHH yolunu hedef alan klinik çalışmaların geliştirilmesi, çoklu ilaç direncinin azaltılması ve PKKH' lerin ortadan kaldırılmasıyla tümör büyümesinin inhibe edilmesi gibi daha etkili bir tedaviye yol açabilir. Bu açıdan SHH yolak düzenleyicileri büyük önem taşımaktalar.

Küçük Rab GTPaz (small Rab GTPases) alt ailesinin önemli üyesi Rab23 GTPaz, sağlıklı dokularda plazma zarı ve endositik yolakta lokalize olup SHH yolağını SuFu'ya bağımlı şekilde negatif olarak düzenler (T.M. Evans ve ark., 2003; T. Nozawa ve ark., 2012). ZOL, küçük GTP proteinlerinin (Ras, Rho ve Rab, Rab-Like familyası) membran lokalizasyonunu ve post-translasyonel prenilasyonu veya geranilasyonu düzenleyen FPP sentazı inhibe ederek membran lokalizasyonu ve işlevini etkiler. tüm bu bilgilerden yolaçarak, Zoladronik asit tedavisi sonrasında Rab23 GTP'az ifade ve işlevini etkilenmesi ve SHH yolak aktivasyonun artması sonucunda KKH' lerde ZOL' a karşı direnç geliştiği hipotezini ileri sürdük.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

SHH yolak aktivasyonu üzerinde etkisi daha önceden bilinen belirli inhibitör kullanılarak SHH yolak bileşenlerinin ifadesinin ölçülmesinden elde edilen verilerin uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen verilerle karşılaştırılması ek maliyet gerektirmektedir. Bu nedenle, ZOL'un SHH yolak aktivasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için bu konuda literatürde bulunan çalışmalara uygun olarak, RT-PCR ve İmunofloresan boyama yöntemleri kullanılarak SHH yolak bileşenlerinin gen ve protein ifadeleri araştırılmış, elde edilen veriler deney ve uygulama gruplarında karşılaştırılmalı şekilde incelenmiştir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışma, PKKH'de ZOL'un Rab23 GTP'az ve SHH yolak üzerindeki olası etkisine dair yapılan ilk araştırmadır. Ayrıca 3D hücre kültür sistemi *in vivo* ortama en yakın *in vitro* ortam olarak kabul edildiğinden, çalışmamızda hem 2D, hem de 3D kültür sistemi kullanılarak elde edilen veriler güvenilir prelinik veriler özelliğine

sahiptir. Fakat, sınırlı bütçe nedeni ile çalışmamız gen ve protein ifade değişikliklerinin araştırılması ile sınırlandırılmıştır ve bu konuda CRISPR/cas9 yöntemi gibi güncel ve güvenilir yöntemler kullanılarak daha detaylı fonksiyonel çalışmaların yapılması gerekmektedir.

1.6. Araştırmanın Amacı

Çalışmamızda, PKKH'lerinde Zoledronik asit uygulamasına direnç gelişimine aydınlık getirmek için ZOL' un 2D ve 3D hücre kültür sisteminde üretilmiş PKKH'de SHH yolağı ve Rab23 GTP'az üzerindeki etkisini araştırmağı amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için beyin ve kemik metaztazı kökenli prostat kanser hücrelerinden (sırasıyla PC3 ve DU145) Flow sitometri yöntemi ile PKKH'leri izole edildi, PKKH'leri izolasyon sonrası 2D ve 3D kültür sistemlerinde üretilerek tektabakalı (monolayer) ve küre (sferoid) şekilli PKKH oluşturuldu. Tektabakalı ve sferoid PKKH'leri ve KKH olmayan grupta (bulk population) ZOL uygulaması yapılarak IC50 değerleri elde edildi. SHH yolak bileşenleri ve Rab23 GTP'az gen ve protein ifadeleri araştırıldı. SHH yolağının ve Rab23 GTP'azın PKKH' de ZOL' a karşı gelişen dirençteki rolüne açıklık getirmek için, PKKH ve prostat non-KKH'ler için bulunan IC50 değerleri uygulama sonrasında SHH yolak bileşenleri ve Rab23 GTP'az ifadesindeki değişikliklerle karşılaştırmalı şekilde incelendi

Genel Bilgiler

Geleneksel kemo- ve radyoterapiye direnç, metastaz, kanser nüksü sıkı şekilde kanser kök hücreleri (KKH) ile ilişkili bulunmaktadır. KKH tümör dokusunda az sayıda bulunan ve kök hücreler gibi sessiz kalan, yavaş çoğalan, geleneksel kemo- ve radyoterapiye direnç sağlayan ve kanser kök hücre belirteçlerini eksprese eden hücre grubudur. Artmakta olan kanıtlar kanserin anormal oluşumu ve genişlenmesinin KKH'de SHH, Wnt, Notch ve BMP yolları gibi çok tipli sinyal yollarının deregulasyonu sayesinde olduğunu göstermektedir. SHH sinyali bazal/kök hücrelerin KKH'e transformasyonunda yer almakta olduğu ve KKH devamlılığı, sağ kalımını düzenlediği bilinmektedir (Taipale ve Beachy, 2001; Zhang ve Kalderon, 2001; Rubin ve de Sauvage, 2006;). Ayrıca SHH yolağının KKH'de ilaca direnç ile ilişkili olduğu ve SHH yolağının hedef genleri arasında hücre döngüsü düzenleyicileri (örn., CYCLIN D1/2, N-MYC), anti-apoptotik moleküller (örn., BCL2), angiogenik moleküller (örn., VEGF, ANG1-2), epithelial-mezenşimal geçit (EMT) düzenleyicileri (örn., SNAIL, MMP9), hücre kaderinin belirlenmesi ve kendini yenileme ile ilişkili moleküller (örn., NANOG, OCT4, SOX2), diğer gelişim sinyal yollarının efektörlerinin (örn., Wnt) olduğu kanıtlanmıştır (Stecca, B. ve ark., 2010;).

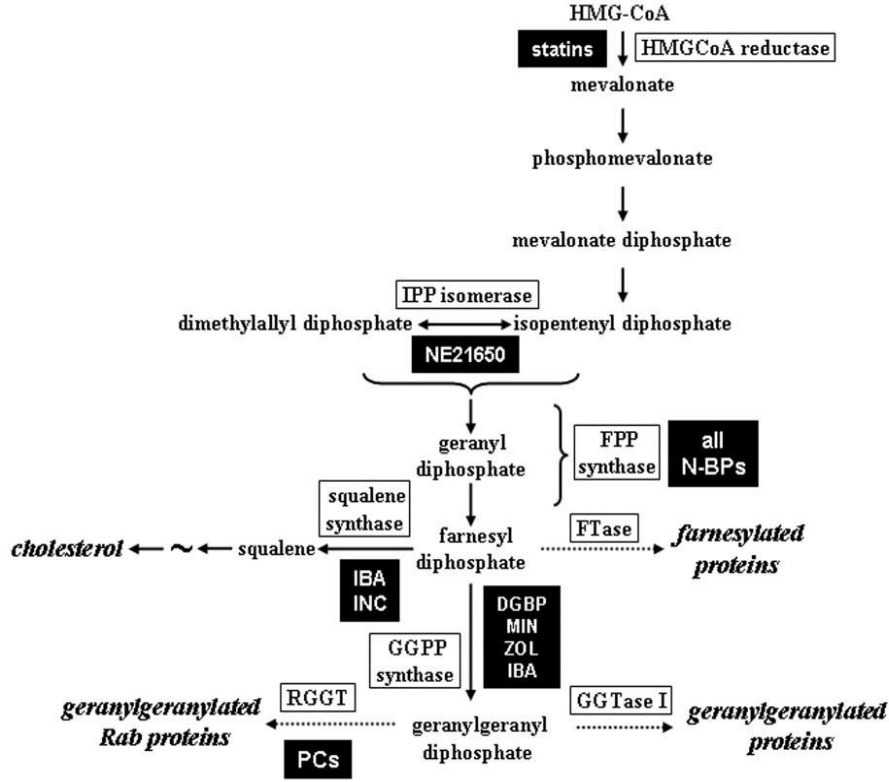
SHH sinyal yolağının aktivasyonu: Ligand- bağımlı SHH yolağı SHH yolak aktivasyonu SHH ligandının benzer afiniteyle bağlanan ve çeşitli dokularda farklı şekilde sentezlenen iki homologu; PTCH1 ve PTCH2 reseptörlerine bağlanması ve endositozu ile tetiklenir. PTCH reseptörleri SMO membran proteinini inhibe ederek SHH yolak aktivasyonunu bloke etmektedir (Stone, D.M. ve ark., 1996;). SHH-PTCH bağlanma sonrasında sırasıyla; 8 geçişli transmembran SMOothened (SMO) G- proteinini (ligve yokluğunda SMO proteini PTCH tarafından inhibe edilir) serbest bırakılır, serbest salınan SMO G-proteinin silyada birikir ve GLI (5-çinko-parmak proteinleri) transkripsiyon faktör ailesi üyelerinde (GLI1, GLI2, GLI3) işlevsel post-transkripsiyonal değişiklikleri (protein fosofrilasyonu, proteozam-aracılıklı proteolizis ve sitoplazma nukleus arası hareketler) indukler. GLI ailesinden GLI1 sadece tam uzunluklu transkripsiyonal aktivatör şeklinde (GLI-A) bulunur. GLI2 ve özellikle de GLI3 kesilmiş repressör forma (GLI-R) işlenebilir (Sasaki, H. ve ark., 1999; Dai, P. ve ark., 1999;). GLI-R formalarının oluşması primer silyada aktif SMO bulunması ile baskılanır (Ingham, P.W. ve ark., 2001;).

Rab GTPazlar Rab proteinleri küçük GTPaz Ras süper ailesinin en büyük alt grubunu oluşturmakta ve endositoz, liozomal degradasyon, otofaji, ekzositoz, hücre migrasyonu ve mitoz gibi hücrel olaylar için gerekli özel hücre içi trafiğini düzenlemekteler. Rab porteinleri endomembran sistemin farklı membrana-bağlı komponenlerinde (Golgi, endoplazmik retikülüm, endozom, fagozom, liozom, plazma membranı ve b.), çekirdek, plazma membranı, mitokondri ve sentrollerde lokalize olurlar (Chen ve ark., 2003; Pereira- Leal ve Seabra, 2000; Pfeffer, 2005). Rab ailesi sitoplazmada inaktif Rab GDPaz şeklinde bulunur. Prenil (geranilgeranil) post-translasyonel modifikasyon aracılığı ile membrana bağlanarak aktif Rab GTPaz haline geçerler. Prenil grubu Rab proteinlerine translasyon sonrasında eklenir bu süreç prenilasyon adlanır. Rab proteinlerinin prenilasyonu protein prenil transferazlar tarafından gerçekleştirilir. Bilinen üç prenil transferaz vardır: protein farnesil transferaz (PFT), protein geranilgeranil transferaz-tip I (PGGTI veya CAAX-GGT) ve Rab geranilgeranil transferaz (RGGT veya PGGTII). PFT ve PGGTI enzimlerinin her ikisi substratın C ucundaki CAAX (C-sistein) tetrapeptit prenilasyon motifini tanıır. X amino asidi hangi enzimin aktif olacağını belirlemektedir; Ras proteinlerinde olduğu gibi X metionin veya serin olduğu zaman protein PFT tarafından farnesillendiği halde, Rho proteininde olduğu gibi X lözin olduğu zaman protein PGGTI tarafından geranilgeranillenir. RabGGT veya PGGTII diğer prenil transferazlardan farklı olarak Rab proteinlerine özgü olup, Rab proteinlerini C ucunda CC veya CXC motifindeki bir veya iki sistein amino asitlerine geranilgeranil grupunu eklemektedir. Şekil 1.

Prenilasyon öncesinde Rab proteinleri REP (Rab escort proteini veya RGGT A bileşeni) tarafından RabGGT"ye sunulur (Seabra M. C., ve ark., 1992; 1995; 2000; Zhang H., ve ark., 2000; Terry K. L., ve ark., 2000; Farnsworth C. C., ve ark., 1994; Anant J. S., ve ark., 1998; Bialek-Wyrzykowska U., ve ark., 2000).

Zoledronik asit en güçlü yeni nesil bifosfonatlardan olup kemik erimesi inhibitörü olarak kemik hastalıkları ve kemik metastatik hastalıklarında kullanılmaktadır (Russell RG ve ark., 2008). Etki mekanizmasına bakıldığında, Zoledronik asit mevalonat yolağının önemli enzimi farnesil pirofosfat sentetaz (FPP synthase) enzimini inhibe eder. Yapılan araştırmalar Zoledronik asidin RabGGT aktivitesini inhibe ettiğini ve Rab proteinlerini prenilasyonunu engellediğini göstermektedir. Böylece Zoledronik asit etkisi ile Rab proteinlerinin membranlara bağlanması ve

aktif GTPaza dönüşmesi için gerekli post-translasyonel modifikasyonunu gerçekleştiremez ve membran: sitoplazma oranı azalır, Rab proteinlerini devre dışı bırakılır.



Şekil 2.1. Mevolanat yolağı, etkili inhibitörler, inhibe ettiği enzimler. PC: phosphonocarboxylate; DGBP: digeranyl bisphosphonate; INC: incadronate; IBA: ibandronate; MIN: minodronate; ZOL: zoledronate; ALN: alendronate. (Fraser P. Coxon 2008. An update on the pharmacology of bisphosphonates and analogues with lower bone affinity).

Literatürde prostat tümörleri de dahil olmakla tümör hücrelerinde Zoledronik asit etkisine dair çok sayılı araştırma bulunmaktadır. *In vivo* çalışmalarda ZOL etkisi ile tümör ölçüsü küçülmese de prostat kanser hücrelerinin kemik çevresinde büyümesi önemli derecede inhibe edildiği gösterilmiştir (Russell RG ve ark., Saad f., ve ark 2002). İleri prostat kanser hastalarında ZOL tedavisinin etkisine dair belgelenen geniş sayıda raporlar olmasına rağmen, ZOL asidin pre-klinik çalışmalarda hastalığın ilerlemesini azaltsa da istenilen etkinin elde edilmediği ve ilaca direnç geliştiği de bildirilmiştir (James ND., ve ark., 2002; Vale CL ve ark., 2016; Heymann ve ark.,

2016). Buna karşın KKH özelliğinin gelişmesi ile ilaca direnç arasındaki ilişkiye dair yapılan araştırmada karşı kök hücre özelliğinin geliştiği kolon kanser hücrelerinin Zoledronik asit tedavisine dirençli olduğu gösterilmiştir (A. Yoshiyama ve ark., 2016). KKH kanser gelişimi ve metastazının yanı sıra geleneksel tedaviye dirençten sorumlu tutulan az sayıda hücreden oluşan ve sessiz kaldığı, daha yavaş büyüdüğü için mevcut tedavilerle yok edilemeyen hücre grubudur. KKH gelişimi ve devamlılığının sağlanmasında önemli sinyal yollarından biri SHH sinyal yolağıdır (Taipale ve Beachy, 2001; Zhang ve Kalderon, 2001; Rubin ve de Sauvage, 2006;). Bu nedenle SHH sinyal yolağının inhibisyonu KKH yok etmek, kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için ümit verici hedef sunmaktadır. Sağlıklı doku ve kanser hücrelerinde SHH yolağı aktivasyonu PTCH1, BOC, CDON, HHIP, LRP2 ve Cas1 gibi hücre yüzey reseptörleri ve SUFU, KIF7 gibi hücre içi proteinler tarafından düzenlendiği, bu proteinlerin kanser hücrelerinde de SHH yolak inhibisyonu için birer aday olduğu bilinmektedir (Allen ve ark., 2007; Izzi ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2011; Christ, A. ve ark., 2012; 2015; Storm, T. ve ark., 2014; Spoelgen, R.ve ark., 2005; 2002; Morales, C.R. ve ark., 2006; McCarthy RA. ve ark., 2002; 2003;).

Rab23 proteinin yetişkin dokularda ve embriyogenezde GLI1 transkripsiyon faktörünü, dolayısı ile SHH sinyal yolak aktivasyonu SUFU-bağımlı şekilde ve negatif yönde düzenlediği bilinmektedir. Ancak kanser doku ve hücrelerinde Rab23'ün bu bağlamdaki işlevine dair çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişmekte; bazı kanserlerde (örneğin mesane, pankreas, akciğer) onkogen etkinliğine sahip olmasına rağmen bazı kanserlerde (örneğin, meme) ise tümör-supressor etkinliğine sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca prostat kanserinde ve KKH'de Rab23 proteinin SHH yolağı üzerindeki etkisine dair her hangi çalışma bulunmamaktadır (Y. Liu ve ark., 2015; Y. Jiang ve ark., 2015; Z. Z. Cai ve ark., 2015; S. Huang ve ark., 2011; Q. Hou ve ark., 2011; Y. Liu ve ark., 2007; H. Sun ve ark., 2012; S. Chi ve ark., 2012;). KKH' de Zoledronik asitin KKH özelliklerinin yanı sıra kök hücre fenotipinin oluşması ve devamlılığını sağlayan Rab23-aracılıklı SHH yolak aktivasyonu üzerinde olası etkisine dair her hangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Zoledronik asidin Rab23 GTP' az ve SHH aktivasyonu üzerinde etki gösterebileceği düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Zoledronik asidin KKH'de Rab-23 GTPaz ifadesi ve SHH sinyal yolak aktivasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.



Gereç ve Yöntem

3.1. Prostat Kanser Hücre Hattı, Hücre Kültürü ve Reaktifler

Hücre kültür deneyleri (hücrelerin çoğaltılması, pasajlanması, dondurulma ve stoklanması), sitotoksikite deneyleri ve immunofloresan boyama EÜTF, Histoloji-Embriyoloji ABD, Moleküler Laboraturandı gerçekleştirilmiştir.

PC-3 ve DU145 prostat kanser hücreleri, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (Manasas, VA, ABD) satın alındı ve % 10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Paisley, İngiltere), % 1 penisilin ve streptomisin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD) içeren RPMI 1640 (Biochrome, Berlin, Almanya) kültür ortamlarında büyütüldü. Kullanılan antikorlar, anti-Smo (1:50 seyreltilmiş; SantaCruz Biotechnology, ABD, sc-13943), yamalı anti-1 (1:50 seyreltilmiş; SantaCruz Biotechnology, ABD, sc-9016), anti-SHH (1:50 seyreltilmiş); SantaCruz Biotechnology, ABD, sc-9024), RAB23 (1:50 dilüsyon, sc-292960, Santa Cruz Biotechnology, Inc), keçi anti-tavşan immünoglobulin G-flüoresan izotiyosiyanat (FITC) (1:100 oranında seyreltilmiş; sc-2012;, Santa Cruz Biyoteknoloji, Inc., Santa Cruz, CA, ABD). Zoledronik asit, Sigma-Aldrich (Darmstadt, Almanya) tarafından sağlandı ve Sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde 5 mM'lik bir stok çözeltisi halinde hazırlandı.

3.2. CD133+ Ve CD44+ prostat KKH 'lerin İzolasyonu

5×10^4 DU145 ve PC3 prostat kanser hücreleri, PE etiketli CD133 / 1 (klon AC133 / 1; Miltenyi Biotec Ltd.) ve FITC etiketli CD44 (klon G44-26; BD Biosciences) antikorları ile 4°C 'de 15 dakika süreyle inkübe edildi. Prostat KKH, daha sonra CD 133⁺ / CD44⁺ popülasyonu EÜ, AREL' de bulunan FACS Aria (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) cihazında "Fluorescence-activated cell sorting (FACS)" yöntemi izole edildi. Bu hücreler medyunda kültüre edilip çoğaltıldı. Canlı hücre sayıları Muse™ Count & Viability Kit kullanılarak belirlendi. İzole edilmiş KKH popülasyonları, iki farklı ortamda, tek tabakalı 2D kültür ortamında ve çok hücreli tümör kürecikleri şeklinde 3D kültür ortamında kültürlendi.

3.3 Kürecik (Sferoid) Oluşturma Testi

DU-145 ve PC-3 KKH' lerin kürecik oluşturma potansiyeli, yapışmayan üç boyutlu (3D) kültür ortamı kullanılarak değerlendirildi. Hücreler, FBS içermeyen RPMI 1640 ortamında, ince % 1.5 agar (w / v) (Difco Laboratories, Inc.; BD Diagnostic Systems, Detroit MI, ABD) tabakası ile önceden kaplanmış 6 oyuklu bir plaka içerisinde 1×10^4 yoğunlukta ekildi, 10 gün boyunca % 5 CO_2 37 ° C incubator ortamında kültürlendi. Hücre kültür ortamı her 2-3 günde bir yenilendi. 10 günlük kültürden sonra, sferoitler ters faz mikroskobu kullanılarak görüntülendi.

3.4. Sitotoksosite deneyi

Her bir deney grubunda her bir inkübasyon süresi için (24-48-72 saat) ayrı ayrı hücre kültür ortamına uygun konsantrasyonlarda ZOL eklenerek kontrol ile birlikte deneyler üçer kez tekrar edildi. Daha sonra deney grupları, içerisinde bulunan reaktif DNA bağlayıcı boyalar membran bütünlüğünü kaybetmiş ölü ve canlı hücreleri ayrı ayrı boyayan Muse™ Cell Analyzer ile Muse™ Count & Viability Kit kullanılarak hücre sayısı-canlılık yönünden incelendi. Bu şekilde ZOL'in IC50 değerleri konsantrasyon ve uygulama süresine göre hesaplandı.

3.5. Hücrelerin ZOL'e karşı apoptotik yanıtının incelenmesi

Çalışmanın bu aşamasında, "konsantrasyon- süre" şartlarında IC50 değerleri belirlenen hücrelerin, apoptotik yanıtları kontrol grubu ile birlikte, Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (MCH100105, Millipor, Billerica, MA, USA) kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile (Millipore, Billerica, MA, USA) incelendi. Deneyler üç kez tekrarlanacaktır. Sonuçlar ZOL uygulaması yapılmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

3.6. Rab23 GTPaz ve SHH yolak genlerinin PCR array analizi

Bu aşamada, ZOL'in KKH'lerindeki SHH yolağı ile ilişkili hangi genlerin

ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu sorusunun yanıtı araştırıldı. Bu aşamada çalışmalar EÜ, TF, Tıbbi Biyoloji ABD Moleküler Laboratuvarında gerçekleştirildi. Bunun için KKH ve non-KKH'lerine "uygulama konsantrasyon-süre" ayarında, ZOL ile muamele edildikten sonra uygulama ve kontrol gruplarından RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) kullanarak mRNA izole edildi. cDNA sentezi yapıldıktan gen ifadeleri LightCycler® 480 gerçek zamanlı PCR ile analiz edildi. Uygulama gruplarından elde edilen veriler kontrol grupları ile karşılaştırıldı, gen ifade değişiklikleri belirlendi.

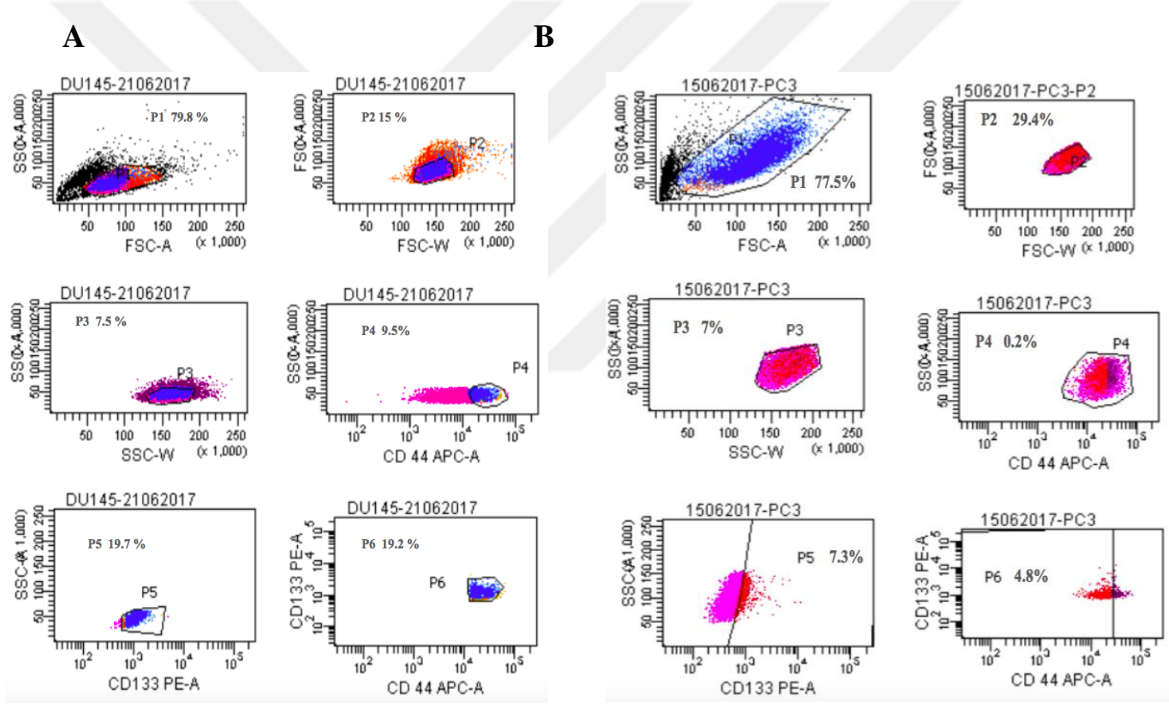
3.7. İmmunoflerasan Boyama

DU-145 KKH, DU-145 non-KKH, PC3 KKH, PC3 non-KKH'leri hücreleri kaldırılarak lizin kaplı lameller üzerine ekildi (3×10^5 hücre), 24 saat inkübasyon sonunda besiyeri uzaklaştırıldı, 2x5 dk PBS ile yıkandı. 15 dakika boyunca oda sıcaklığında % 4 paraformaldehit içerisinde bekletilerek fiksasyon sağlandı. PBS solüsyonu ile 3x5 dk. yıkadıktan sonra yine oda sıcaklığında 10 dakika boyunca % 1 Triton X-100 ile hücre geçirgenliği gerçekleştirildi, üç kez PBS ile yıkandı ve 1 saat boyunca % 5 sığır serum albümini içeren PBS ile bloke edildi. 4° C'de, nemli ortamda gece boyunca primer antikor ile inkübasyonun ardından, 3x5 dk PBS ile yıkandı. Hücreler oda sıcaklığında 1 saat boyunca floresan izotiyosiyanat (FITC) konjüge sekonder antikor ile muamele edildi, tekrar 3x5dk PBS solüsyonu ile yıkandı. İmmün boyanan hücreler, DAPI (sc-24941, UltraCruz mounting medium) damlatılarak lameller lam üzerine kapatıldı, (Olympus BX-51 ve Olympus C-5050 dijital testi) kamera ile donatılmış bir floresan mikroskobu aracılığıyla görselleştirildi.

Bulgular

4.1. Du145 ve PC3 prostat KKH 'lerinin elde edilmesi

Du145 ve PC3 insan prostat ve meme kanser hücreleri *CD 133+/CD 44+* yüzey markerlerinin ekspresyonuna göre AREL' de Flow Sitometri yöntemi ile Du145 ve PC3 prostat KKH ve non-KKH, olarak ayrılmıştır (Şekil 4.1). Ayrılmış hücre popülasyonlarının saflığını belirlemek için post-sıralama analizi gerçekleştirildi ve bu oran% 85'in üzerinde bulundu.

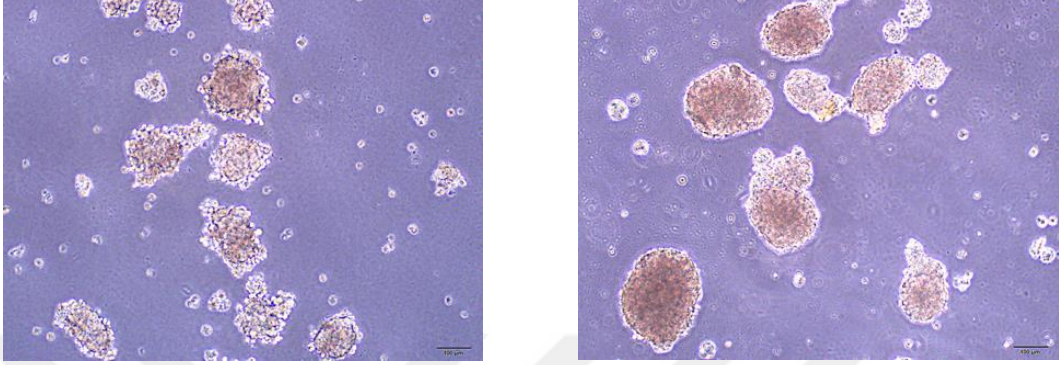


Şekil 4.1. Du145 (A.) ve PC3 (B.) insan prostat kanser kök hücrelerinin izolasyonu

4.2. DU145 ve PC3 KKH'lerinin 3D ortamında kürecik oluşturma yetenekleri

Çeşitli kaplama maddeleriyle tasarlanan yapışkan olmayan (non-adherent) kültürler, KKH'lerin kök hücre (stemness) potansiyelini tanımlamak ve değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Bu çalışmada, DU-145 ve PC-3 hücre

hatlarından izole edilen KKH' lerin kök hücre özellikleri serumsuz ortamda agaroz kaplı kuyu plakaları ile değerlendirildi. Beşinci ve üçüncü günlerde, sırasıyla Du-145 ve PC3 için sferoid oluşumu gözlemlendi ve zamanla boyut olarak arttığı belirlendi (Şekil 4.2).

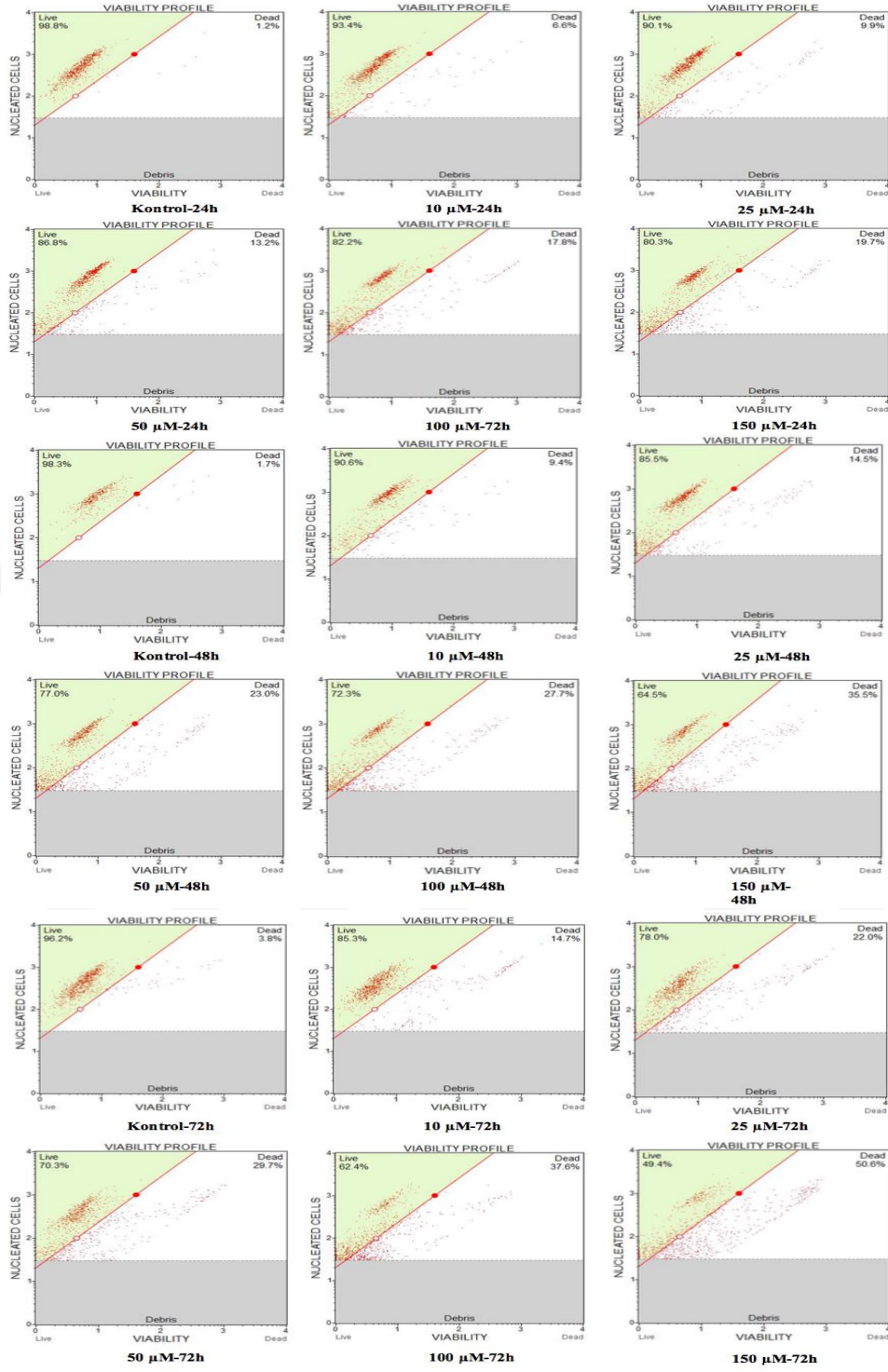


Şekil 4.2. DU-145 KKH ve PC-3 KKH' lerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri (Ölçek çubuğu: 100µm).

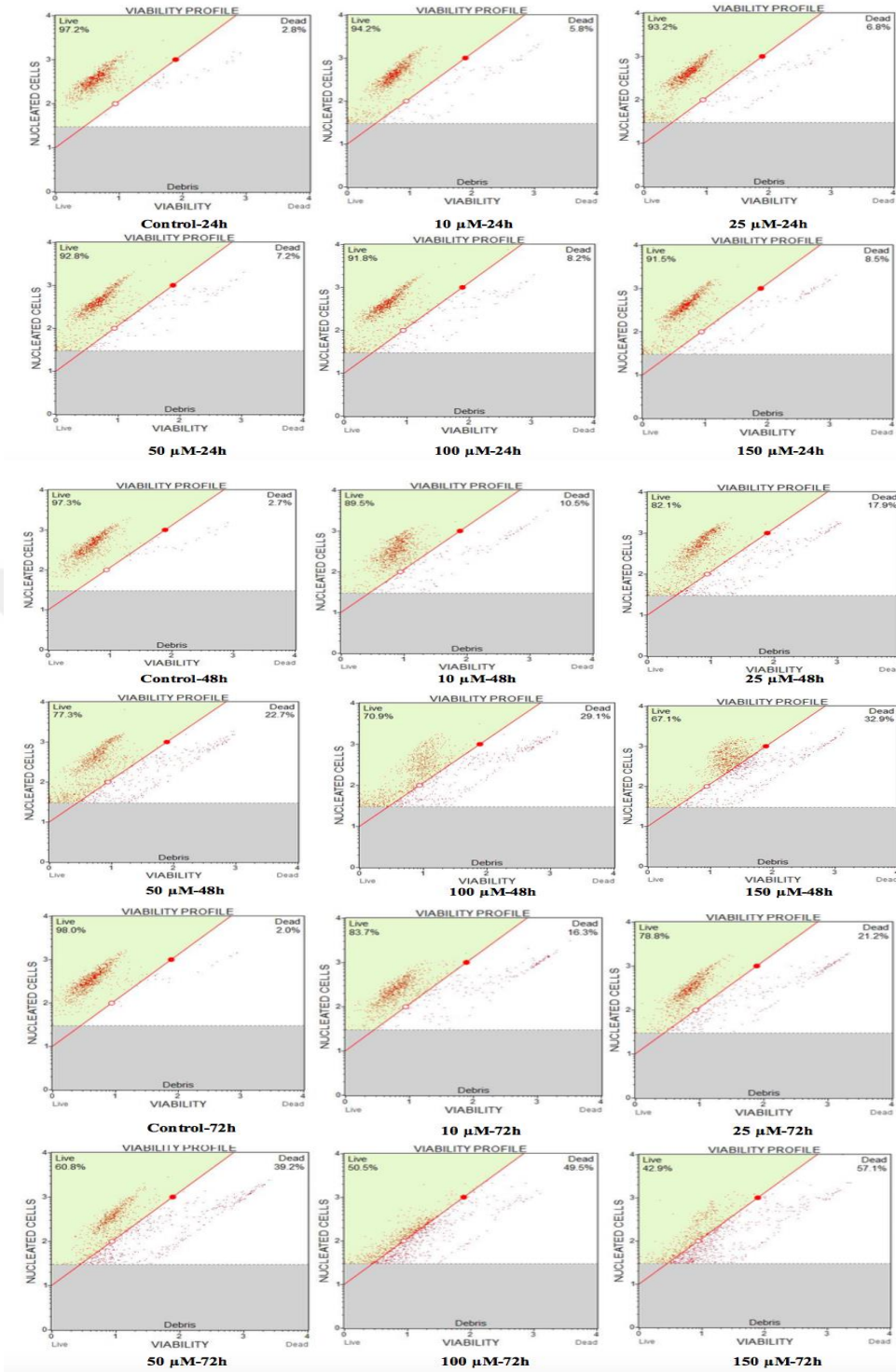
4.3. Hücre sayısı ve canlılığının belirlenmesi; IC50 değeri.

Hücre sayısı ve canlılığı Muse™ Count & Viability Kit kullanılarak, kitin prosedürüne göre Muse™ Cell Analyzer ile (Millipore, Billerica, MA, USA) belirlendi.

IC50 değerleri 72 saatte 150µM (PC3 KKH) ve 110µM (PC3 non-KKH) belirlendi (Şekil 4.2; 4.3). Du145 KKH ve non-KKH için daha önce ekipimiz tarafından yapılan bir çalışmada belirlenen IC50 değerleri (uygun olarak 108µM ve 96µM; 72 h) kullanıldı.



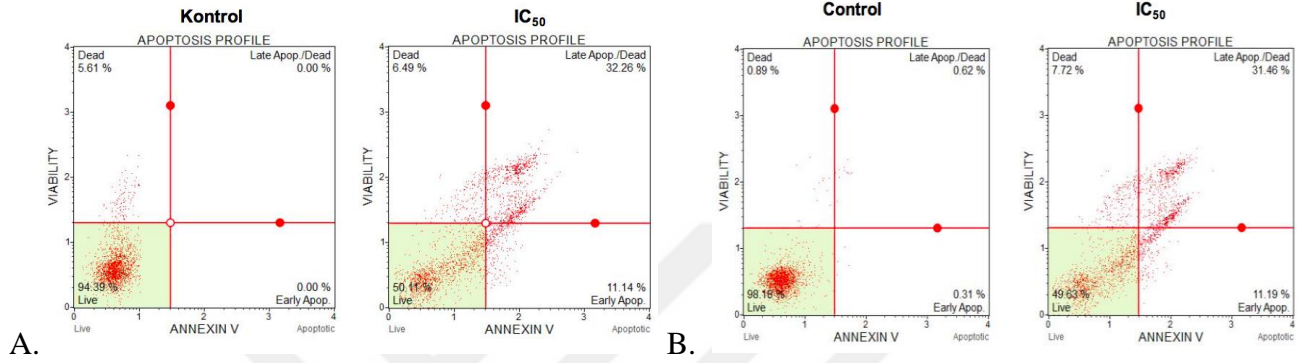
Şekil 4.2. PC3 KKH'de ZOL uygulaması ve hücre canlılığının belirlenmesi.



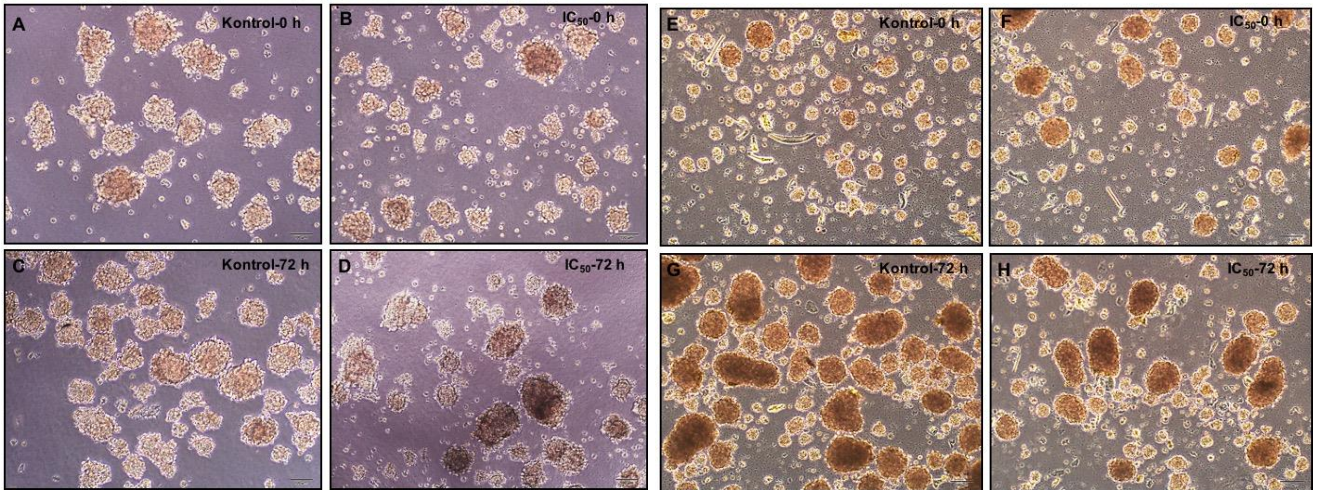
Şekil 4.2. PC3 non- KKH’de ZOL uygulaması ve hücre canlılığının belirlenmesi.

4.3. Hücrelerin ZOL'a karşı apoptotic yanıtı

Apoptosis analizi, Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (MCH100105, Millipor, Billerica, MA, USA) kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile (Millipore, Billerica, MA, USA) yapıldı (Şekil 4.4. A ve B)



Şekil 4.4. PC3 KKH (A) ve PC3 non-KKH (B) hücrelerin apoptotik yanıtları.



Şekil 4.5. (A-D) DU145 ve (E-H) PC3 KKH küreciklerinde 72 saat sonra gözlenen kantitatif değişimler (scale bar 100µm)

4.4. ZOL etkisi ile prostat KKH'leri küreciklerinde kantitatif değişiklikler

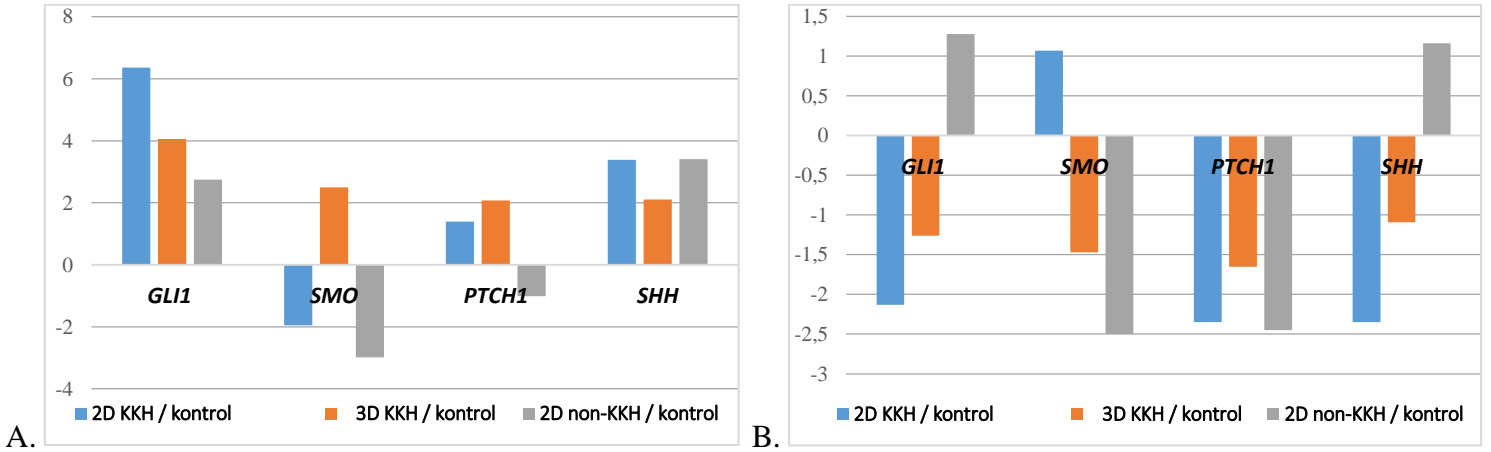
DU-145 ve PC-3 hücre hatlarından izole edilen KKH'lerin kök hücre özellikleri serumsuz ortamda agaroz kaplı kuyu plakaları ile değerlendirildi. Uygulama gruplarına ZOL eklendi, uygulama ve kontrol gruplarında her kuyucuk içindeki kolonilerin sayısı ve çapı 72 saat sonra mikroskop altında belirlendi. Tumoroid boyutunun ve sayılarının ölçümü, kontrollere kıyasla uygulama sferoidlerinde sitotoksosite göstermiştir. ZOL, DU145 CSC'lerin ve PC3 CSC'lerin sferoit sayısını ve çapını 72 saat sonra azalttığı belirlendi.

4.5. mRNA Ekspresyon Analizi, RT-PCR Bulguları

ZOL'in etkisi ile KKH'lerindeki SHH yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyonunda değişikler incelemek amacı ile SHH yolak bileşenleri (PTCH1, SHH, SMO ve GLI1) ve Rab23 GTPaz mRNA ekspresyon değişiklikleri Real – Time PCR yöntemi ile Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ABD Laboratuvarında bulunan LC 480 cihazında analiz edildi. Analizde RT2 qPCR Pimer Assay for Human Rab23 (cat. no: PPH06221F), RT2 qPCR Pimer Assay for Human SHH (cat. no: PPH02405A), RT2 qPCR Pimer Assay for Human SMO (cat. no: PPH02222C), RT2 qPCR Pimer Assay for Human PTCH1 (cat. no: PPH00225C), RT2 qPCR Pimer Assay for Human GLI1 (cat. no: PPH00153A) (<https://www.qiagen.com/jp/geneglobe>), kontrol gen olarak GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) kullanıldı. ZOL uygulanan gruplar ve kontrol gruplardan elde edilen sonuçlar karşılaştırılmalı şekilde incelendi, fold change >2 ve p<0,05 olan değerler anlamlı kabul edilerek ZOL etkisi ile mRNA ekspresyonunda değişiklik olan moleküller belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. ZOL etkisi ile değişmiş mRNA ekspresyonları

ZOL uygulaması sonrası DU145 gruplarında mRNA ifade değişiklikleri (Fold Change / p value)				
Genler	2D KKH / kontrol	3D KKH / kontrol	2D non- KKH / kontrol	3D / 2D (KKH)
<i>GLI1</i>	6,36 / 0,00	4,06 / 0,00	2,75 / 0,00	5,82 / 0,00
<i>SMO</i>	-1,95 / 0,00	2,50 / 0,00	-2,99 / 0,00	4,56 / 0,00
<i>PTCH1</i>	1,39 / 0,02	2,08 / 0,00	-1,01 / 0,90	1,37 / 0,02
<i>SHH</i>	3,39 / 0,00	2,11 / 0,00	3,41 / 0,00	10,63 / 0,00
ZOL uygulaması sonrası PC3 gruplarında mRNA ifade değişiklikleri (Fold Change / p value)				
Genler	2D KKH / kontrol	3D KKH / kontrol	2D non- KKH / kontrol	3D / 2D (KKH)
<i>GLI1</i>	-2,13 / 0,00	-1,26 / 0,02	1,28 / 0,00	-1,38 / 0,00
<i>SMO</i>	1,07 / 0,22	-1,47 / 0,00	-1,05 / 0,42	1,13 / 0,06
<i>PTCH1</i>	-2,35 / 0,00	-1,65 / 0,00	-2,45 / 0,00	-5,35 / 0,00
<i>SHH</i>	-2,35 / 0,00	-1,09 / 0,35	1,16 / 1,12	-11,08 / 0,00



Şekil 4.6. ZOL etkisi ile değişmiş mRNA ekspresyonları. (A) DU145 ve (B) PC3.

Elde edilen IC50 değerleri uygun dozlarda ZOL uygulanan grupları kontrol gruplarla kıyasladığımız zaman çalışmamızda belirlenemeyen mekanizmalar

üzerinden ZOL etkisi ile Rab23 gen ekspresyonunda PC3 2D KKH, DU145 3D KKH gruplarında anlamlı artma ve Du145 non-KKH anlamlı azalma olduğunu, PC3 3D KKH, PC3 non-KKH ve Du145 2D KKH'de ise anlamlı değişiklik olmadığını saptadık.

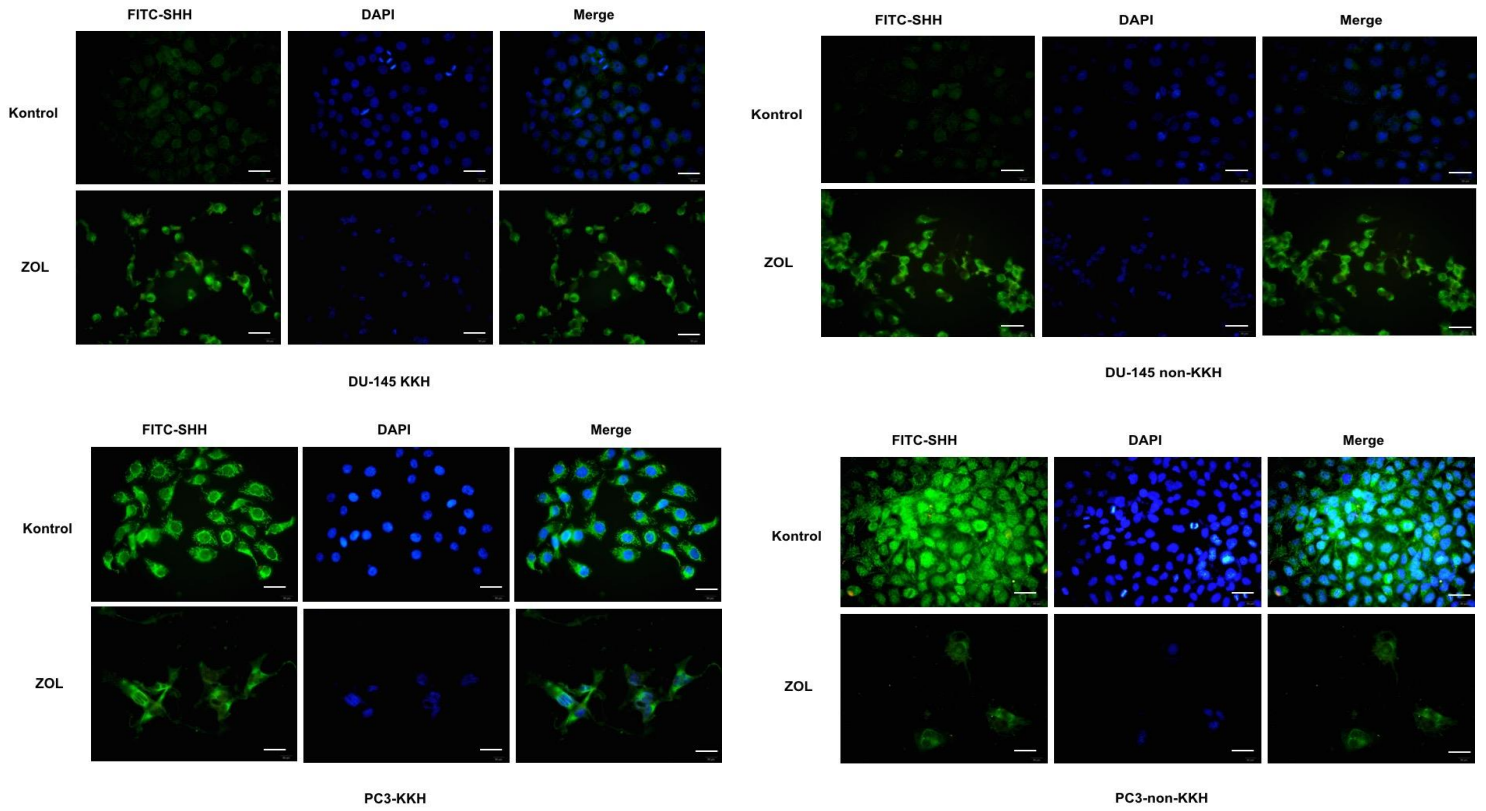
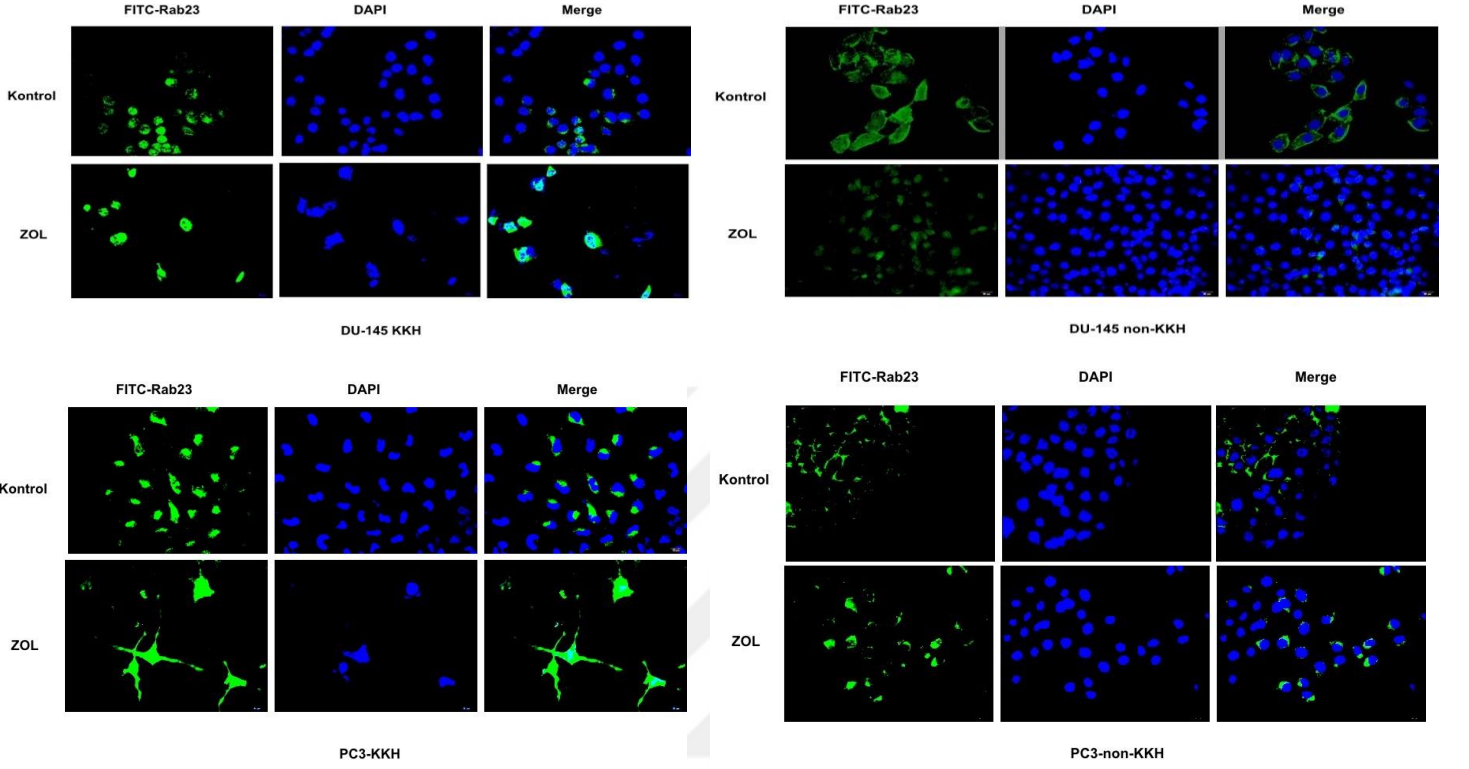
SHH yolağı üzerindeki ZOL etkilerinin araştırılması için, 2D ve 3D kültür sisteminde üretilmiş KKH'leri ve no-KKH (PC3 ve DU145) ZOL uygulanma sonrasında RT-PCR yöntemi kullanılarak SHH yolağı genleri *SHH*, *SMO*, *GLII* ve *PTCH1*'in gen ifade değişimlerini inceledik, kontrol gruplarından elde edilen verilerle karşılaştırdık; *GLII* ve *SHH* gen ifadeleri, ZOL uygulaması sonrasında DU145 2D ve 3D KKH ve non-KKH'lerinde artma olduğunu saptadık. *SMO* ve *PTCH1* gen ifadelerinde ZOL etkisi ile DU145 2D KKH'lerinde artma görüldüğü halde 3D KKH'lerinde anlamlı değişiklik göstermemiştir. DU145 non-KKH'de ZOL tedavisinden sonra *SMO* mRNA seviyesi belirgin şekilde azalmış, *PTCH1* mRNA seviyesi anlamlı olarak değişmemiştir. ZOL uygulaması sonrası DU145 2D ve 3D KKH'lerinde gen ifadeleri karşılaştırıldığında, *GLII*, *SMO* ve *SHH* genlerinin daha belirgin şekilde yukarı doğru düzenlendiği ancak *PTCH1* gen ifadesinin anlamlı olarak değişmediği görüldü.

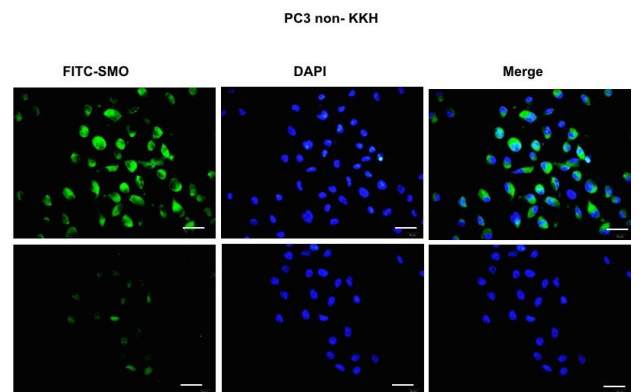
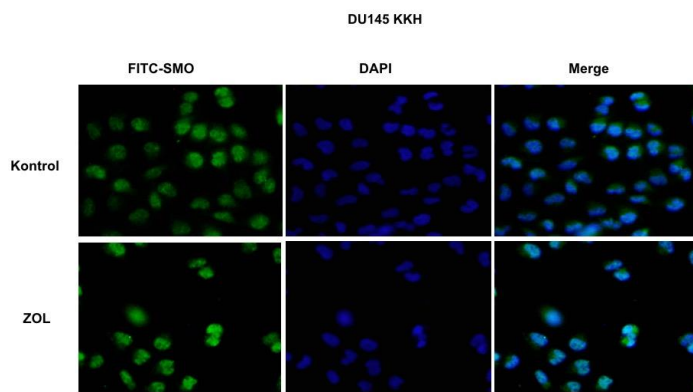
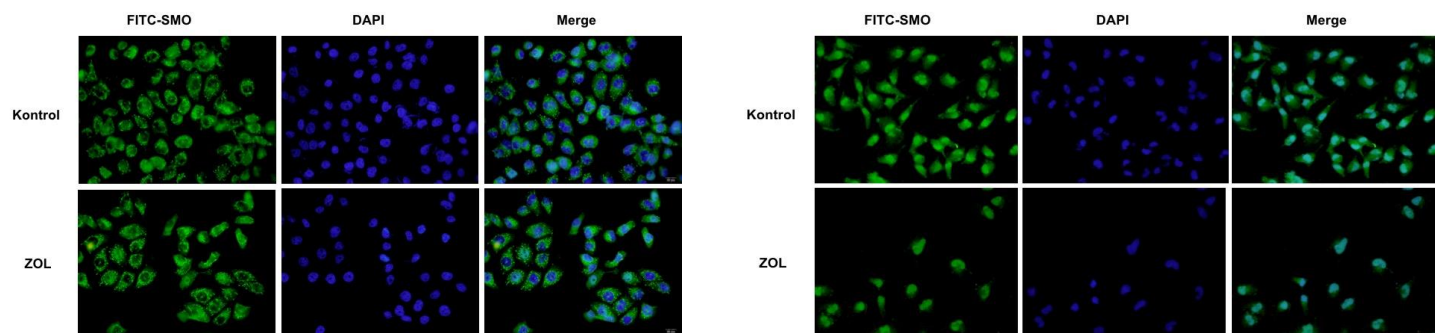
ZOL etkisi ile değişen gen ifadeleri PC3'te DU145'ten farklı oldu. ZOL işleminden sonra, *GLII*, *PTCH1* ve *SHH* genleri PC3 2D KKH'lerinde aşağı doğru düzenlenirken, PC3 sferoidlerinde tüm genlerin ifadesinde (*GLII*, *PTCH1*, *SHH* ve *SMO*) anlamlı değişiklik olmadığı görüldü. Kontrol gruplarla karşılaştırıldığında, PC3 non-KKH'de *PTCH1* geninde saptanan azalma dışında, diğer genlerde (*GLII*, *SHH*, *PTCH1*), anlamlı bir şekilde değişiklik belirlenmedi. PC3 3D ve 2D KKH'leri karşılaştırıldığında, ZOL etkisi ile *GLII* ve *SMO* gen ifadeleri anlamlı olarak değişmezken, *PTCH1* ve *SHH* mRNA ifadeleri belirgin şekilde azalmış olduğu saptandı.

4.5. İmmunoflerasan Boyama

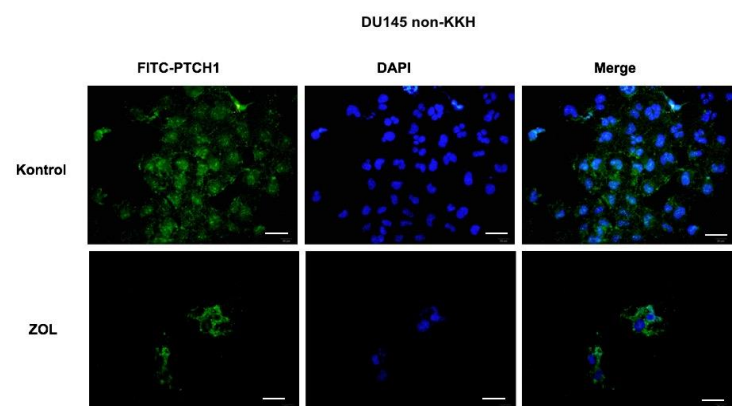
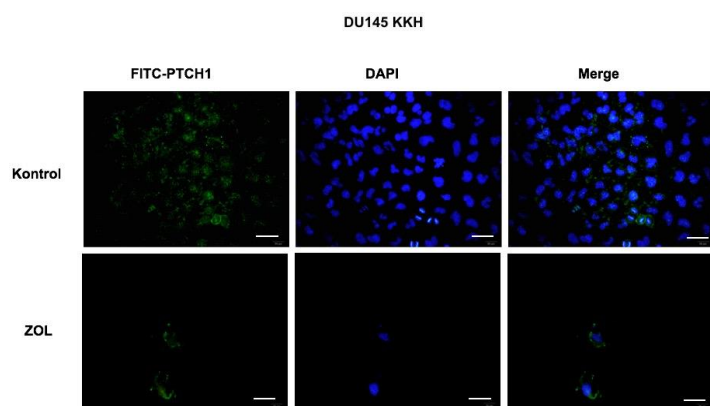
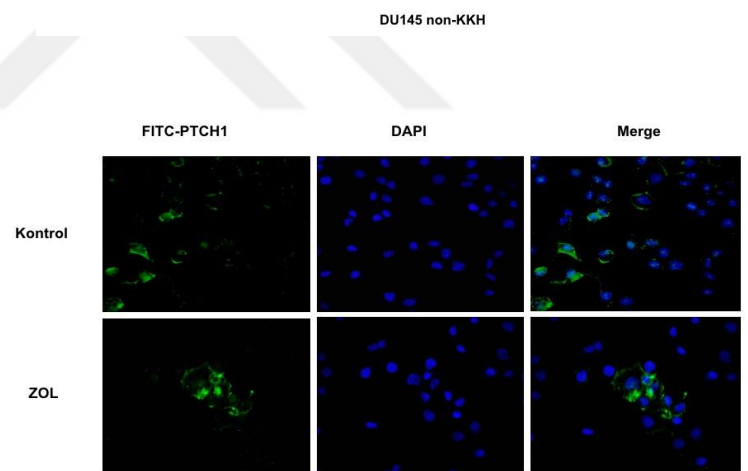
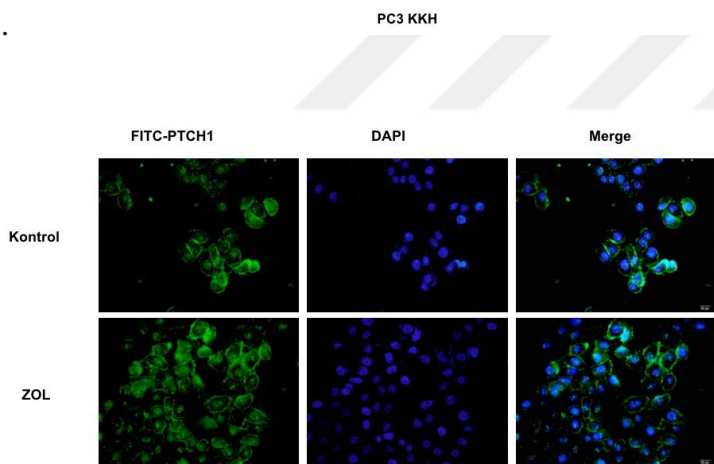
Rab23 ve SHH yolak bileşenlerinin protein ekspresyon ve hücre içi lokalizasyonunda Zol uygulama sonrasındaki olası değişimleri belirlemek için deney

grupları ve kontrol gruplarında Immunofloresan boyama yapılarak karşılaştırmalı şekilde incelendi.





C.



D.

PC3 non-KKH

PC3 KKH

Şekil 4.6 Rab23 (A), SHH (B), SMO (C), PTCH1 (D) protein ifade değışikliklerinin analizi. Scale bar 20µm

Rab23 protein ekspresyonundaki ZOL etkisi ile olası değışikliği incelediğimizde mRNA ekspresyon değışikliklerine uyumlu şekilde ZOL eklenen gruplardan PC3 non-KKH'da anlamlı değışiklik yokken, PC3 KKH'de anlamlı artma olduğu, Du145 non-KKH anlamlı azalma görürken DU 145 KKH ve PC3 non-KKH gruplarında anlamlı değışiklik olmadığı görüldü.

SHH yolak bileşenlerinin protein ifadeleri DU145 ve PC3 uygulama gruplarında farklı değışiklikler gösterdi. DU145 KKH ve non-KKH' de protein ifadeleri ZOL uygulama sonrası incelendiğinde, her iki grupta ZOL etkisi ile SMO azalırken, SHH'de de artma olduğu, PTCH1 protein ifadesinde ise anlamlı değışiklik olmadığı görüldü. PC3 KKH ve non-KKH gruplarında ise ZOL uygulamasının SMO protein ifadesini anlamlı şekilde etkilemediği, PTCH1 ifadesini ise azalttığı görüldü. SHH protein ifadesinin ZOL etkisi ile PC3 KKH' de azalırken, non-KKH'de etkilenmediği belirlendi

TARTIŞMA

Zoledronic asit, Gıda ve İlaç Yönetimi (Food and Drug Administration) tarafından meme ve prostat kanserlerinde osteoklastik kemik rezorpsiyonu ve iskelet morbiditesinin önlenmesi veya azaltılması için onaylanmıştır (Perry CM, vd., 2004). ZOL, hücre içi mevalonat yolunda farnesil difosfat sentazı (FDPS) bağlayarak ve inhibe ederek kolesterolün, diğer sterollerin ve farnesil pirofosfat ve geranil-geranil pirofosfat gibi anahtar enzimlerin üretilmesini önler (L. Gong et al., 2011). Bu enzimler, kemik rezorbe etme aktivitesi ve osteoklastların hayatta kalması için gerekli olan, kanser hücresindeki hücre iskeleti organizasyonu ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde önemli rol oynayan, Ras, Rho, Rac, Rab ve Cdc42 gibi sinyalleme moleküllerinin post-translasyonel prenilasyonundan ve geranilgeranilasyonundan sorumludur (Reinholz GG ve diğerleri, 2002; Rogers MJ ve diğerleri, 2004). Bu nednele, ZOL tarafından farnesil pirofosfat ve geranil-geranil pirofosfat inhibisyonunu sonucunda posttranslasyonel prenilasyon ve geranilgurandilasyonun gerçekleşmemesi, tümör hücresi proliferasyonunun ve anjiyogenezinin azalmasına, apoptozun indüksiyonuna, tümör hücresi invazyonunda ve hücre hücresi bozulmasında azalmaya neden olur ve kanser hücresinin kemiğe adezyonunu önler (Zekri J., vd., 2013). Her ne kadar osteoklastik iskeletle ilgili komplikasyonun önlenmesi veya azaltılmasında en yaygın kullanılan bifosfonat olsa da, PCA hastalarında sağkalımın iyileşmesi veya gecikmiş tedavi başarısızlığı açısından ZOL'un tanımlanmış yetersizliğinin, KKH-ilişkili ilaç direncinin gelişimi ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür (James ND ve diğerleri, 2016; Vale CL ve diğerleri, 2016; Heymann MF ve diğerleri, 2016).

Non-KKH (bulk population) ile kıyaslandığında, KKH' de eçici olarak aktive edilen SHH sinyal yolağının, KKH'lerin devamlılığını sağladığı ve PCA'da ilaç direncinin gelişmesine neden olduğu ileri sürülmüştür (Justilien, V., & Fields, A.P. 2015).

PKKH' ler tarafından geliştirilen ilaç direncinde KKH-ilişkili SHH yolağının kritik rol oynadığı bilgisinden yola çıkarak, iki (2D) ve üç (3D) boyutlu prostat KKH' de ZOL'un SHH yolağı ve Rab23 GTP'az üzerinde olası etkilerini araştırdık.

SHH ve SMO, sırasıyla sinyal iletimini tetiklemek ve plazma zarı boyunca sinyal iletmek için gerekli olan iki temel SHH yolak bileşenidir. Her iki molekül de kolesterollenmiş veya kolesterol ile modifiye edilmiş proteinlerdir. Kolesterilasyon, SHH ligandının post-translasyon modifikasyonu ve SMO'nun aktif işlevi için gereklidir. Hücre içi kolesterolün düşük seviyeleri ve / veya kimyasal aktivitesi, SHH ligandının olgunlaşması ve plazma membranından salınımının, bunun yanı sıra siliyumdaki SMO'nun aktivasyonun bozulmasına yol açar, böylece SHH sinyal yolağının iki farklı basamakta baskılanmasına neden olur (N.A. Riobo 2013). SHH yolağının negatif düzenleyicisi PTCH1, Direnç-nodülasyon-Bölünme (RND; Resistance-Nodulation-Divition) taşıyıcı ailesinin bir üyesidir. 12-trnasmembran domainine ve 2 genişletilmiş ligand tanıma domainine sahiptir. Sterol-duyarlı domainin (SSD) kolestrole bağlanarak, içden dışa kolestrol akışını sağlar, hücre içi kolestrol konsantrasyonunu azaltır. Kolestrol homeostazının yanı sıra, SSD domaini aynı zamanda PTCH1' in SHH ligandıyla etkileşiminde ve SMO aktivesinin baskılanmasında önemli rol oynar (Gong X., ve ark., 2018). Prostat kanserinde SHH yolağının limitleyici faktörü olduğu öne sürülen, normal sağlıklı prostat dokularında ifade olmayan, buna karşın tüm metastatik hasta örneklerinde ifade edilen SMO' nun artmış ifadesi, prostat kanserinde SHH yolak aktivasyonunu ligand-bağımsız şekilde tetikler. Kolestrol, SMO aktivatörü olup SMO' ya bağlanması ile SHH yolak aktivasyonunda ilk önemli basamağı olan siliyer membranda SMO birikimi ve aktivasyonunu sağlar. Ligand yokluğunda PTCH1 aktif olur ve siliyer membranda kolestrol konsantrasyonunun veya kimyasal aktivitesinin azaltarak SMO'nun siliyer membranda birikimini ve aktivasyonunu baskılar. SHH ligandının PTCH1 reseptörüne bağlanması ile gerçekleşen PTCH1 inhibisyonu ile siliyada kolestrol konsantrasyonu ve kimyasal aktivitesinin artması SMO'nun siliyada birikimine ve aktifleşmesine neden olur. Aktif SMO, EVC proteinleri gibi önemli proteinlerle etkileşerek SHH sinyalini alt yönde iletir. Bunun yanı sıra kolestrol, SHH ligandı ile sinerji göstererek tek başına SMO' nun plazma membranında birikimini tetikleye ve direkt olarak SMO'yu aktive edebilir (Huang P., ve ark., 2016; Hasanovic, A., & Mus-Veteau, I. 2018). Kolestrol sentezinin önemli inhibitörü lovastatin kullanımının

kanonik SHH yolak aktivasyonunu engelediği bildirilmiştir (N.A. Riobo 2013). ZOL mevalonat yolunu modüle ettiği ve kolesterol biyosentezini inhibe ettiği için (M Goffinet et al, 2006; Coscia, M., et al., 2010) bir olasılık, ZOL hücre içi kolesterolü düşük seviyelerde tutarak SHH ligandının olgunlaşması ve salımının, SMO'nun aktivasyonunu engellemiş olabilir ki, bu durum SHH sinyal yolağının inhibisyonu ile sonuçlanabilir.

Diğer taraftan, ZOL, Rab23 GTPazın post-translasyonel prenilasyon, membran lokalizasyonu ve aktivasyonunu önleyerek SHH sinyal yolunu etkileyebilir. Küçük Rab GTPaz alt ailesinin önemli üyelerinden biri olan Rab23 GTPaz, normal dokularda SHH yolağını SuFu'ya bağımlı şekilde negatif olarak düzenler. (Evans, T.M., vd., 2003). Bu durumda ZOL, Rab23 aktivasyonunu baskılamakla SHH yolağının aktive etmiş olur. Fakat, Rab23 GTP' in kanserdeki rolü ile ilgili elde edilen bulgular tartışmalıdır. Son zamanlarda, Chang J. ve arkadaşları, Rab23'ün PCa dokularında ve hücre hatlarında yukarı doğru regüle edildiğini ve Rab23'ün aşağı regülasyonunun, PCa hücrelerinde SHH ve GLI1'in protein ekspresyon seviyelerini anlamlı şekilde düşürdüğünü göstermiştir (Chang J., vd., 2017). Bu açıdan bakıldığında ZOL, PCa'daki SHH sinyal yolağının pozitif düzenleyicisi Rab23'ün aktifleşmesini önleyerek SHH sinyalini inhibe etme etkisine gösterebilir. Tüm bu bilgileri birleştirecek olursak, ZOL, bir kaç yönden SHH yolağının aktivasyonunu engelleyebilir;

- Kolesterol sentezini bozarak SHH ligandının post-translasyonel modifikasyonunu, böylece SHH verici hücreden salımını ve alıcı hücre plazma membranında PTCH1 ile etkileşimini engelleyebilir. Bu da SHH yolak sinyalinin başlatılmasını ligand-reseptör seviyesinde bozar.
- İkinci taraftan SHH ligandının PTCH1 ile etkileşimi yani PTCH1'in SHH tarafından inhibisyonunun bozulması, PTCH1 tarafından kolesterol akışının devamına ve kolesterolün plazma membranında düşük seviyede olmasına neden olur. Bu durum silyada SMO birikimi ve aktivasyonunu engeller. SMO, prostat kanserinde SHH yolak aktivasyonu için önemli bir limitleyici bir yolak aktivatörü olduğu için inaktivasyonu, sinyalin alt yönde iletilmesini ve böylece kanonik SHH yolak aktivasyonunu bozar.

- ZOL' un SHH yolağını etkileyebileceği üçüncü önemli nokta Rab23 prenilasyonu ve aktivasyonunun bozulmasıdır. Prostat kanserinde Rab23, SHH yolağını hücre içinde pozitif şekilde düzenlediğinden Rab23 inaktivasyonu SHH yolak aktivasyonunun hücre içinde inhibe eder.

Sonuçlarımız, ZOL'nin DU145 ve PC3 hücre gruplarını farklı şekilde etkilediğini göstermiştir. ZOL tedavisine verilen farklı tepkiler hem gruplar arasında (DU145 ve PC3), hem de her gruptaki KKH'ler ve non-KKH arasında gözlemlendi. Her iki prostat kanser hücresi (PC3 ve DU145) androjenden bağımsız olmasına rağmen, Zoledornik asite karşı DU145 KKH ve non-KKH (IC50 dozu, 72 saatte 108 μ M ve 96 μ M), PC3 KKH ve non-KKH'lerinden (IC50; 72saatte 150 μ M ve 111,7 μ M) daha duyarlıydı. Bu sonuç, DU145 ve PC3'ün türetildiği metastatik alandaki farkla açıklanabilir (sırasıyla beyin ve kemik) (Stone K.R., vd., 1978; 13. Kaighn M.E., vd., 1979).

ZOL uygulaması sonrasında SHH yolak bileşenlerinin mRNA ve protein ifade değişiklikleri de PC3 ve DU145 grupları arasında farklılık göstermiştir. ZOL'a karşı daha duyarlı DU145 KKH'lerinde ZOL uygulaması sonrası SHH yolak bileşenlerinin ifade değişikliklerine bakıldığında hem 2D, hem de 3D kültürlerde SHH yolak bileşenlerinin mRNA ve protein ifadelerinde çoğunlukla [2D KKH'de SMO (-1,95/0,00) dışında] artma görüldü. ZOL'a karşı daha dirençli PC3 KKH'lerinde, SHH yolak bileşenlerinin gen ve protein ifadelerinde ZOL uygulamasından sonra saptanan değişiklikler DU145 KKH'den farklıydı; 2D PC3 KKH'lerinde SMO dışında diğer SHH yolak bileşenlerinin ifadelerinde azalma görülürken, 3D PC3 KKH'lerinde her hangi SHH yolak bileşeninin gen ve protein ifadesi etkilendiği görülmedi. KKH'ne benzer şekilde non-KKH' de de SHH yolak bileşenlerinin ifadelerinde ZOL etkisi ile görülen değişiklikler PC3 ve DU145 grupları arasında farklı oldu; DU145 non-KKH'de SMO ifadesinde azalma görülürken, GLI1 ve SHH ifadesinde ZOL etkisi ile artma saptandı. Buna zıt olarak, PC3 non-KKH' de etkilenen tek bileşen PTCH1 (gen ve protein ifadesinde azalma) ifadesi oldu. Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde, her iki DU145 2D ve 3D KKH ve non-KKH'lerinde SHH yolak aktivasyonunda ZOL uygulaması sonrası artma görüldü, fakat KKH' de (2D ve 3D) artma daha belirgin oldu. Buna zıt olarak, ZOL etkisi ile PC3 2D KKH' de SHH yolak aktivasyonunda azalma, PC3 KKH sferoidleri ve non-KKH'de ise her hangi anlamlı değişim olmadığı görülmüştür.

Elde ettiğimiz sonuçlar, DU145 KKH' lerinin (2D ve 3D ortamında kültürlenmiş) ZOL'a karşı geliştirdiği direncin SHH yolak aktivasyonunda artma ile ilişkili olabileceğini, buna zıt olarak, ZOL'a karşı daha yüksek dozda direnç geliştiren PC3 KKH' lerinde SHH yolak aktivasyonun direnç gelişiminde önemli rol oynamadığını gösterdi. ZOL etkisi ile SMO ve Rab23 ifadesinin DU145 KKH'de artması, non-KKH' de azalması, immunofloresan boyama sonucunda SMO'nun KKH'de siliyar membran yanı sıra tüm sitoplazmada yoğun şekilde boyanması, SHH yolağının SMO-bağımlı şekilde plazma membranın yanı sıra sitozolda da aktive olduğunu ve Rab23 ifadesindeki artma ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.



SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Zoladronik asit tedavisi sonrasında Rab23 GTP'az ifade ve işlevini etkilenmesi ve SHH yolak aktivasyonunun artması sonucunda KKH' lerde ZOL' a karşı direnç geliştiği hipotezini ileri sürdük. Bu hipotez doğrultusunda,

- DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinden izole edilmiş, iki ve üç boyutlu (2D ve 3D) kültür sisteminde kültürlenmiş prostat KKH' de Zoledronik asit ile müamile yaparak IC50 dozlarını belirledik,
- uygulama sonrasında Rab23 GTPaz ve SHH yolak bileşenlerinin (SHH, SMO, PTCH1 ve GLI1) ifade değişikliğini araştırdık,
- elde edilen verileri kontrol gruplarından elde edilen sonuçlar ve IC50 dozları ile karşılaştırarak SHH yolak aktivasyonu ve Rab23 ekspresyonu ile ZOL' a karşı direnç gelişimi arasında olası ilişkini inceledik.

Elde ettiğimiz sonuçlar,

- Prostat KKH'lerinin ZOL' a karşı daha dirençli olduğunu
- SHH yolak aktivasyonunun, ZOL' a karşı direnç gelişimi ile ilişkili olduğunu
- Rab23 GTP'zın SHH yolak aktivasyonunu pozitif şekilde düzenleyebileceğini ve SHH yolak-aracılıklı ZOL' a karşı ilaç direncinin gelişiminde önemli rol oynadığını
- SHH sinyallenmesi ve Rab23 GTPaz aktivasyonunun inhibe edilmesinin ZOL' un PCa' da kemoterapötik etkiyi artırabilir, sağkalımı, metastatik ilerleme ve gecikmiş tedavi başarısızlığı üzerinde iyileştirici etkiyle sonuçlanabileceğini
- PKKH' lerinin başarılı şekilde elimine edilmesi ve KKH-ilişkili PCa progresyonunun engellenmesi için potansiyel olarak yeni bir terapötik strateji sağlayabileceğini göstermektedir.

Üç boyutlu (3D) kültür sistemi *in vivo* ortama en yakın *in vitro* ortam olarak kabul edildiğinden, çalışmamızda elde edilen veriler güvenilir prelinik veriler özelliğine sahiptir. Çalışmamız bu konuda ilk olup elde edilen verilerin daha ileri fonksiyonel ve yapısal çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Özellikle kolesterol sentezinin önemli inhibitörü olan lovastatin kullanımı ile SHH yolak

aktivasyonunun engellediği gösterilmiştir, fakat bu çalışmada kolesterol sentezini bozduğu bildirilen Zoledronik asit uyguladığımızda SHH yolak aktivasyonunda KKH' lere özgü şekilde artma olduğunu saptadık. Bu artımın, KKH' lerin ZOL'a karşı geliştirdiği direnç mekanizmasından biri olarak daha detaylı şekilde araştırılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra SHH yolağı aktivasyonunda artma (DU145 KKH) ve azalma (PC3 KKH) görülen KKH'lerinin her iki grupunda da Rab23 ifadesinde artma görüldü. Rab23 ile SHH yolak aktivasyonu ve ZOL'a direnç gelişimi arasında olası ilişkinin fonksiyonel çalışma ile daha detaylı şekilde açıklanması gerekmektedir.



Kaynaklar

Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* 2000;31:578–83.

Hess, K., Varadhachary, G., Taylor, S., Wei, W., Raber, M., Lenzi, R. et al. (2006) Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* 106: 1624–1633.

Heymann MF, Brown HK, Heymann D. Drugs in early clinical development for the treatment of osteosarcoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016 Nov;25(11):1265-1280.

Hussain M, Tangen CM, Berry DL, et al. Intermittent versus continuous androgen deprivation in prostate cancer. *N Engl J Med* 2013;368:1314–25.

James ND, Sydes, MR, Clarke NW, et al. Adding docetaxel and/or zoledronic acid for hormone-naïve prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive multi-arm multi-stage platform randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016;

James ND, Sydes, MR, Clarke NW, et al. Adding docetaxel and/or zoledronic acid for hormone-naïve prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive multi-arm multi-stage platform randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016;

Kamiya N, Suzuki H, Endo T, Takano M, Yano M, Naoi M, et al. Additive effect of zoledronic acid on serum prostate-specific antigen changes for hormone-sensitive prostate cancer patients with bone metastasis treated by combined androgen blockade. *Int J Urol* 2012;19:169e73.

Kars MD, Iseri OD, Ural AU, Gunduz U. In vitro evaluation of zoledronic acid resistance developed in MCF-7 cells. *Anticancer Res* 2007; 27: 4031–4037.

Marta Prieto-Vila, Ryou-u Takahashi, Wataru Usuba, Isaku Kohama and Takahiro Ochiya. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int. J. Mol. Sci.* 2017,

Kaynaklar

Miller D.C, Hafez KS, Stewart A, Montie JE, Wei JT. Prostatecarcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update form the National Cancer Data Base. *Cancer* 2003;98:1169–78.

National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Prostate cancer version 1. 2013.

Nørgaard, M., Jensen, A., Jacobsen, J., Cetin, K., Fryzek, J. and Sørensen, H. (2010) Skeletal related events, bone metastasis and survival of prostate cancer: a population based cohort study in Denmark (1999 to 2007). *J Urol* 184: 162–167.

Okegawa T, Higaki M, Matsumoto T, Kase H, Murata A, Noda K, et al. Zoledronic acid improves clinical outcomes in patients with bone metastatic hormone-naïve prostate cancer in a multicenter clinical trial. *Anticancer Res* 2014;34:4415e20.

Ory B, Moriceau G, Trichet V, Blanchard F, Berreur M, Redini F et al. Farnesyl diphosphate synthase is involved in the resistance to zoledronic acid of osteosarcoma cells. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 928–941.

Pound, C., Partin, A., Eisenberger, M., Chan, D., Pearson, J. and Walsh, P. (1999) Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 281: 1591–1597.

Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008;19:733e59.

Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008;19:733e59.

Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory meta- static prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94: 1458e68.

Kaynaklar

Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory meta- static prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94: 1458e68.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9–29.

Uemura H, Yanagisawa M, Ikeda I, Fujinami K, Iwasaki A, Noguchi S, et al. Bone Metastasis Study Group. Possible anti- tumor activity of initial treatment with zoledronic acid with hormonal therapy for bone-metastatic prostate cancer in multicenter clinical trial. *Int J Clin Oncol* 2013;18:472e7.

Ueno S, Mizokami A, Fukagai T, Fujimoto N, Oh-Oka H, Kondo Y, et al. Efficacy of combined androgen blockade with zoledronic acid treatment in prostate cancer with bone metastasis: the ZABTON-PC (zoledronic acid/androgen blockade trial on pros- tate cancer) study. *Anticancer Res* 2013;33:3837e44.

Vale CL, Burdett S, Rydzewska LHM et al. Adding docetaxel or bisphosphonates to standard- of-care in men with localised or metastatic hormone-sensitive prostate cancer; a systematic review and meta-analysis of aggregate data. *Lancet Oncology*. 2016

Vale CL, Burdett S, Rydzewska LHM et al. Adding docetaxel or bisphosphonates to standard- of-care in men with localised or metastatic hormone-sensitive prostate cancer; a systematic review and meta-analysis of aggregate data. *Lancet Oncology*. 2016

Winter MC, Holen I, Coleman RE. Exploring the anti-tumour activity of bisphosphonates in early breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2008;34:453e75.

Yoshiyama A1, Morii T2, Ohtsuka K3, Ohnishi H3, Tajima T4, Aoyagi T1, Mochizuki K1, Satomi K1, Ichimura S1. Development of Stemness in Cancer Cell Lines Resistant to the Anticancer Effects of Zoledronic Acid. *Anticancer Res*. 2016 Feb;36(2):625-31

Kaynaklar

Zheng LQ, Chi SM, Li CX. Rab23's genetic structure, function and related diseases: a review. *Biosci Rep.* 2017 Mar 2;37(2).

Riobo N. A. (2012). Cholesterol and its derivatives in Sonic Hedgehog signaling and cancer. *Current opinion in pharmacology*, 12(6), 736–741. doi:10.1016/j.coph.2012.07.002

Gong B.X., Qian H., Cao P, Zhao X., Zhou Q., Lei J., Nieng Y. (2018). Structural basis for the recognition of Sonic Hedgehog by human Patched1. *Science*10. vol. 361 no. 6402. <https://doi.org/10.1126/science.aas8935>

Huang, P., Nedelcu, D., Watanabe, M., Jao, C., Kim, Y., Liu, J., & Salic, A. (2016). Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling. *Cell*, 166(5), 1176–1187.e14. doi:10.1016/j.cell.2016.08.003

Hasanovic, A., & Mus-Veteau, I. (2018). Targeting the Multidrug Transporter Ptch1 Potentiates Chemotherapy Efficiency. *Cells*, 7(8), 107. doi:10.3390/cells7080107

Teşekkür

Tez çalışmamın her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim boyunca manevi ve maddi desteğini esirgemeyen, bilgisinden her zaman faydalandığım, çok sevgili hocalarım; danışmanım Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM'e ve Doç Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya, her zaman yanımda olan, sevgi ve desteğini her zaman hissettiğim aileme ve sevgili eşim Moharram SHAMSALİ'ye, ekip arkadaşlarıma, özellikle tezin her laboratuvar aşamasında emeği olan sevgili Öğr. Gör. Eda AÇIKGÖZ'e, tezin araştırma projesi olarak desteklenmesini sağlayan EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: 16-TIP-079) ve Tulay Aktaş Onkoloji Hastanesi Araştırma Laboratuvarına, Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'na ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na, teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 22.01.2020

Günel MUKHTAROVA

Özgeçmiş

Adı	Günel
Soyadı	Mukhtarova
Adress	Bahcelievler, 509/5 st. No 9, Karabağlar, İzmir / Turkey
Telefon	Mobile: (+90) 553 430 5232
E – mail	gunelgursel@yahoo.com
Milliyeti	Azerbaycan
Doğum tarihi	28. 01. 1980
Medeni durumu	evli
Yabancı Dil	Azerbaycan, İngilizis, Rus, Türk
Eğitim	
2009 – 2017	Doktora: Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD, Ege Üniversitesi, İzmir / Türkiye
2015 –	Yüksek lisans (ikinci): Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ABD, Ege Üniversitesi, İzmir / Türkiye
2008 - 2009	TÖMER, İzmir, Türkiye
2004 - 2007	Yüksek lisans (birinci): Genetik ABD, AMİA, Azerbaycan Genetik Ehtiyatlar Enstitüsü /Baku Devlet Üniversitesi, Baku, Azerbaycan
1999 - 2003	Lisans: Biyoloji ABD, Baku Devlet Üniversitesi, Baku, Azerbaycan
	İş tecrübesi
2015 – 2016	Araştırmacı: Moleküler Araştırma Laboratuvarı, Histoloji – Embriyoloji ABD, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye
	Araştırmacı: Moleküler Araştırma Laboratuvarı, Tulay Aktaş Oncoloji

2016 - 2017	Hastanesi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye Yönetici: Spesfarma, Baku, Azerbaycan
2007 – 2008	
2005 – 2007	Tıbbi mümessil: Spesfarma, Baku, Azerbaycan
2004 - 2005	Araştırmacı: Genetik ABD, AMİA, Azerbaycan Genetik Ehtiyatlar Enstitüsü, Baku, Azerbaycan
2003 – 2004	Bioloji öğretmeni: 20 nolu Orta Okul, Shaki, Azerbaycan

Burslar

2012 – 2015	Yurt Dışı Türkler ve Akraba Toplulukları Bursu, İzmir, Türkiye
2008 – 2015	Azerbaycan Devlet Bursu, İzmir, Türkiye
2008 - 2012	Türkiye Devlet Bursu, İzmir, Türkiye
1999 - 2003	Azerbaycan Devlet Bursu, Baku Devlet Üniversitesi, Baku, Azerbaycan

Projeler

2016 - 2017	Prostat kanser kök hücrelerinde megalin ekspresyonunun Sonic Hedgehog (SHH) yolağı ile ilişkisinin değerlendirilmesi (16- FBE – 024) (Araştırmacı)
2016 – 2018	Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Ve Prostat Kanseri Kök Hücrelerinde Rab Ailesi Üyelerinin Ve Rab Gtpazlar Üzerinde Etkili Olan Moleküllerin Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi (16 - TIP – 083) (Araştırmacı)
2016 – 2018	Prostat Kanseri Kök Hücrelerinden Zoledronik Asitin Rab Gtpaz Ve Sonic-hedgehog Yolak Aktivasyonu Üzerinde Etkisi (16 – TIP – 079) (Araştırmacı)
2012 - 2015	MEFV geni mutasyonlarının Azerbaycan popülasyonlarında dağılımı (Araştırmacı)
2014 - 2016	Mefv Mutasyonları Pozitif Ve Negatif Olan Ailesel Akdeniz Ateşi (mf: Familial Mediteranean Fever) Hastalarında Nlrp3 Geni Mrna Değerlerinin

	Kolşisine Yanıt İle İlişkisi (14 – TIP – 081). (Araştırmacı)
2012 - 2014	Buğdayda Gliadin protein polimorfizminin araştırılması.
Katıldığı Sertifikalı, Uygulamalı Kurslar	
23 Nisan 2017	“Ümmuno- Onkoloji” kursu, Antalya, Türkiye
19 Nisan 2017	“ Kanser Tedavisinde Moleküler Onkoloji” kursu, Antalya, Türkiye
19 Nisan 2017	“Pediatrik Kanserlere Multidisipliner Yaklaşım” kursu, Antalya, Türkiye
30 Mart, 2016	“Kanser ve Genetik” kursu, Ege Onkoloji Günleri, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye
23 Şubat, 2016	“Kanser ve Genetik” kursu, II. Hematolojik Genetik Sempozyumu, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye
6-7 Nisan, 2015	“Kanser İmmunolojisi” kursu, Ege Onkoloji Günleri, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye
2013	“ Biyoinformatik “ kursu

Katıldığı Kongreler ve Sempozyumlar

19 – 23 Nisan, 2017	XXII Uluslararası Katılımlı Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, Türkiye
30 Nisan – 3 May, 2016	XIII Uluslararası Katılımlı Embriyoloji – Histoloji Kongresi, İzmir, Türkiye
30 Eylül – 3 Ekim, 2015	2.ci Hemotoloji Genetik Sempozyumu, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Uluslararası Toplantılarda Sunulan Bildiriler

18 – 21 May, 2017	Cuneyd Parlavan, Sule Ayla, Guvanch Ovezmyradov, <u>Gunel Mukhtarova</u> , Gulperi Oktem. Stem cell-induced differential gene expression profiles associated with apoptosis, necrosis and anoikis: Novel insights into cell death
-------------------	--

- mechanisms in prostate cancer. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Antalya, Turkey. DOI: 10.5505/2017ichc.OP-15
- 18 – 21 May, 2017
Günel Mukhtarova, Sule Ayla, Cuneyd Parlayan, Gulperi Oktem. Rab23 expression in prostate cancer stem cell. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Antalya, Turkey. DOI: 10.5505/2017ichc.PP-52
- 18 – 21 May, 2017
Gulperi Oktem, **Günel Mukhtarova**, Cuneyd Parlayan, Sule Ayla, Aslı Cakir, Selcuk Guven. Insignificant association between megalin expression in prostate cancer tissue and prostate cancer stem cells. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Antalya, Turkey. DOI:10.5505/2017ichc.PP-122
- 26 – 28 Eylül, 2016
G. Mukhtarova, E. Acikgoz, C. B. Avci, H. Aktug, S. Khan, G. Oktem. “ Association Beetwen Megalin Exspression And Sonic Hedgehog Pathway İn Prostate Cancer Stem Cell”. 11th. National Symposium on Prostate Cancer Clark Atlanta University, Atlanta, Georgia, USA
- 23 – 26 Şubat, 2016
A. Berdeli, A. Oz, **G. Mukhtarova**, S. Musayev. “ MEFV gene mutation distrubution in Azerbaijan population” 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases. 8th International Congress of FamilialMediterranean Fever and SystemicAutoinflammatory DiseasesDresden, Germany. 30 September - 3 October 2015
- 19 – 23 Nisan, 2017
Moharram Shamsali, **Günel Mukhtarova**, Ayfer Haydaroğlu. İnvestigation Of Assosiation Between T3801C Polymorphism of CYP1A1 Gene with Breast Cancer. National XXII Cancer Congress, Antalya, Turkey
- 19 – 23 Nisan, 2017
Günel Mukhtarova, Şüle Ayla, Cuneyd Parlayan, Gülperi Öktem. Expression Profile Of The Rab GTPase Family In The Prostate Cancer Stem Cell. National XXII Cancer Congress, Antalya, Turkey

YAYINLAR

A. Berdeli, A. Oz, **G. Mukhtarova**, S. Musayev. MEFV gene mutation distribution in Azerbaijan population. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2015; P127. doi: 10.1186/1546-0096-13- S1-P127

G. Mukhtarova, B. Goker, C.B. Avci, G. Oktem. Expression of Rab GTPases in cancer stem cell. (ready manuscript for submission)

G. Mukhtarova, N. S. Gunel, C.B. Avci, G. Oktem. Rab23 expression in cancer stem cell. (ready manuscript for submission)

G. Mukhtarova, E. Acikgoz, C.B. Avci, H. Aktug, G. Oktem. Megalin expression in prostate cancer stem cell (ready manuscript for submission)

G. Mukhtarova, E. Acikgoz, M. Shamsali, C.B. Avci, G. Oktem. Rab GTPases in Zoledronic acid treatment prostate cancer stem cell (ready manuscript for submission)

LABORATUVAR /ARAŞTIRMA BECERILERI

Hücre kültürü, Immunofloresence, Western Blotting, Immunochemistry, Revers Transcriptase PCR, PCR, RFLP, Kancer Biolojisi, Molekular Bioloji, Electroforez, İlaç Direncinin Geliştirilmesi

