

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İN VİTRO KOŞULLARDA DOSETAKSEL VE
ABİRATERON ASETAT UYGULAMASININ İNSAN
PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDEKİ NOTCH1,
JAGGED1 VE HES1 EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Hakan SOYLU

DOKTORA TEZİ

2017-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***İN VİTRO* KOŞULLARDA DOSETAKSEL VE
ABİRATERON ASETAT UYGULAMASININ İNSAN
PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDEKİ NOTCH1,
JAGGED1 VE HES1 EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Hakan SOYLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Bülent ÖZPOLAT

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
TDK- 2016 -1395 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 13/10/2017

Tez : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Hasan Şenol COŞKUN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Sait POLAT
Çukurova Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Engin YENİLMEZ
Karadeniz Teknik Üniversitesi

İmza






Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Hakan SOYLU

İmza


Tez Danışmanı

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

İmza


TEŐEKKÜR

En baŐta hayatımdaki en anlamlı varlık olan değerli eŐim Yasemin SOYLU'ya teŐekkür ediyorum. Doktora yıllarımın baŐlangıcından itibaren bana hep destek olan her zaman yanımda olan, anlayıŐını ve sevgisini benden hiç esirgemeyen değerli eŐime çok teŐekkür ederim.

Çok değerli, dünya tatlısı, yaşama sevincim oğlum Adem Said SOYLU'ya bana sevgisiyle vermiş olduğu manevi destekten dolayı çok teŐekkür ederim.

Saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL'e bir danışman hoca olarak yol göstermenin yanında, bir baba Őefkatiyle bizden desteğini hiç esirgemediği için çok teŐekkür ederim.

İkinci danışman hocam Prof. Dr. Bülent ÖZPOLAT'a tezime vermiş olduğu katkılarından dolayı teŐekkür ederim.

Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalıŐanlarına, hem eğitim hayatım, hem de kişisel gelişimime yaptıkları katkılar için çok teŐekkür ederim.

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm çalıŐanlarına vermiş olduğu desteklerden dolayı çok teŐekkür ederim.

Tez çalıŐmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaŐım AraŐ. Gör. Mustafa KIRÇA'ya teŐekkür ederim.

Akademik kariyerimin baŐlangıcında Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ailesine katılmama vesile olan ve uzakta da olsa her zaman yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Meryem ÇAM'a çok teŐekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Prostat kanseri (PCa) erkeklerde gözlenen en yaygın kanser türüdür. Erkeklerde kanserle ilişkili ölümlerde ikinci sırayı almaktadır. PCa tedavisinde kullanılan dosetaksel ve abirateron asetatın, hücre proliferasyonu, farklanması ve kaderinde önemli bir yolak olan Notch sinyal yolağı üyelerinin ekspresyonlarını nasıl etkilediği ve bu ekspresyonların tedavi sürecini nasıl etkileyeceğine ilişkin literatürde şu ana kadar herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, abirateron asetat ve dosetaksel'in prostat kanseri hücre hatlarında, Notch1, Jagged1 ve Hes1 ekspresyonlarına etkilerini araştırmak şeklinde belirlendi.

Yöntem: *In vitro* koşullarda; LNCaP ve PC3 hücre hatları 37 °C'de 72 saat kültüre edildikten sonra, abirateron asetat ve dosetaksel'in Notch1, Jagged1 ve Hes1 ekspresyonu üzerindeki etkileri MTT proliferasyon testi, immünofloresan, western blot ve qRT-PCR teknikleriyle incelendi.

Bulgular: Çalışmada, PC3 hücrelerine abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel, Notch1 düzeyini düşürürken, özellikle Hes1'in mRNA düzeyini çok önemli düzeyde artırdı. LNCaP hücrelerinde, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel, Notch1 ekspresyonunu azalttı. Jagged1 ekspresyonu, abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel uygulamasından önemli ölçüde etkilenmedi. Hes1 ekspresyonu, tüm ilaç gruplarında, hem gen hem de protein düzeyinde önemli ölçüde arttı.

Sonuç: *In vitro* koşullarda prostat kanseri hücrelerine abirateron asetat ve dosetaksel uygulandığında, Notch sinyal yolağı proteinlerinin ekspresyonları değişti. Bu ilaçların uygulanması ile; her iki hücre hattında da, özellikle Hes1 ekspresyonu çok anlamlı oranda artış gösterdi. Dolayısıyla, prostat kanserli hasta tedavisinde, bu kemoterapötik ilaçlarla birlikte, Notch sinyal yolağı inhibitörlerinin birlikte uygulanmasının, Hes1 ekspresyonunu azaltabileceği ve hastanın prognozundaki kötüye gidişi durdurulabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: prostat, kanser, notch, abirateron asetat, dosetaksel

ABSTRACT

Objective: Prostate cancer (PCa) is the most common type of cancer observed in men. In men, it ranks second in cancer-related deaths. There have been no studies yet in the literature about how the expression of Notch signaling pathway members, an important pathway in cell proliferation, differentiation and fate are affected by docetaxel and abiraterone acetate used in PCa treatment, and how these expressions will affect the treatment process. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of abiraterone acetate and docetaxel on the expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 in prostate cancer cell lines.

Method: After LNCaP and PC3 cell lines were cultured at 37 °C for 72 h *in vitro*, the effects of abiraterone acetate and docetaxel on Notch1, Jagged1 and Hes1 expression were examined by MTT proliferation assay, immunofluorescence, western blot and qRT-PCR.

Results: According to the findings obtained from our study; while abiraterone acetate, docetaxel and abiraterone acetate + docetaxel to PC3 cells was decreasing the level of Notch1, especially increased the level of mRNA for Hes1 at very important level. Abiraterone acetate and abiraterone acetate + docetaxel reduced Notch1 expression in LNCaP cells. In LNCaP, Jagged1 expression was not significantly affected by abiraterone acetate, docetaxel and abiraterone acetate + docetaxel administration. Hes1 expression was significantly increased in both gene and protein level groups at all drug groups.

Conclusion: When abiraterone acetate and docetaxel were administered to prostate cancer cells *in vitro*, the expression of Notch signaling pathway proteins changed. With the application of these drugs; in both cell lines, especially Hes1 expression showed a very significant increase. Therefore, co-administration of Notch signaling pathway inhibitors together with these chemotherapeutic drugs in the treatment of prostate cancer patients, It was thought that Hes1 expression could be stopped the deterioration of the prognosis of the patient.

Key words: prostate, cancer, notch, abiraterone acetate, docetaxel

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Bezi	3
2.1. Prostat Kanseri	6
2.3. Notch Sinyal Yolağı	8
2.3.1. Kanonikal Notch Sinyali	9
2.3.2. Kanonikal Olmayan (Non Kanonikal) Notch Sinyali	12
2.4. Prostat Kanseri ve Notch ilişkisi	13
2.4.1. Prostat Kanseri Proliferasyonu ve Notch İlişkisi	15
2.4.2. Prostat Kanserinde Apoptosis/Anoikis ve Notch İlişkisi	17
2.4.3. Prostat Kanseri Gelişiminde Hipoksi ve Notch İlişkisi	18
2.4.4. Prostat Kanserinde Hücre İnvazyonu, Metastazı ve Notch İlişkisi	19
2.4.5. Prostat Kanserinde Anjiyogenez ve Notch ilişkisi	20
2.4.6. Prostat Kanseri Metastazı ve Notch ilişkisi	20
2.5. Prostat Kanseri Tedavisi	21
2.5.1. Doksetaksel	23
2.5.2. Abirateron Asetat	24
2.6. PC-3 ve LNCaP Hücre Hatları	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Hücre Kültürü	27

3.1.1. Hücre Pasajlanması	29
3.1.2. Hücrelerin Dondurulması	29
3.2. Grupların Belirlenmesi	30
3.3. MTT Proliferasyon Testi ile İlaç Dozlarının Belirlenmesi	30
3.4. Western Blot Analizi	33
3.4.1. PC3 ve LNCaP Hücre Lizatı Hazırlama	33
3.4.2. Protein Miktarının Belirlenmesi	34
3.4.3. SDS-PAGE Western Blot Protokolü	35
3.5. İmmünofloresan Boyanma ve Analizi	36
3.6. Kantitatif RT-PCR Analizi	38
3.6.1. Total RNA İzolasyonu	38
3.6.2. İzole Edilen RNA'lara DNaz Uygulaması	39
3.6.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	40
3.6.4. qRT-PCR Uygulama Basamakları	41
3.7. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	45
4.1. MTT Proliferasyon Testi Bulguları	45
4.1.1. Abirateron Asetat ve Dosetaksel'in Farklı Dozları ile 24 Saat İnkübasyon	46
4.1.2. Abirateron Asetat ve Dosetaksel'in Farklı Dozları ile 48 Saat İnkübasyon	49
4.1.3. Abirateron Asetat ve Dosetaksel'in Farklı Dozları ile 72 Saat İnkübasyon	52
4.1.4. Abirateron Asetat ve Dosetaksel'in Farklı Dozları ile 96 Saat İnkübasyon	56
4.1.5. Abirateron Asetat ve Dosetaksel'in Farklı Dozları ile 120 Saat İnkübasyon	60
4.2. Proliferasyon Testi Bulgularına Göre, En Etkin Süre ve Dozun Belirlenmesi	64
4.2.1. En etkin sürenin belirlenmesi	64
4.2.2. En etkin dozun belirlenmesi	66
4.3. İmmünofloresan Analizi Bulguları	70
4.4. Western Blot Bulguları	82
4.5. Kantitatif Real Time PCR Bulguları	88
5. TARTIŞMA	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	100

KAYNAKLAR

102

ÖZGEÇMİŞ

120



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3. 1. Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	36
Tablo 3. 2. İmmünofloresan analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	38
Tablo 3. 3. qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler	42



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1.** 96 kuyucuklu platede MTT proliferasyon testi sonucu kuyucuklardaki renk değişimi görünümü 42
- Şekil 4.2.** PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 24 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 43
- Şekil 4.3.** LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 24 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 44
- Şekil 4.4.** PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 46
- Şekil 4.5.** LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 48
- Şekil 4.6.** PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 50
- Şekil 4.7.** LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 52
- Şekil 4.8.** PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 96 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 54
- Şekil 4.9.** LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 96 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 56
- Şekil 4.10.** PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 120 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 58
- Şekil 4.11.** LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 120 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonucu 60

Şekil 4.12. PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 24, 48, 72, 96 ve 120 saat inkübasyonu sonrasındaki MTT proliferasyon testi sonucu	61
Şekil 4.13. LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 24, 48, 72, 96 ve 120 saat inkübasyonu sonrasındaki MTT proliferasyon testi sonucunun analizi	62
Şekil 4.14. PC3 hücrelerinde MTT proliferasyon testi sonucuna göre abirateron asetatın IC50 değerini gösteren grafik	63
Şekil 4.15. PC3 hücrelerinde MTT proliferasyon testi sonucuna göre desetakselin IC50 değerini gösteren grafik	63
Şekil 4.16. LNCaP hücrelerinde MTT proliferasyon testi sonucuna göre abirateron asetatın IC50 değerini gösteren grafik	64
Şekil 4.17. LNCaP hücrelerinde MTT proliferasyon testi sonucuna göre desetakselin IC50 değerini gösteren grafik	64
Şekil 4.18. PC3 hücrelerinde belirlenen IC50 değerlerinin 72 saat inkübasyonu sonrasında etkinliklerinin değerlendirilmesi	65
Şekil 4.19. LNCaP hücrelerinde belirlenen IC50 değerlerinin 72 saat inkübasyonu sonrasında etkinliklerinin değerlendirilmesi	66
Şekil 4.20. PC3 hücrelerinde NOTCH1 proteini ekspresyonu	67
Şekil 4.21. PC3 hücrelerinde NOTCH1 proteininin immunofloresan analizi	68
Şekil 4.22. LNCaP hücrelerinde NOTCH1 proteini ekspresyonu	69
Şekil 4.23. LNCaP hücrelerinde NOTCH1 proteininin immünofloresan analizi	70
Şekil 4.24. PC3 hücrelerinde JAGGED1 proteini ekspresyonu	71
Şekil 4.25. PC3 hücrelerinde JAGGED1 proteininin immünofloresan analizi	72

Şekil 4.26. LNCaP hücrelerinde JAGGED1 proteini ekspresyonu	73
Şekil 4.27. LNCaP hücrelerinde JAGGED1 proteininin immünofloresan analizi	74
Şekil 4.28. PC3 hücrelerinde HES1 proteini ekspresyonu	75
Şekil 4.29. PC3 hücrelerinde HES1 proteininin immünofloresan analizi	76
Şekil 4.30. LNCaP hücrelerinde HES1 proteini ekspresyonu	77
Şekil 4.31. LNCaP hücrelerinde HES1 proteininin immünofloresan analizi	78
Şekil 4.32. PC3 hücrelerinde NOTCH1 proteini Western Blot sonuçları	79
Şekil 4.33. LNCaP hücrelerinde NOTCH1 proteini Western Blot sonuçları	80
Şekil 4.34. PC3 hücrelerinde JAGGED1 proteini Western Blot sonuçları	81
Şekil 4.35. LNCaP hücrelerinde JAGGED1 proteini Western Blot sonuçları	82
Şekil 4.36. PC3 hücrelerinde HES1 proteini Western Blot sonuçları	83
Şekil 4.37. LNCaP hücrelerinde HES1 proteini Western Blot sonuçları	84
Şekil 4.38. PC3 ve LNCaP hücrelerinde NOTCH1 mRNA'sının qRT-PCR ile analizi	85
Şekil 4.39. PC3 ve LNCaP hücrelerinde JAGGED1 mRNA'sının qRT-PCR ile analizi	86
Şekil 4.40. PC3 ve LNCaP hücrelerinde HES1 mRNA'sının qRT-PCR ile analizi	87

SİMGELER ve KISALTMALAR

22Rv1	: İnsan prostat karsinoma epitelyal hücre hattı
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABI	: Abirateron asetat
ABI+DC	: Abirateron asetat + Doksetaksel
ADAM/TACE	: <i>ADAM</i> Metallopeptidase Domain 17 / Tumor necrosis factor alpha converting enzyme
AKT	: Protein kinase B (PKB)
AR	: Androjen reseptörü
ATCC	: American Type Culture Collection
BCA	: Bicinchoninic acid
bHLH	: Basic-helix-loop-helix
BPH	: Benign prostatik hiperplazi
BSA	: Bovin serum albumin
C4-2B	: LNCaP hücrelerinin nude fare inokülasyonu sonrasında kemik metastazından elde edilen hücreler
CBF1	: C-repeat/DRE binding factor 1
CBP	: CREB binding protein
CDK2	: Cyclin-dependent kinase 2
cDNA	: Komplementer DNA

CK14	: Cytokeratin 14
CK18	: Cytokeratin 18
CK5	: Cytokeratin 5
CK8	: Cytokeratin 8
CR	: Sisteinden zengin
CRPC	: Castration-resistant prostate cancer
CSL	: CBF1, Su(H) ve LAG-1'den ismini alır
CtBP	: C-terminal-binding protein
CtIP	: C-terminal-binding protein interacting protein
CYP17A1	: Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1
CYP3A4	: Cytochrome P450 3A4
DAPI	: 4,6 Diamidino-2 phenylindole
DC	: Doseetaksel,
DHEA	: Dihidroepiandrostenedion
Dll3	: Delta like 3
Dll4	: Delta like 4
Dll1	: Delta like 1
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat

DSL	: Delta, Serrate ve LAG-2
DU145	: Prostat kanseri beyin metastazından elde edilmiş hücre hattı
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EMT	: Epitelial mezenkimal geçiş
FBS	: Fötal Bovine Serum
FGF18	: Fibroblast growth factor 18
FoxM1	: Forkhead box protein M1
GSK3β	: Glycogen synthase kinase 3 beta
HES	: Hairy and Enhancer of Split
HEY	: Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein
HGPIN	: High-grade prostatic intraepithelial neoplasia
HIFU	: Yüksek Yoğunluk Odaklı Ultrason
IC50	: Maksimum inhibisyon yapan dozun yarısı
kDa	: Kilo dalton
LAPC4	: Ksenograft lenf nodu metastazından elde edilmiş insan prostat kanser hücre hattı
MAML	: Mastermind-like protein 1
mCRPC	: Metastatic castration-resistant prostate cancer
MMLV	: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

MMP9	: Matriks metalloproteinaz-9
mRNA	: Messenger RNA
mTOR	: Mammalian target of rapamycin
MTS	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
MTT	: 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromidin
NADH	: Nicotinamide adenine dinucleotide hydride
NADPH	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NED	: Nöroendokrin diferansiyasyonu
NF-κB	: Nüklear faktör kappa B
NICD	: Notch reseptörü hücre içi domeyni
PBS	: Phosphate Buffer Saline
Pca	: Prostat kanseri
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Pİ3K	: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PİK	: Proteaz İnhibitör Kokteyli
PİN	: Prostatic intraepithelial neoplasia
PİP2	: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PİP3	: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PSA	: Prostat spesifik antijen

PSCA	: Prostate stem cell antigen
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
PTOV1	: Prostat Tumor Overexpressed-1
PVDF	: Poliviniliden Florid
qRT-PCR	: Quantitative real time PCR
RBP-J	: Recombining binding protein suppressor of hairless
RDD	: RDF (Resource Description Framework) Declarative Description
RNA	: Ribo Nükleik asit
RPMI 1640	: Roswell Park Memorial Institute 1640
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	: Small interfering RNA
SMRT/NcoR	: Nuclear hormone receptor corepressors
Su(H)	: Suppressor of hairless
TAN-1	: Translocation-associated notch protein 1
TBS	: Tris-buffered saline
TBS-T	: Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20
TCR-β	: T hücre reseptörü- β
TRAMP	: Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate
uPA	: Ürokinaz plazminojen aktivatörü

UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler büyüme faktör reseptörü
WNT	: Wingless/Integrated
WST	: Water-soluble tetrazolium
XTT	: Sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6nitro) benzene sulfonic acid hydrate



1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Prostat bezi yaklaşık 25 gram ağırlığında kestane büyüklüğünde erkek üreme sisteminin bir parçası olan en büyük aksesuar bezdir. Prostat bezinin en önemli fonksiyonu testisten gelen sperm hücreleri ve diğer bezlerden gelen salgılar ile birlikte semeni oluşturmaktır. Prostat insanlarda mesanenin hemen altında üretranın boyun bölgesini kuşatmış şekilde yerleşmiştir (Prajapati ve ark., 2013).

Prostat kanseri (PCa) erkeklerde en sık teşhis edilen tümör tipi olup önemli bir sağlık problemidir. Prostat kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) kanser ile ilişkili ölümlerde ikinci sırayı almaktadır (Siegel ve ark., 2016). Prostat kanseri hastalarına ilk olarak androjen baskılayıcı tedaviler uygulanır, ancak bir süre sonra çoğu hastada androjen baskılayıcı tedavilere cevap vermeyen dirençli bir prostat kanseri formu meydana gelir. Belli bir küratif tedavisi olmayan bu kanser kastrasyona dirençli prostat kanseri (CRPC) olarak bilinmektedir. Prostat kanseri tedavileri için yeni stratejilerin geliştirilmesi ile prostat kanserinin bu ölümcül formuna tutulan hastalarda hayatta kalma sonuçlarının artırılması arzu edilir (Wang ve ark., 2010).

Transmembran reseptörlerinden Notch ailesi hücre kaderinin belirlenmesinin önemli düzenleyicileridir. Buna göre Notch sinyal yolağı çok sayıda dokunun gelişimine derinden katılmaktadır. Son yapılan çalışmalar, Notch sinyal yolağının normal prostat gelişiminde kritik bir rolünün olduğunu göstermiştir. Notch sinyalleri, embriyonik ve postnatal prostatik büyüme ve gelişim için, prostat içerisinde hücrelerin olması gereken bölgede özelleşmesinin sağlanması için gereklidir (Grishina ve ark., 2005; Wang ve ark., 2006). Bunların yanında yetişkin prostatında bütünlüğün korunması ve kastrasyon veya hormon baskılayıcı tedavileri takiben yenilenme süreci için Notch sinyalleri gereklidir. Ayrıca Notch sinyallerinin prostat kanseri gelişimi, ilerlemesi ve metastazı için bir düzenleyici olduğu belirlenmiştir (Leong ve Gao, 2008).

Prostat kanseri ve Notch sinyal yolu ilişkisi konusu yapılan bir çok çalışmaya rağmen halen tartışmalı ve aydınlatılması gerekmektedir. Dahası abirateron asetat ve dosetaksel

ile prostat kanseri tedavisi ve Notch sinyal yolağı ilişkisini aydınlatan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Prostat kanseri tedavilerinin başarı oranını arttırabilmek için bu kemoterapi ilaçlarının hücreler üzerinde meydana getirdiği moleküler düzeyde değişikliklerin aydınlatılması ve araştırılması gerekmektedir. Konuyu biraz daha açmak gerekirse, prostat kanserinin dosetaksel ve abirateron asetat ile tedavi sürecinde Notch sinyal yolağı üyelerinin ekspresyonlarının nasıl etkilendiği ve bu ekspresyonların tedavi sürecini nasıl etkileyeceğine ilişkin literatürde henüz herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmanın gerçekleştirilmesi, prostat kanseri tedavilerinde önemli bir eksikliği gidereceği ve moleküler düzeyde prostat kanseri tedavilerinin aydınlatılması açısından yeni çalışmaların önünü açacağı inancındayız.

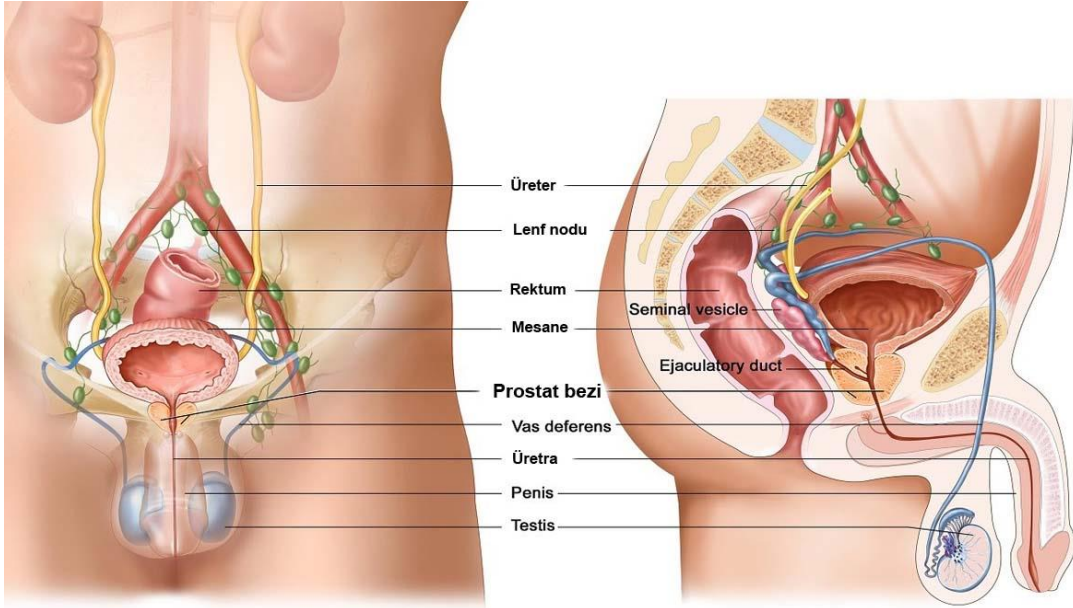
Bu çalışmada, prostat kanserinin kemik metastazından izole edilmiş PC3 ve prostat kanserinin subklavikular lenf düğümünden izole edilmiş LNCaP hücre hatları kullanıldı. Bu hücelere kültür ortamında klinikte prostat kanseri tedavisinde kullanılan abirateron asetat ve dosetaksel kemoterapi ilaçları uygulandı. Bu uygulamalar sonrasında, Notch sinyal yolağı üyelerinin ekspresyon değişimleri araştırıldı. Bu alışma ile klinikte prostat kanseri tedavisinde kullanılan abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat + dosetaksel kombine tedavisi sonrasında prostat kanseri hücrelerinde Notch1, Jagged1 ve Hes1 ekspresyonlarının nasıl etkilendiği moleküler düzeyde aydınlatılmaya çalışıldı.

Bu çalışmanın amacı, *in vitro*'da PCa hücre hatlarında, tedavi amaçlı kullanılan dosetaksel, abirateron asetat ve dosetaksel + abirateron asetat kombinasyonu uygulamasının, kültür ortamlarında çalışılan hücrelerde Notch sinyal yolağı üyelerinden Notch1, Jagged1 ve Hes1'in ekspresyonlarına etkisinin araştırılmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

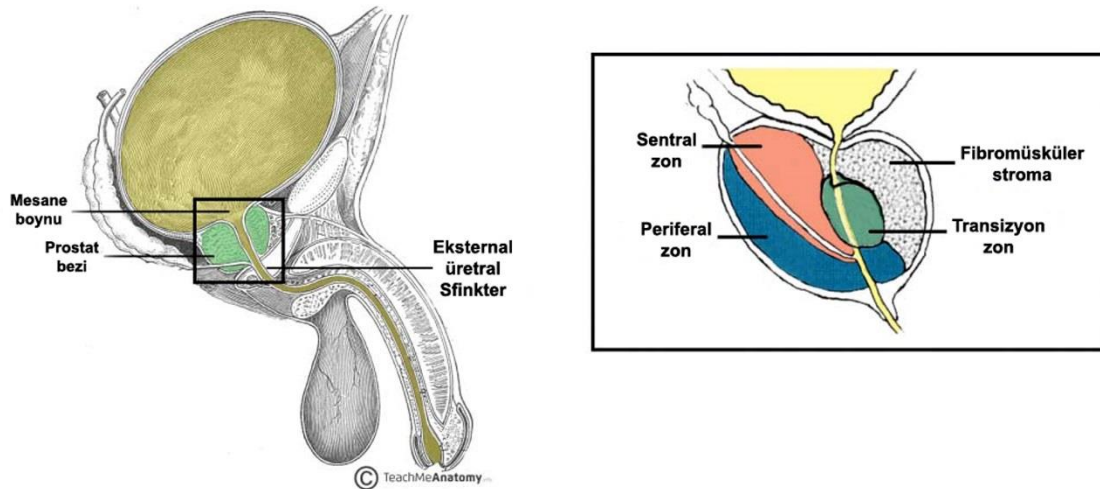
2.1. Prostat Bezi

Prostat bezi bütün erkek memelilerde korunmuş olan başlıca tübüloalveolar ekzokrin bir bezdir (Şekil 2.1.). Bu bez bireyin yaşamını sürdürebilmesi için hayati öneme sahip değildir, ancak türlerin doğal olarak üreyebilmesi için temeldir. Prostat mesanenin hemen altında üretrayı kuşatan bir organdır. Organ en dıştan fibroelastik bir kapsül ile çevrelenmiş ve kapsülün organ içerisine septumlar göndermesi ile prostat bezi, anterior, posterior, medial ve iki lateral loba ayrılmıştır. Bu loblar, dallanmış 30-50 adet tubuloalveolar bez, 16-32 adet sekretuar kanal, yoğun stroma, kan damarları, lenf damarları ve sinirler içerir. Normal prostat yapısında, bu lobların ayrımı yapılamamaktadır, bununla birlikte benign prostatik hiperplazi gelişimi sırasında bu lobülasyonların ayrımı yapılabilmektedir (Kumar ve Majumder, 1995). Sıçan prostatı, her biri kendi işlevine sahip dorsal, ventral ve lateral gibi ayrı ve ayrı anatomik loblarla karakterizedir. İnsan ve köpekte, bunlara karşılık gelen anatomik loblar belirgin olmayıp, sadece anatomik olarak tek bir üniform prostat olarak görünen alanlar görülebilir (Frick ve Aulitzky, 1991).



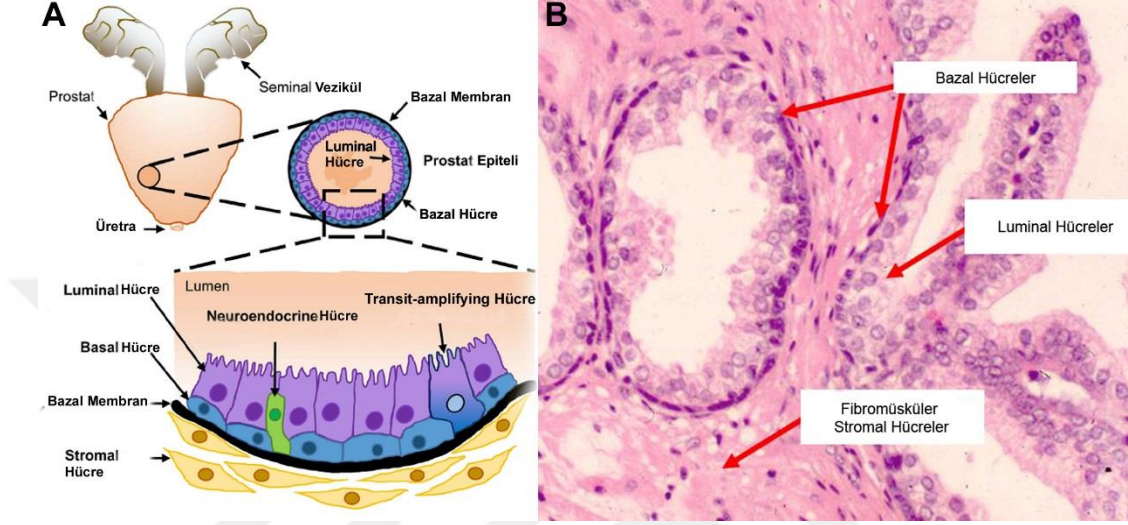
Şekil 2.1. Prostat bezi anatomisi ve komşuluğunda bulunan organlar (<https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR450023.jpg>, Erişim tarihi: 16.08.2017).

İnsan prostat bezi morfolojik olarak heterojenik bir organdır. Organ fibroelastik kapsülün sıkıca kuşattığı glandular ve nonglandular alanlardan oluşmaktadır. Glandular alanlarda bol miktarda bez bulunmaktadır ve bezlerin bulunduğu alan üç zona ayrılır; hastalıklara dirençli olan sentral zon, karsinogenez ve inflamasyona daha duyarlı olan periferel zon ve BPH (Bening Prostatik Hiperplazi) 'ye duyarlı olan transizyon zonu'dur (Şekil 2.2). Bu zonları da yoğun kesintisiz fibromusküler stroma kuşatır (McNeal, 1984; McNeal ve Bostwick, 1984; Timms, 2008). Sentral zon, toplam glandular kitlenin %30'nu kapsamakta ve bu alan, histolojik olarak; kanal sisteminin dallanması karmaşık, bezlerin terminal kesecikleri büyük, stroma yoğun ve kollajen liften zengin, asinuslar lobüler olarak düzenlenmektedir (Şekil 2.2). Periferel zon, toplam glandular kitlenin %70'ini kapsamakta ve bu alanda; kanal sisteminin dallanması basit, bezlerin terminal kesecikleri küçük, stroma gevşek ve yumuşak, asinuslar eşit bir şekilde dağılım gösterir (Şekil 2.2). Transisyonel zonun bez yapısı, periferel zona benzerlik gösterir (Şekil 2.2.) (Salander ve ark., 1981; McNeal, 1988). Glandular alanlar, epitelyal ve stromal hücreler olarak isimlendirilen iki tip hücreden oluşur (Şekil 2.3.). Epitelyal hücreler bazal, luminal, nöroendokrin ve transit-amplifying olarak isimlendirilen dört tip hücreden oluşur (Şekil 2.3.) (Prajapati ve ark., 2013). Stromal hücreler düz kas hücreleri, fibroblastlar ve myofibroblastlar gibi hücre tiplerini içerir (Takao ve Tsujimura, 2008).



Şekil 2. 2. Prostat bezinin anatomik konumu ve bölgeleri. (<http://teachmeanatomy.info/pelvis/the-male-reproductive-system/prostate-gland/>, Erişim tarihi: 7 Ağustos 2017)

Nonglandular alanlar (Bez yapısı dışındaki alanlar), fibromüsküler yapıda olup, prostat kitlesinin % 30'unu oluşturur. Nonglandular alanlar düz kas hücreleri, fibroblastlar, bağ doku ve kan damarlarından oluşmaktadır (McNeal, 1988).



Şekil 2.3. Prostat bezinin glandular alanlarında bulunan asinuslarda yer alan hücreler ve yerleşimi, **A)** prostat bezi asinusunda yer alan hücrelerin şekli ve yerleşiminin şematik çizimi, **B)** Prostat bezi kesitinde asinusların ve etrafında yer alan stromal hücrelerin görünümü (Hematoksilen&Eozin) (Rybak ve ark., 2015).

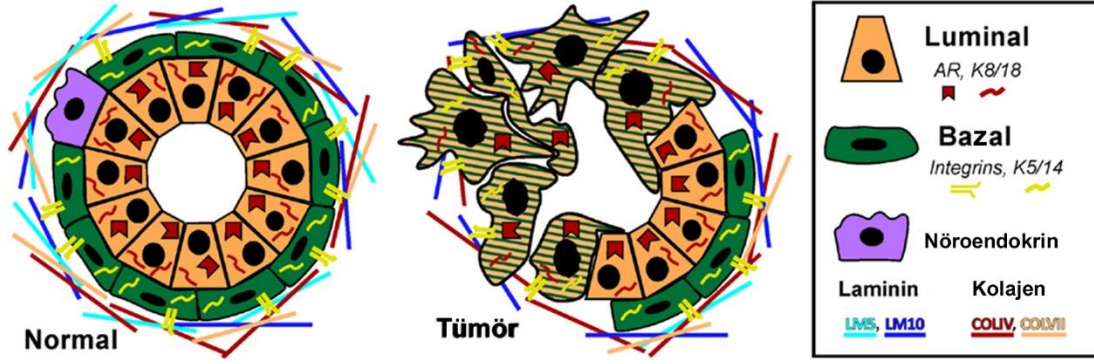
Prostat bezinin fonksiyonu, kopülasyon sırasında, seminal vezikül ile birlikte salınan seminal sıvının büyük bir kısmını üretmektir. Prostat bezi salgısı, basit şekerler (glikoz ve fruktoz gibi), sitrik asit, lipidler, proteolitik enzimler (prostate-spesifik antijen [PSA] gibi), çinko (kuru ağırlığının 100 gr'da 50 mg, prostat en yüksek çinko konsantrasyonuna sahip organdır), asit fosfataz (sperm hareketi ve canlılığı için önemli olup oositin doğal fertilizasyonu için de gereklidir) (Pennefather ve ark., 2000) ve alkalin kimyasalları içeren süt beyazlığında bir karışımdır. Prostat bezi tarafından sentezlenen şekerlerin görevi, spermelere oosit fertilizasyonu gerçekleşinceye kadar besin sağlamaktır. Prostat salgısı içerisindeki enzimler, ejakülasyon sonrasında visköz özellik gösteren semenin içerisindeki proteinleri parçalayarak semen içerisindeki spermelerin serbest hale gelmesini sağlarlar. Prostat bezi salgısı içerisindeki alkalin kimyasallar, asidik vajinal sekresyonların nötralizasyonunu sağlayarak spermelerin hayatta kalmasına yardımcı olurlar (Menche, 2012; Gruyter, 2014).

Prostat bezi, BPH, prostat kanseri ve prostatitis olmak üzere başlıca 3 tip hastalık ile ilişkilendirilir. BPH ve prostat kanseri yaşlı erkeklerde prostat bezinin en yaygın

patofizyolojik bozukluğudur. Zaten bu hastalıklar dünyanın birçok yerinde sağlık sistemleri için önemli bir problemdir. Epidemiyolojik olarak BPH Asya popülasyonlarında daha yaygındır (Denis ve ark., 1999; Gaynor, 2003). Prostat kanseri ise batı dünyasında daha yaygındır. Her iki hastalık ta oldukça kompleks olup birçok oluşumlarında birçok faktör etkili olabilir. Bu faktörler oksidatif stres, çevresel kirlilikler, inflamasyon, kalıtım, yaşlanma, stromal ve epitelyal hücreler arasındaki karşılıklı etkileşim gibi faktörler olabilir (Nickel ve ark., 1999; Barclay ve ark., 2005). Bu hastalıkların yanı sıra, prostat biyopsilerinde tesbit edilen bir diğer bozukluk, prostat kanserinin potansiyel prokürsörlerinden biri olan high-grade prostatik intraepitelyal neoplazi (HGPIÑ)'dir. HGPIÑ'li erkeklerde, sonraki yaşam sürecinde, prostat kanseri teşhisi koyulma riski çok yüksektir. HGPIÑ tesbiti sonrasında, tekrarlayan biyopsiler ile PCa teşhis oranı %2, 3'den %100'e kadar değişmektedir (Aboseif ve ark., 1995; Park ve ark., 2001).

2.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, erkek bireylerde çok sıklıkla karşılaşılan ve çoğunlukla ölümlü sonuçlanan malign non-kutanöz bir hastalıktır (Siegel ve ark., 2014). Prostat kanseri daha çok prostatik bezlerde oluşan prostatik adenokarsinom olarak gözlenir. Prostat-spesifik antijen (PSA) taraması tekniği, bu hastalığın teşhisini önemli ölçüde kolaylaştırmıştır (Baade ve ark., 2004). Prostat kanseri'nin görülme sıklığı, ırka göre değişmekle birlikte, hastalık genellikle 65 yaşından sonra teşhis edilir. Prostat kanseri yaş, ırk, aile geçmişi ve diyet gibi birkaç risk faktörü ile ilişkilendirilmektedir (Gronberg, 2003). Prostat kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki erkekler arasında en yüksek insidansa ve ikinci en yüksek mortalite oranına sahiptir. Prostat kanseri teşhisi konulmuş erkeklerin % 22 sinde hastalık metastatik evrededir. 60-69 yaşları arasındaki erkeklerin yaklaşık %7 sinde lokal veya bölgesel prostat kanseri teşhisi konulmaktadır ve bu hastalarda ilerleyen süreçlerde genellikle metastatik durum ortaya çıkar. 70 yaş ve üzeri erkeklerde ise metastatik prostat kanseri görülme olasılığı %13.83'dür. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2017 yılında, 161360'den fazla yeni prostat kanseri vakasının meydana geleceği ve 26730'un üzerinde prostat kanseri nedeniyle ölüm gerçekleşeceği tahmin edilmektedir (Siegel ve ark., 2017).



Şekil 2.4. Normal ve tümörlü prostat bezi epiteli yapısı. Normal prostat epiteli yapısında bazal hücreler ve üzerine oturan luminal hücrelerin oluşturduğu bilaminar yapı görülür. Prostat tümöründe ise bazal hücrelerin kaybı gözlenir (Frank ve Miranti, 2013).

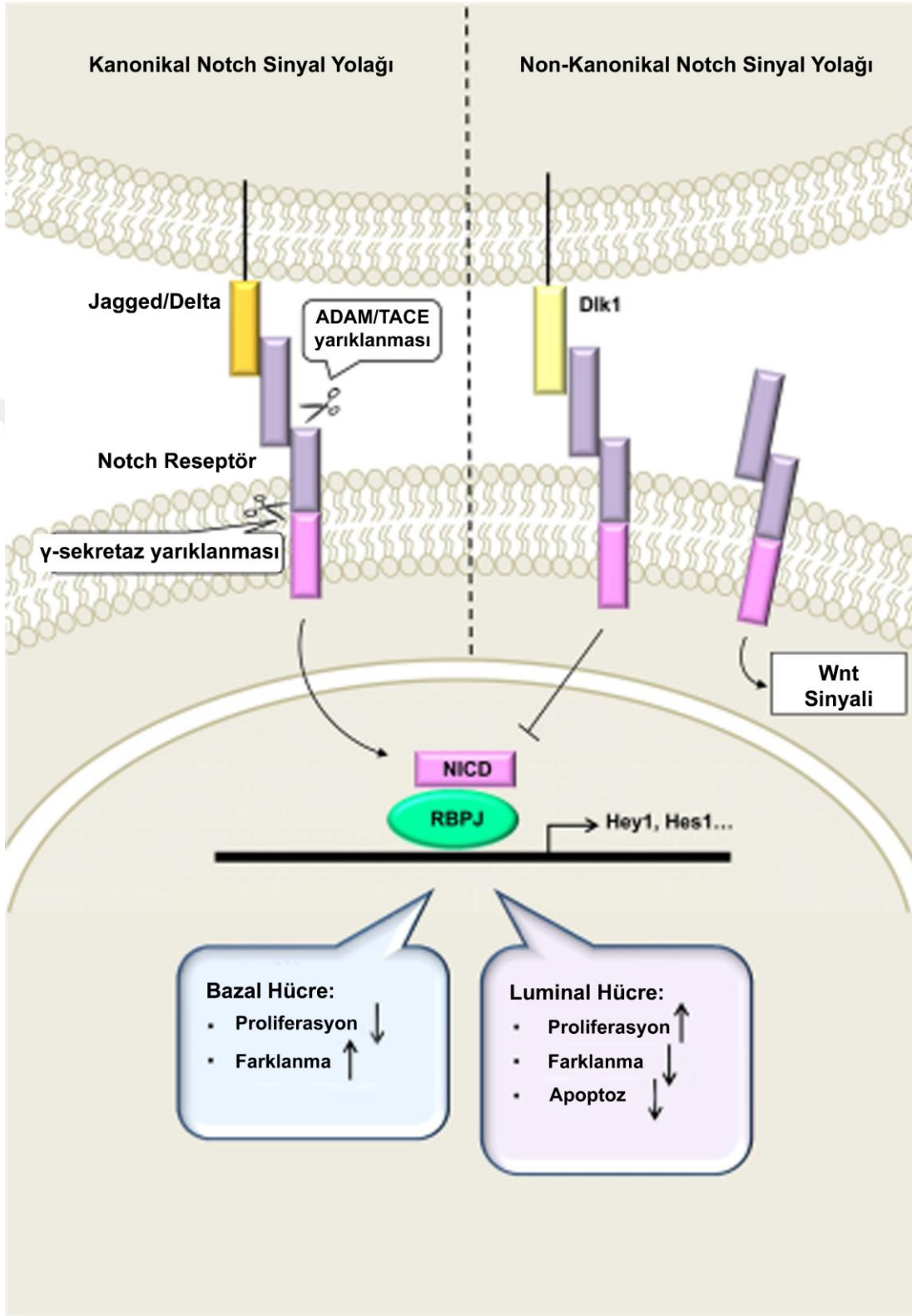
Prostat bezinde, bazal hücrelerin kaybı ve matriks çeşitliliğinin azalması, tümör oluşumunun başlamasını işaret etmektedir (Şekil 2.4.) (Frank ve Miranti, 2013). Bazal hücreler kaybolduğu zaman, sadece lümen komşuluğundaki epitel hücreleri gözlenebilir. Daha önce yapılan bir çalışmada, prostatik intraepitelyal neoplazi (PİN) lezyonları birikiminin, adenokarsinom gelişimine yol açabileceği gösterilmiştir (Lawson ve Witte, 2007). Bununla birlikte, prostat kanserini başlatan ve ilerlemesini sağlayan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Prostat bezinde hücre proliferasyonu, farklılaşması ve morfogenezinin devamlılığını sağlamak için kök/progenitor hücrelerin varlığına inanılmaktadır. Son zamanlarda, bu progenitörlerde PTEN ve p53'ün baskılanmasıyla kanser başlatıcı hücrelere dönüşebileceği öne sürülmüştür (Choi ve ark., 2012). Tümör hücrelerinin çoğunluğu, CK8 ve CK18 gibi sekretuar lüminal epitel hücre belirteçleri ekspres ettiğinden dolayı, kanseri başlatan hücrelerin luminal epitel hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir (Long ve ark., 2005). Tümör hücrelerinde CK5, CK14 ve p63 gibi bazal hücre belirteçleri nadiren gözlenmiştir. Bu nedenle, olgun lüminal epitel hücreler veya lüminal epitel hücresi progenitörlerinin prostat kanserinin kaynağı olduğu gösterilmiştir (Lawson ve Witte, 2007). Başka bir çalışmada ise, insan prostat kanseri dokularında bazal ve luminal hücre belirteçlerinin birlikte kolokalize oldukları gösterilmiştir (Verhagen ve ark., 1992). Mc Donnell ve arkadaşlarının 1992 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, androjen bağımsız prostat kanseri hücrelerinde protoonkogen Bcl-2 ekspresyonu gibi bazal hücre karakteristikleri gösterilmiştir (McDonnell ve ark., 1992). Bu durum, prostat kanseri hücrelerinin tümör büyümesi

sırasında bazal hücre karakteristiklerini yeniden elde edebileceği veya kazanabileceği şeklinde açıklanmıştır (Long ve ark., 2005).

2.3. Notch Sinyal Yolağı

Notch geni, ilk olarak 1917 yılında, Thomas Hunt Morgan tarafından, *Drosophila melanogaster* sineğinin mutantlarında çentikli kanat fenotipini belirlediği zaman keşfedilmiştir (Morgan, 1917). Daha sonra, Artavanis-Tsakonas ve grubu bu çentikli kanat fenotipini, diploid genin tek bir kopyasını mutasyon nedeniyle inaktive olmasına bağlamışlardır (Wharton ve ark., 1985; Kidd ve ark., 1986; Artavanis-Tsakonas ve ark., 1999). *Drosophila* sineğinde, Notch ekspresyonunun kaybı, göz, kanat ve kıl morfolojisini etkilediği ve ayrıca nörogelişimsel fenotipe katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Hızla ilerleyen yaklaşık yüz yıllık süreçte, Notch sinyalizasyonunun, çeşitli hücresele süreçlerde, özellikle karşılıklı iki hücrenin kaderinin belirlenmesi, proliferasyonu, farklılaşması ve hayatta kalması olaylarında görev aldığı da iyi bilinmektedir (Weinmaster ve ark., 1991; Artavanis-Tsakonas ve ark., 1999; Rizzo ve ark., 2008).

Notch (çentik) ismi, yaklaşık bir asır önce sinek kanatlarında çentiğe neden olan bir allele verilmiştir. Bu süreçten itibaren, transmembran proteini olan Notch'u kodlayan gen, kapsamlı olarak işlevi ve mekanizmaları yönünden araştırılmıştır (Morgan, 1917; Wharton ve ark., 1985; Yochem ve ark., 1988). Yapılan araştırmalar, Notch sinyal yolağı ligandları, proteazları ve transkripsiyonel ko-faktörlerini içeren kilit üyelerinin tanımlanmasını ve kanonik Notch sinyalizasyonunun tanımlanmasını sağlamıştır (Şekil 2.5.). Notch sinyal yolağı ligandları ile aktive olarak kanonik yolak ile birtakım biyolojik süreçlere aracılık ederken, Notch sinyal yolağının ligand ve transkripsiyon bağımsız bir yolağı daha olduğu bildirilmiştir ve bu bağımsız sinyal yolağı kanonik olmayan (non-kanonik) yolak olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2.5.) (Shawber ve ark., 1996; Bush ve ark., 2001; Berechid ve ark., 2002; Demehri ve ark., 2008; Acosta ve ark., 2011; Kwon ve ark., 2011; Mukherjee ve ark., 2011).



Şekil 2.5. Prostat hücrelerinde Kanonikal ve Non-Kanonikal Notch sinyal yolağı (Deng ve ark., 2016).

2.3.1. Kanonikal Notch Sinyali

Notch, omurgalıları da içeren yüksek organizmalarda yaygın olarak eksprese olan tek geçişli transmembran proteinlerin oldukça iyi korunmuş bir ailesidir. Kanonikal Notch sinyali, çeşitli hücre-hücre etkileşimlerine aracılık eder ve *C. elegans*, *Drosophila*, zebrafish ve farelerde hücre kaderinin, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozun belirlenmesinde önemli bir rol oynar (Artavanis-Tsakonas ve ark., 1999; Bray, 2006).

Notch, hücrelerarası bir sinyal yolağı olup gelişim süresince uygun hücre kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Notch sinyali, Notch reseptörleri ile bunların ligandları arasındaki etkileşimlerle hücre-hücre bağlantısı üzerinden etki gösterir. Notch reseptörü Notch ile onların ligandları olan Delta ya da Jagged (Serrata) arasındaki etkileşimler sonucunda, hücre-hücre bağlantılarıyla aktive olur. İnsan ve farelerde dört adet Notch reseptörü bulunur. Notch reseptörleri transmembran proteinleri olup ligandlarına bağlanarak hücrede gen regülasyonuna öncülük eden ardışık olayları tetikler.

Memelilerde Notch ailesi, Notch1/TAN-1, Notch2, Notch3 ve Notch4/int-3 olmak üzere dört farklı Notch reseptör izoformunun yanı sıra Jagged1, Jagged2, Delta like ligand 1 (Dll1) Dll3 ve Dll4 olmak üzere beş ligand içerir (Fleming, 1998; Wang ve ark., 2008). Notch ligandları Notch reseptörleri ile etkileşim için gerekli olan bir N-terminal DSL (Delta, Serrate ve LAG-2) domeni ile karakterizedir. Ligandların hücre dışı domeni değişen sayılarda epidermal büyüme faktörü (EGF) tekrarları içerirler. Ligandlar, sistein zengini (CR) domeni varlığına ya da yokluğuna bağlı olarak Delta ya da Delta-like (Dll) ve Serrate (memelilerde Jagged) olmak üzere iki sınıfa daha ayrılırlar (Bray, 2006).

Notch reseptörleri, ilk olarak endoplazmik retikulumda tek bir polipeptid öncülü olarak sentezlenir. 300 kDa molekül ağırlığındaki Notch proteinleri, trans-Golgi ağı vasıtasıyla hücre yüzeyine taşınır. Hücre yüzeyine transfer sürecinde bu full-length Notch proteinleri glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar geçirir ve furin tarafından yarıklanır. Sonuç olarak bir 180 kDa molekül ağırlığında ekstrasellüler ligand binding domain, bir 120 kDa molekül ağırlığında transmembran domain ve bir sitoplazmik bölge içeren inaktif bir heterodimer üretilir (Blaumueller ve ark., 1997; Logeat ve ark., 1998). Notch ligandları, Notch reseptörlerine benzer şekilde tek geçişli transmembran

proteinleridir, ancak reseptörlerden farklı olarak Notch reseptörlerini bağlayan bir Delta / Serrate / Lag (DSL) alanına sahiptir (Bray, 2006).

Notch reseptörü ve ligandının karşılıklı olarak bağlanması, Notch sinyalizasyonunun modüle edilmesindeki ilk adımdır. Kanonikal Notch sinyali, gönderen hücrenin membranına bağlı bir ligand ile alıcı hücre üzerindeki bir Notch reseptörüne bağlandığı zaman aktive edilir. Bu hücre-hücre etkileşimi reseptörün iki ayrı proteolitik yarıklanmasına yol açar: birincisi ekstraselüler yüzeyde ADAM/TACE metalloproteaz enzimi ile gerçekleşir, ikincisi ise çift katlı fosfolipid katmanında bir γ -sekretaz kompleksi (presenilin-1 ve -2, Aph-1, Pen-2 ve Nicastrin'den oluşur) ile gerçekleşir (Brou ve ark., 2000; Mumm ve Kopan, 2000; Fraering ve ark., 2004).

İkinci yarıklanmanın sonucunda, Notch reseptörü hücre içi domeyni (NICD) sitoplazma içerisine serbest bırakılır. Daha sonra, NICD nukleusa transloke olarak DNA-bağlayıcı protein CSL [CBF1, Su(H) ve LAG-1'den ismini alır; CBF1, RBP-J olarak da adlandırılır] ile birlikte kompleks yapar (Bray, 2006; Andersson ve Lendahl, 2014). Ligand olmadığında, nükleer NICD oluşmadığı için, RBP-J histon deasetilazların ve SMRT/NcoR, SHARP (yada MINT) veya CtIP/CtBP gibi korepresör komplekslerin temini aracılığıyla Notch hedef genlerini baskılar. NICD'nin RBP-J'ye bağlanması baskılanmış durumdan aktif duruma geçişte hayati önem taşır. NICD ilk olarak RBP-J'den korepresörleri (N-CoR, SHARP, CtBP gibi) ayırarak RBP-J bağlanma bölgesi içeren promotorları inaktive eder ve ardından bir koaktivatör kompleks olan Mastermind/MAML ve p300/CBP'yi toplayarak Notch hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Borggreffe ve Oswald, 2009).

Notch reseptörleri aracılı sinyallerin değişik hücrel ve gelişimsel durumlarda, sınırlı sayıda hedef geni tanımlanmıştır. Notch hedef genlerinin arasında, en iyi tanımlananları HEY/HES sınıfının bHLH (basic-helix-loop-helix) genleridir. Fare ve insan genomlarında 7 adet Hes (Hes1-7) (Sasai ve ark., 1992; Bae ve ark., 2000; Bessho ve ark., 2001) ve 3 adet Hey (Hey1, Hey2, HeyL) geni tanımlanmıştır (Leimeister ve ark., 1999; Nakagawa ve ark., 2000; Iso ve ark., 2001). Ayrıca, nükleer faktör kappa B (NF- κ B), vasküler büyüme faktör reseptörü (VEGF), mammalian target of rapamycin (mTOR), siklin D1, c-myc, p21, p27 ve Akt gibi hedef genleri de Notch hedef genleri arasında sayılmaktadır.

Tümör gelişimi ve ilerlemesinde, bu genlerin rolleri olduğu bildirilmektedir (Wang ve ark., 2006; Wang ve ark., 2006; Rizzo ve ark., 2008; Wang ve ark., 2008).

Notch sinyaline yanıt, hücre tipleri arasında çok büyük değişkenlik gösterir, örneğin, Notch sinyal yolunun aktivasyonu, bazı durumlarda hücre proliferasyonunu, bazı durumlarda ise apoptozu başlatır. Notch sinyaline ilişkin oluşan farklı yanıtlar, Notch sinyal yolağının diğer yolaklarla etkileşim içerisinde olabileceğinin bir göstergesidir (Bray, 2006).

2.3.2. Kanonikal Olmayan (Non Kanonikal) Notch Sinyali

Kanonikal olmayan Notch sinyalizasyonunun kanonikal Notch sinyalizasyonunda olduğu gibi tam fonksiyonel bir Notch reseptörüne, uygun post-translasyonel modifikasyonlara ve Furin bölünmesine ihtiyacı vardır. Ancak furin yarıklanması inhibe edilse bile Notch sinyalizasyonu tamamen azalmadığı gözlenmiştir (Bush ve ark., 2001; Kidd ve Lieber, 2002). Bu gözlem, kanonikal olmayan (non-kanonikal) Notch sinyali olarak bilinen yolağın diğer ayrıntılarının keşfedilmesini sağlamıştır.

Kanonikal olmayan Notch sinyalizasyonu, Notch ligand uyarımından bağımsız olarak meydana gelebilir, kanonikal olmayan ligandlarla düzenlenebilir veya RBPJ transkripsiyon faktörleri olmadan bile ortaya çıkabilir (D'Souza ve ark., 2010; Andersen ve ark., 2012). Kanonikal olmayan Notch sinyal yolağının ligandına bir örnek Delta like 1 homoloğu (Dlk1) gösterilebilir. Dlk1, Delta-Notch ailesi ile son derece ilişkilidir, ancak Notch ailesinin reseptörlerine bağlanabilmesi için çok önemli olan DSL aktive edici domainine sahip değildir. Bununla birlikte, Dlk1'in Notch sinyal yolunun antagonisti olduğu, Notch reseptörleri ile etkileştiği, kanonikal Notch ligandlarıyla rekabet ettiği ve Notch sinyalizasyonunu negatif olarak düzenlediği öne sürülmüştür (Baladron ve ark., 2005; Bray ve ark., 2008; Ceder ve ark., 2008). Baladron ve arkadaşları, Notch1-pozitif Balb/c14 hücrelerine Dlk1 transfeksiyonu sonrasında Hes1 ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (Baladron ve ark., 2005). Başka bir çalışmada, prostatın luminal farklılaşması sırasında Notch sinyal yolağı aktivasyonu, lüminal transit amplifying hücrelerinde Dlk1'in protein seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (Ceder ve ark., 2008). Sonuç olarak, bu çalışmalar kanonikal Notch sinyalleri ile Dlk1 arasında iki taraflı bir düzenleme olduğunu göstermiştir (Ceder ve ark., 2008). Yapılan birkaç çalışmada,

Notch sinyal yolağı Wnt/ β -katenin yolağını post-translasyonel olarak etkileyerek ligand ve transkripsiyon bağımsız mekanizmalarla fonksiyonunu yerine getirebileceğı gösterilmiştir (Andersen ve ark., 2012). Yarıklanmamış ve membrana bağılı halde bulunan Notch reseptörünün, GSK3 β 'dan bağımsız olarak β -katenin aktif formunu baskılayabildiğı gösterilmiştir. Bu sonuç ta gösterir ki, Notch sinyal yolağının ligandları ile uyarımı olmadığı halde Wnt sinyaliyle etkileşime girebilir (Hayward ve ark., 2005). Ancak kanonikal olmayan Notch sinyalizasyonunun ayrıntılı mekanizmaları halen belirsizliğini korumaktadır ve bu yolağın gelişim ve tümörögenizde fizyolojik önemi olabileceğinden dolayı daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır.

T hücresi akut lenfoblastik lösemili hastalarda t (7;9) (q34;q34.3) kromozomal translokasyonun analizi sonrasında, Notch ekspresyon bozukluğu ilk kez kanserle ilişkilendirilmiştir. Kromozom 9 üzerindeki Notch1'in 3 ucunun, 7 nolu kromozom üzerindeki T hücre reseptörü- β 'nın (TCR- β) Jb katılım bölgesine translokasyonu, kesilmiş Notch1 transkriptlerinin aşırı ekspresyonuna sebep olmuştur (Ellisen ve ark., 1991). O tarihten bu yana, bozuk Notch sinyali çeşitli insan hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir. Örneğın, Notch3 ve ligandı Jagged1'deki mutasyonların; Notch3 mutasyonu otozomal dominant bir bozukluk olan Alagille sendromuna (Li ve ark., 1997), Jagged1 mutasyonu, subkortikal enfarktöslü serebral otozomal dominant arteriyopati'ye ve lökoensefalopati'ye (Joutel ve ark., 1996) neden olduğı belirlenmiştir. Meme kanseri, akciğer kanseri ve rahim ağız kanseri, prostat kanseri gibi insan neoplazmaları ve Hodgkin lenfoma, anaplastik geniş hücreli lenfoma gibi lenfoid neoplazmaların yakın geçmişte Notch sinyaliyle ilişkili olduğı ortaya çıkarılmıştır (Allenspach ve ark., 2002).

2.4. Prostat Kanseri ve Notch ilişkisi

Daha önce yapılan çalışmalarda, embriyonik ve postnatal prostat gelişimi için Notch sinyal yolağı gerekli olduğı kadar, prostat kanserinin gelişimi, ilerlemesi ve metastazında da Notch sinyalinin önemli olduğı belirtilmektedir (Grishina ve ark., 2005; Wang ve ark., 2006; Leong ve Gao, 2008). Nitekim çalışmaların bir kısmında, prostat kanseri gelişimi, ilerlemesi ve metastazı sürecinde Notch sinyal yolağı üyelerinin ekspresyonlarının arttığı belirtilirken (Scorey ve ark., 2006; Bin Hafeez ve ark., 2009; Zhu ve ark., 2013), diğerk kısmında ise, ekspresyonlarının azaldığı belirtilmektedir (Wang ve ark., 2006). Notch

sinyal yolağının prostat kanserindeki onkojenik ve tümör süpresör rolleri arasındaki dengeyi ve belirteçleri anlamak, yeni tedavilerin gelişimine yardımcı olabilir. Gelişen kanıtlar, Notch ekspresyonunun prostat kanserinde belirgin olarak daha yüksek olduğunu ve Notch sinyalizasyonunun bozukluğu tümör gelişimine ve kanser metastazına katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur (Deng ve ark., 2016).

Notch sinyalizasyonunun hücre proliferasyonunu artırdığı, apoptozu engellediği, migrasyonu ve invazyonu artırdığı ve hücre metastazını kolaylaştırdığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. DU145, LNCaP ve PC3 gibi prostat kanseri hücre hatlarında, Notch1'in değişen seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (Shou ve ark., 2001). İnsan prostat dokusu örneklerinde, incelenen 218 prostat kanseri örneği arasında Jagged1 mRNA ekspresyon seviyeleri, primer tümör ve metastaz örneklerinde normal örneklere kıyasla belirgin şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (Yu ve ark., 2014). Benzer şekilde, Zhu ve arkadaşları ileri evre prostat kanserlerinde Jagged1 ve Notch1 protein düzeylerinin arttığını bildirmiştir (Zhu ve ark., 2013). Üstelik, yüksek Jagged1 ekspresyonu nükslerle belirgin olarak ilişkilendirilmiştir (Santagata ve ark., 2004). Bununla birlikte, kanser etiolojisi bağlamında, Notch proteinlerinin rolü, ligandları ve düzenlenmeleri hakkındaki bilgiler birbirinden farklılık göstermektedir (Shou ve ark., 2001; Hayward ve ark., 2005; Li ve ark., 2007; Zhu ve ark., 2013). Wang ve arkadaşları, Notch sinyalizasyonu inaktivasyonunun prostat tümörogeneziyle ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (Hayward ve ark., 2005). Klinik çalışmalarda, insan prostat adenokarsinomu örneklerinde c-Fos, c-Jun ve PSCA düzeyleri belirgin olarak yükseldiği gösterilmiştir (Aoyagi ve ark., 1998). Vahşi tip ve Notch1 knockout fare prostatında, c-Fos, c-Jun, PSCA ve FGF18'in gen ekspresyonları kıyaslandığı zaman, Notch1 knockout farelerde c-Fos, c-Jun, PSCA ve FGF18'in gen ekspresyonları önemli derecede arttığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2006). Başka bir çalışmada, metastatik insan prostat kanser hücre hatlarında siRNA ile Notch1'in knockdown edilmesi ile hücrelerin invazyon, proliferasyon ve hayatta kalma gibi malignant özelliklerinin kaybolduğu gözlenmiştir (Bin Hafeez ve ark., 2009). Ayrıca prostat kanserinde artış gösteren bir adaptör protein olan Prostat Tumor Overexpressed-1 (PTOV1), Notch sinyal yolağı hedefleri Hes1 ve Hey1'in ekspresyonunu azaltmasıyla, prostat kanseri ilerlemesini indüklediği belirlenmiş ve bu sonuçlar prostat kanserinde Notch'un bir tümör süpresif rolü olabileceğini göstermiştir (Alana ve ark., 2014).

Ayrıca, protein düzeyinde yapılan daha önceki çalışmalar incelendiğinde,, insan prostat kanseri dokularında progresyon spektrumu (lokalden metastatik prostat kanserine) arttıkça Notch sinyal yolağı üyelerinin ekspresyonlarının da arttığı gözlenmiştir (Santagata ve ark., 2004; Bin Hafeez ve ark., 2009; Zhu ve ark., 2013). Yukarıda verilen çalışmaların sonuçlarından, bu konunun oldukça tartışmalı ve henüz tam olarak aydınlatılamamış olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla konunun aydınlatılabilmesi için daha yeni ve orijinal çalışmalara gerek vardır. Ayrıca, bu çalışmaların çoğunda, Notch sinyal yolağı üyelerinden özellikle Notch1, Jagged1 ve Hes1 üzerinde durulmuştur (Shou ve ark., 2001; Santagata ve ark., 2004; Scorey ve ark., 2006; Wang ve ark., 2010; Wang ve ark., 2011; Soylu ve ark., 2015).

2.4.1. Prostat Kanseri Proliferasyonu ve Notch İlişkisi

Proliferasyon, hücre siklusu düzenlemesi ile sıkı bir şekilde kontrol edilir. Notch1 ve ligandı olan Jagged1'in ekspresyonunun azalması S fazı hücre siklusu ilerlemesini geciktirdiği ve PC3 prostat kanseri hücre hattında hücre büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir. S fazı hücre döngüsü ilerlemesi CDK2 aktivitesine ve S fazı siklinlerine bağlıdır. PC3 hücrelerinde Jagged1 knockdown edildiği zaman, CDK2 ekspresyonu % 50 ve siklin A ekspresyonu % 90 oranında azalmıştır(Zhang ve ark., 2006). Üstelik bir CDK inhibitörü olan p27'nin protein ekspresyonu 10 kat kadar artmıştır. Bu sonuçlar, Jagged1'in prostat tümörögenesinde hücre siklusunun ilerlemesi için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Prostat kanseri hücre hatlarında hem Notch1 hem de Jagged1'in knockdown edilmesi, hücre proliferasyonu inhibisyonuna neden olmaktadır, ancak Jagged1'in knockdown edilmesi Notch1'in knockdown edilmesine göre daha güçlü bir inhibitör etki sergilemiştir (Zhang ve ark., 2006).

Zhang ve arkadaşları, PC3, DU145, LNCaP ve C4-2B'yi içeren prostat kanseri hücre hatlarında Jagged1'in ekspresyonunun baskılanmasının, hücre büyümesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Zhang ve ark., 2006). LNCaP, LAPC4, DU145 ve PC3 hücre hatlarında, siRNA transfeksiyonuyla knockdown edilmiş Jagged1, hücre proliferasyonunu büyük ölçüde azaltmıştır. Jagged1'in aşırı ekspresyonu, LNCaP ve LAPC4 hücrelerinde hücre proliferasyonunu iki kata kadar artırmış, aksine DU145 veya PC3 hücre hatları üzerine ise çok az etki göstermiştir (Yu ve ark., 2014). Ayrıca PC3 hücre hattında, RBPJ'nin

knockdown edilmesi, hücre proliferasyonunun azalmasına neden olmuştur (Yong ve ark., 2011). Yukarıda bahsedildiği gibi, bazı çalışmalar Notch sinyal yolağının tümör büyümesini destekleyici bir yönde etkisini desteklemekte iken bazı çalışmalar ise, Notch sinyal yolağının anti-proliferatif etki gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Notch1, çeşitli prostat kanseri hücre hatlarında yüksek oranda eksprese edilir ve benzer şekilde, fare prostatının transgenik adenokarsinoma (TRAMP) modelinin malignant ve metastatik prostat epitel hücrelerinde de Notch1 mRNA ekspresyonu artış göstermektedir (Shou ve ark., 2001; Wang ve ark., 2011). Ancak tuhaf bir şekilde, Notch ligandlarının ekspresyonu, hem prostat kanseri hücrelerinde hem de TRAMP farelerinde düşük bulunmuş veya saptanamamıştır; bu da ligandların, Notch sinyalizasyonunun fizyolojik aktivasyonunda, minimal veya hiç yer almadığını işaret eder. Bunlara ek olarak, Notch1 aktive olduğu zaman, prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir ve bu durum Notch sinyal yolağının malignant prostat hücrelerinde baskılandığını ifade eder (Shou ve ark., 2001). Wang ve arkadaşları, Notch1'in prostatta inaktive edilmesi, prostat dokusunda, epitel hücrelerinin artmış hücre proliferasyonuna, dallanmasına ve lokalize olmuş kümelerine yol açtığı bildirmişlerdir ve bu ortaya çıkan sonuçlar prostat kanserinin genetik olarak tasarlanmış fare modellerinin fenotipine benzemektedir. Aynı çalışmanın microarray analizleri sonucunda, prostat adenokarsinoma dokularında normal prostat dokularına kıyasla Notch1 ve Hey1 genleri ekspresyonunun önemli derecede azaldığı bulunmuştur ve bu bulgu da Notch sinyal yolağının bozukluğunun prostatik tümöröenezini kolaylaştırabileceğini göstermiştir (Wang ve ark., 2006). Whelan ve arkadaşları, prostat adenokarsinom odaklarında, total ve yarıklanmış Notch1 ve Hey1'in immünohistokimyasal olarak kaybını bildirmiştir. Bu araştırmacılar, DU145 prostat kanseri hücre hattında ise yarıklanmış Notch1'in aşırı ekspre olduğunu göstermişlerdir. Ancak Notch1 aktivasyonunun hücre proliferasyonu üzerine önemli bir etkisinin olmadığını fakat hücre migrasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Araştırmacılar, Notch sinyalizasyonu aracılığıyla bir tümör süpresör gen olan PTEN ekspresyonunun da arttığını göstermiştir ve böylece Notch sinyal yolağının bir tümör süpresör gen olan PTEN ekspresyonunu artırarak kanserin ilerlemesini baskıladığı rapor edilmiştir (Whelan ve ark., 2009).

Sonuç olarak birkaç çalışmada, Notch1'in aşırı ekspresyonunun kanser proliferasyonunu baskıladığı (Shou ve ark., 2001; Wang ve ark., 2006), aksine diğer çalışmalarda, Notch1'in knockdown edilmesi proliferasyonu baskıladığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2006; Yong ve ark., 2011; Yu ve ark., 2014). Ancak başka bir çalışmada ise, Notch sinyalizasyonu artışının hücre proliferasyonu üzerine önemli bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Whelan ve ark., 2009).

2.4.2. Prostat Kanserinde Apoptosis/Anoikis ve Notch İlişkisi

PC3 prostat kanseri hücre hattında, Notch1 ve Jagged1'in knockdown edilmesi hücre canlılığının azalmasına ve apoptozun indüklenmesine neden olmuştur. Ayrıca Notch inaktivasyonu Akt fosforilasyonunun ve onun hedefi olan mTOR'un azalmasına neden olmuştur. PC3 hücrelerinde PI3K inhibitörü ile PI3K/Akt yolağının inaktivasyonu, Notch1 ekspresyonunun ve mTOR fosforilasyonunun ortadan kalkmasına sebep olmuştur. Ayrıca Akt eksikliği de, Notch1 ve Jagged1 ekspresyonunu azaltmıştır. Bu sonuçlar prostat kanserinde Notch1 ve Akt yolağı arasında karşılıklı bir düzenlemenin olduğunu göstermektedir (Wang ve ark., 2010). Aynı grup, Akt'den başka Notch1'in knockdown edilmesinin FoxM1 yolağını da inhibe ettiğini de vurgulamıştır (Wang ve ark., 2011). Hücre döngüsü ile ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan FoxM1'in aşırı ekspresyonu, prostat karsinogenezi ile ilişkilendirilmiştir (Chandran ve ark., 2007). PI3K/Akt yolağı inhibitörleri, FoxM1'in ekspresyonunu ortadan kaldırmıştır ve bu sonuç, FoxM1 ekspresyonunun PI3K/Akt yolağı tarafından düzenlendiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, Notch1 ve Jagged1'in knockdown edilmesinin, PI3K/Akt, FoxM1 ve mTOR yollarının inaktivasyonu ile, prostat kanserinin apoptotik hücre ölümünü başlattığını göstermektedir.

Notch sinyalleri, anoikis düzenlenmesinde de rol almaktadır. Anoikis, çevredeki hücre dışı matristen hücre adezyonunun kaybedilmesiyle indüklenen programlanmış hücre ölümü olup metastazı önlemek için kullanılabilir önemli bir mekanizmadır. Bu nedenle, sekonder tümör kolonileri oluşturabilmek için, metastatik kanser hücreleri anoikisten kaçması gerekir (Liotta ve Kohn, 2004).

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, tümör hücrelerindeki anoikis direnci ile Notch sinyalleri ilişkilendirmiştir. Örneğin, meme kanserinde, Notch aracılı E-kadherinin baskılanması, β -katenin aktivasyonu ve anoikis direncine sebep olur (Leong ve ark.,

2007). Servikal kanserde, aktif Notch1 sinyali P13K/Akt yolağının aktivasyonu yoluyla anoikise direnç oluşturur (Rangarajan ve ark., 2001). Prostat kanserinde Notch ve anoikis arasındaki korelasyon hakkında çok az bilgi bulunmasına rağmen, bir çalışmada Notch sinyalinin artışının anoikisi inhibe ettiği ve prostat luminal epitel hücreleri proliferasyonunu uyardığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada, Notch sinyalizasyonunun aktivasyonu, transit amplifying luminal progenitor hücrelerinde NF-κB yoluyla ve Hes1'den bağımsız olarak hücre anoikisini baskıladığı da vurgulanmıştır (Kwon ve ark., 2014). Sonuç olarak, anormal Notch sinyalizasyonunun luminal hücre proliferasyonunu desteklemesi, anoikisi inhibe etmesi ve prostat kanseri ilerlemesini ve metastazını artırması mümkündür. Ancak anoikisde Notch sinyalizasyonunun doğrudan katılımını gösteren daha fazla deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.4.3. Prostat Kanseri Gelişiminde Hipoksi ve Notch İlişkisi

Aşırı hipoksi koşulları tümör hücresinin hayatta kalmasını zorlaştırırsa da, hafif hipoksik koşullar tümör hücrelerinin koşullanmasını sağlar ve hayatta kalabilmek için düşük oksijen koşullarına adapte olma kabiliyetlerini artırır. Daha önce yapılan bir çalışmada, uzun süreli hipoksik koşul, LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu devamlılığı için Notch3'ü aktive ettiği, ancak Notch1 ve Notch2'yi aktive etmediği rapor edilmiştir. Aynı grup, Notch sinyallerinin LNCaP hücrelerinde hipoksiye bağlı nöroendokrin diferansiyasyonunu (NED) düzenlediği bildirmiştir (Danza ve ark., 2012). Nöroendokrin yönde farklılaşmış prostat kanseri hücrelerinin parakrin fonksiyon ile proliferasyonu, invazyonu ve metastazı destekleyerek daha kötü bir prognoza neden olduğu ve androjen baskılayıcı tedaviye direnç gelişmesini sağladığı gösterilmiştir (Danza ve ark., 2012; Danza ve ark., 2013). LNCaP hücrelerinin düşük oksijene maruz kalması NED'i destelemiş ve hipoksik koşullar altında iken Notch1 ve Notch2'nin mRNA ve protein ekspresyonu azalmıştır. Bunların yanı sıra Hey1 ve Hes1 ekspresyonları da azalmıştır (Danza ve ark., 2012). Sonuç olarak bu bilgiler ışığında hipoksi; prostat kanseri hücreleri proliferasyonu devamlılığı için Notch3 aktivasyonunu tetiklediği ve Notch1 ve Notch2 sinyallerini inhibe ederek NED'i sağladığı ve böylece prostat kanseri progresyonunu sağladığı söylenilebilir. Özellikle tümör hücrelerindeki hipoksi, metastazı destekleyen bir süreç olan epitelial mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkilendirilmiştir. Şu ana kadar herhangi bir prostat kanseri modelinde deneysel olarak kanıt bulunmamasına

rağmen, Notch sinyalleri, hipoksik bir uyarının EMT'ye dönüştürülmesinde rol alıyor gibi gözükmektedir (Sahlgren ve ark., 2008).

2.4.4. Prostat Kanserinde Hücre İnvazyonu, Metastazı ve Notch İlişkisi

Bin Hafeez ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; insan dokuları ve insan prostat kanseri hücre hatlarında, Notch1'in aşırı ekspresyonunun tümör invazyonunu desteklediği ve PC3 ve 22Rv1 insan prostat kanseri hücre hatlarında Notch1'in knockdown edilmesinin hücre invazyonunu önemli derecede azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada, mikroarray analizleriyle, knockdown Notch1'in, NF-κB yolağının hedef genleri olan matriks metalloproteinaz-9 (MMP9) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) dahil olmak üzere hücre invazyonunda rol alan hücre dışı proteinlerin ekspresyonunda belirgin bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Bin Hafeez ve ark., 2009).

Daha önce yapılan bir çalışmada; Notch1 eksikliğinin, NF-κB aktivitesinde bir düşüşe ve buna bağlı olarak MMP ve uPA'da da düşüşe neden olduğu belirtilmiş ve ayrıca Notch1 ve/veya Jagged1'in sessizleştirilmesinin NF-κB'nin DNA bağlama aktivitesini inhibe ettiği de gösterilmiştir (Wang ve ark., 2010). Bununla birlikte bu sonuçlar, Notch1 eksikliğinin, NF-κB aktivitesinde bir düşüşe ve buna bağlı olarak MMP ve uPA'da düşüşe neden olduğunu göstermiştir. Böylece, Notch1 eksikliğinin kanser hücresi invazyonunu azalttığı ortaya konulmuştur (Bin Hafeez ve ark., 2009; Wang ve ark., 2010). Ayrıca, Notch sinyallerinin hücre metastazı (hücre hareketliliği) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. LNCaP ve PC3 hücrelerine bir Notch sinyal yolağı inhibitörü (γ-sekretaz inhibitörü) uygulandığında, Hes1 ekspresyonunun azaldığı ve 48 saat sonra ise hücre hareketliliğinin yavaşladığı rapor edilmiştir (Scorey ve ark., 2006). Bu bulgular, prostat kanserinde Notch ekspresyonunun metastaz ve invazyonunu desteklediğini göstermektedir.

Başka bir çalışma ise, Notch sinyalizasyonunun prostat kanserinde hücre invazyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Ancak Notch'ın bu anti-invaziv rolü, prostat tumor overexpressed-1 (PTOV1; prostat kanserinde ekspresyonu belirgin şekilde artan bir adaptor protein) tarafından baskılanmıştır. PTOV1 knockdown edilmiş prostat epitel hücrelerinde, Notch sinyalizasyonuna bağlı olarak Hey1 ve Hes1'in ekspresyonu artmıştır. Yapısal olarak aktif Notch1 reseptörü, prostat kanseri hücrelerinin büyümesini ve invazyonunu zayıflatmıştır (Alana ve ark., 2014).

2.4.5. Prostat Kanserinde Anjiyogenez ve Notch İlişkisi

Anjiyogenez, tümör büyümesi ile ilişkilendirilmiştir. Notch sinyalizasyonunun, normal vaskülarizasyon ve tümör anjiyogenezi için çok önemli olabileceği öne sürülmüştür (Hu ve ark., 2012). Prostat kanserindeki anjiyogenez hakkında sınırlı sayıdaki çalışmada, Notch sinyalizasyonunun, vasküler gelişimde ve tümör anjiyogenezinde rol aldığı açık bir şekilde gösterilmiştir (Bin Hafeez ve ark., 2009). Kanser ksenograftlarında, PC3 hücrelerinde Dll4'ün aşırı ekspresyonunun anjiyogenezi azalttığı ancak damar sistemi yapısını ve fonksiyonunu geliştirerek damar perfüzyonunu ve tümör oksijenizasyonunu geliştirdiği ve bunun da tümör progresyonu artışını sağladığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar incelendiği zaman Dll4 hariç, diğer Notch ligandlarının prostat kanseri anjiyogenezi üzerindeki etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir ve yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.6. Prostat Kanseri Metastazı ve Notch İlişkisi

Metastaz süreci, kanser mortalitesinin önde gelen nedenidir (Hu ve ark., 2012). Daha önce yapılan çalışmalar ile prostat kanserlerinin sıklıkla kemiğe (Cooper ve ark., 2003), lenf düğümlerine (Swanson ve ark., 2006) ve beyine (Salvati ve ark., 2005) metastaz yaptığı gösterilmiştir. Bu metastatik alanlarından elde edilmiş PC3 ve C4-2B (kemikten), DU145 (beyinden) ve LNCaP (lenf düğümünden) gibi çeşitli prostat kanseri hücre hatları deneysel modeller olarak kullanılmaktadır (Shou ve ark., 2001; Zayzafoon ve ark., 2004; Bin Hafeez ve ark., 2009).

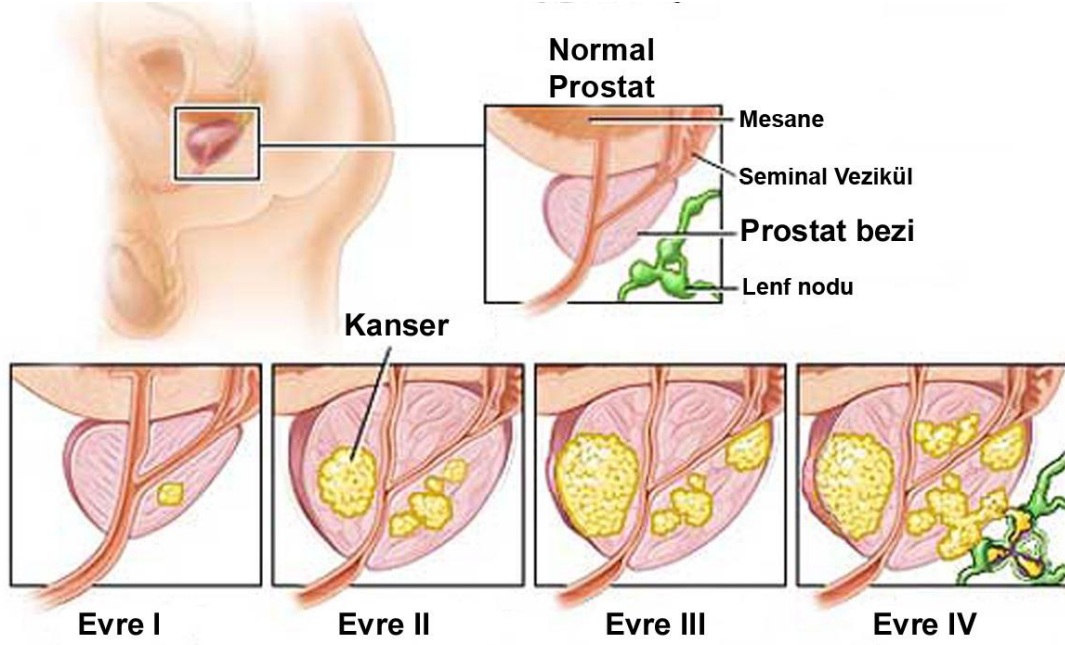
Ancak prostat kanserinin metastazında, Notch sinyalizasyonunun rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Notch sinyal yolağı, hücre migrasyonu, invazyonu, anoikis ve apoptoz direnci ve anjiyogenezin düzenlenmesinde rol almasından dolayı prostat kanseri metastazını kolaylaştırabileceği belirtilmiştir. Santagata ve arkadaşları 154 benign, lokalize ve metastatik prostat kanseri dokularının immünohistokimyasal analizi sonucunda, metastatik prostat kanseri dokularında Jagged1 ekspresyonunun anlamlı oranda yüksek olduğunu gözlemişlerdir (Santagata ve ark., 2004). Benzer şekilde, TRAMP farelerin lenf düğümleri metastazında, Notch1'in mRNA ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Shou ve ark., 2001). Ayrıca, prostat kanserinde anormal şekilde eksprese olan EMT (epithelial–mesenchymal transition) belirteçleri

incelendiğinde, prostat kanseri kemik metastazında, Notch1 aşırı ekspresyonu gözlenmiştir (Sethi ve ark., 2010). Bu sonuç, prostat kanserinin kemik metastazına Notch1'in doğrudan dahil olabileceğini göstermiştir.

Prostat kanserinin kemik metastazının ilerlemesinde, metastatik prostat kanseri hücreleri ile osteoblastlar arasındaki Notch sinyal yolağının dahil olduğu bir mekanizma etkin olmaktadır. Bu mekanizma, kanser hücrelerinde osteoblast benzeri bir fenotipi ortaya çıkardığı ve bu fenotipin osteoblastik lezyonları indüklediği gösterilmiştir. Prostat kanserinin kemik metastazından elde edilmiş C4-2B hücre hattı ve primer prostat kanserinin kemik metastazı gelişmiş hastaların kemik dokularında Notch1 ekspresyonunu önemli derecede artırdığı tesbit edilmiştir (Zayzafoon ve ark., 2004).

2.5. Prostat Kanseri Tedavisi

Prostat kanserinin mevcut tedavi seçenekleri cerrahi, radyasyon ve kemoterapidir. Prostat kanserinden ölüm riski, erken teşhis ve tümör progresyonu için serum prostat spesifik antijen (PSA) taraması işlemleri sayesinde son birkaç yılda azalmıştır (Porkka ve ark., 2007). "Tümör Nodu Metastazı" sistemi ile, dört aşamalı prostat kanseri tespit edilmiştir (Ganju ve ark., 2014). Prostat kanseri evre I'de, kanser yalnızca prostatda bulunur (Şekil 2.6). Bu aşamada, kanser hormona duyarlı ve asemptomatik yada minimal semptomatiktir. Prostat kanseri Evre I'de kemoterapötik ajanlar tavsiye edilmez, bunun yerine tümörler cerrahi, brakiterapi (Johnson ve Roach, 2014) ve kriyocerrahi (Al Ekish ve ark., 2013) ve Yüksek Yoğunluk Odaklı Ultrason (HIFU) (Komura ve ark., 2014) gibi diğer tedavi yöntemlerine tabi tutulur. Evre II'de, prostat kanseri, tipik olarak prostat içinde büyür ve bazal membran bozulmamıştır (Şekil 2.6). Bu aşamada, kanser tamamen semptomatiktir ve tedavisi için dozetaksel, mitoksantron kullanılır. Evre III'te, prostat kanseri nadiren prostat dışına yayılır. Bu aşamada dozetaksel, cabazitaksel, mitoksantron ve abirateron asetat gibi kemoterapikler ile tedavinin ardından radyasyon tedavisi uygulanır (Şekil 2.6). Evre IV, kanserin prostatın dışına yayıldığı ve diğer organlara/dokulara metastaz yaptığı evredir (Şekil 2.6). Evre IV prostat kanseri için, standart tedavi seçenekleri, harici ışın ve palyatif radyoterapi veya prostatın transüretal rezeksiyonunu içerir (Ganju ve ark., 2014).



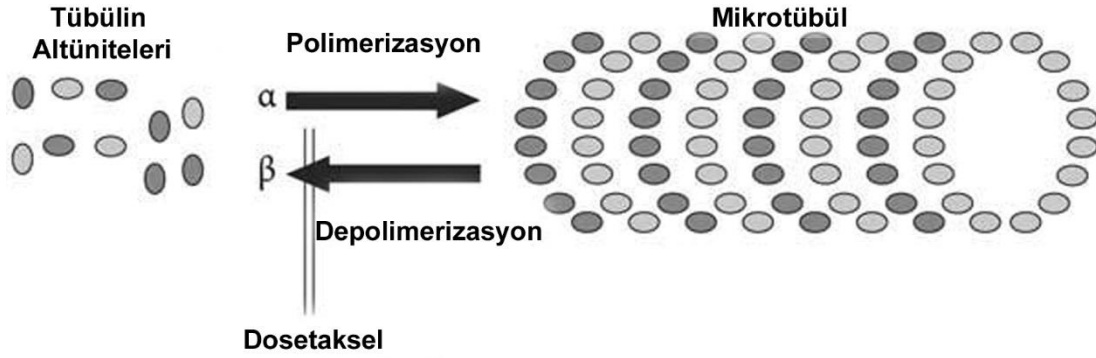
Şekil 2.6. "Tümör Nodu Metastazı" sistemine göre dört aşamalı prostat kanseri (<http://www.mpuh.org/centreforroboticsurgery/tag/prostate-cancer-treatment/>, Erişim tarihi: 23.08.2017).

Metastatik prostat kanseri hastalarının tedavisindeki köşe taşı, anti-androjenler ve dosetaksiel ile yapılan tedavidir. Metastatik prostat kanserli hastaların yaklaşık %90'ı, başlangıçta androjen baskılayıcı tedavilere duyarlıdırlar ve tedavi alan kişilerdeki başlangıç cevabı oldukça iyidir. Bu hastalarda başlangıç cevabı olarak PSA ve yumuşak doku metastazı azalır. Ancak bu tedaviden yaklaşık 18-24 ay sonra, hastalarda hormon tedavisine direnç gelişir ve kastrasyona dirençli prostat kanseri (CRPC) ortaya çıkar (Pienta ve Bradley, 2006; Sinibaldi, 2007). Bazı araştırmacılar, androjen reseptörünün (AR) aktif kaldığını ve metastatik CRPC'nin ilerlemesi sırasında önemli bir rol oynadığını bildirmiştir (Zhang ve ark., 2015). Bunun sebebi ise, prostat kanseri hücrelerinden ve adrenal bez tarafından üretilen androjenler (Attard ve ark., 2005; Bruno ve Njar, 2007), AR'nin genomik amplifikasyonları, androjen taşınımındaki değişiklikler, AR koaktivatörleri ve koregülatörlerindeki anormallikler, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından AR'nin ligand bağımsız aktivasyonu ve AR splice varyantları olabilir (Rathkopf ve Scher, 2013; Carver, 2014). Ayrıca anti-androjenler ile uygulanan ilk tedavi, ilerleyen süreçte prostat kanseri hücreleri üzerine agonistik etki yaparak AR'nin aşırı ekspresyonuna veya AR mutasyonuna neden olarak, reseptörün androjen yokluğunda da aktive olmasına neden oluyor olabilir (Chen ve ark., 2004). Dosetaksiel, metastatic CRPC

hastalarında genel sağkalımda bir gelişme gösteren ilk sistemik tedavidir (Petrylak ve ark., 2004). Son zamanlarda, mCRPC tedavisi için yeni bir ilaç olan abirateron asetat önerilmektedir (Fizazi ve ark., 2012). Bu yüzden, CRPC, klinikte dosetaksel ve/veya abirateron asetat ile tedavi edilmeye çalışılmaktadır (Sinibaldi, 2007).

2.5.1. Dosetaksel

Dosetaksel, farklı kanser türlerinin tedavisinde geniş ölçüde kullanılan ve *Taxus baccata* bitkisinden elde edilen bir taksoit özütüdür. Dosetaksel, prostat kanseri tedavisi için en umut verici kemoterapi ilacıdır. Dosetaksel, paklitakselinin yarı sentetik analogu olup gastrointestinal kanserler, meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat kanseri, ovaryum ve baş-boyun kanserleri gibi değişik malignansilerde antineoplastik ajan olarak kullanılmaktadır (Cortes ve Pazdur, 1995; Montero ve ark., 2005). Bu ilaç, düşük sistemik toksisite ve yüksek oranda hücresel geçiş gösterir. G2/M fazında, hücre döngüsünün durdurulmasına ve daha sonra kanser hücrelerinde apoptoz ve sitotoksisitenin başlatılmasına neden olan mikrotübül stabilizasyonunu teşvik eder (Şekil 2.7.) (Clarke ve Rivory, 1999). Hücrede, mikrotübüllerin polimerizasyonunu artırıp, depolimerizasyonunu da önleyerek stabil mikrotübül toplulukları oluşturmak suretiyle anti-tümör etkisi göstermektedir (Schiff ve ark., 1979; Ringel ve Horwitz, 1991). Ayrıca hücrelerde tübülün polimerizasyonu ile mitotik arreste ve anti-apoptotik etkileri olan bcl-2 fosforilasyonunu sitümüle ederek apoptozu indükler ve böylece anti-tümör etkilerini gösterir (Diaz ve Andreu, 1993; Reed, 1995). Dosetaksel, paklitaksele kıyasla daha güçlü bir ilaçtır. Dolayısıyla, düşük dozdaki dosetaksel, yüksek doz paklitakselden daha güçlü bir şekilde apoptozu indükleyerek, daha fazla kanser hücresi ölümüne neden olabilir (Grant ve ark., 2003).



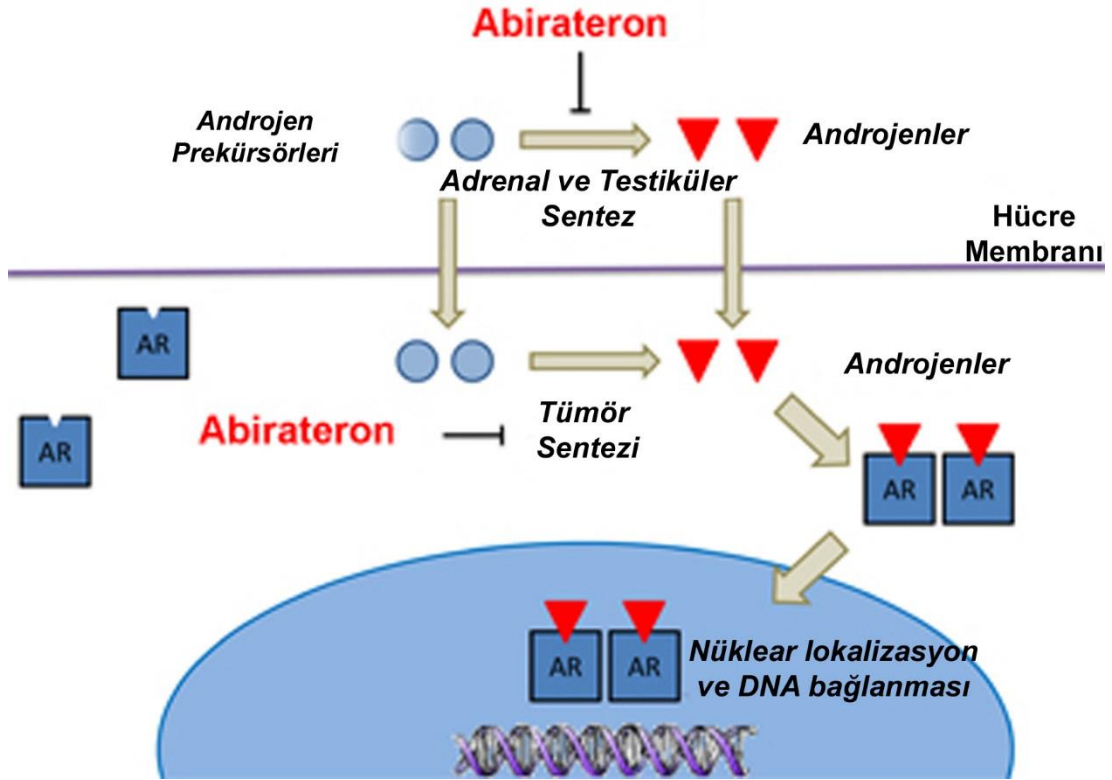
Şekil 2.7. Dosetaksel, mikrotübül polimerizasyonu oluşmaya devam ederken mikrotübül depolimerizasyonunu inhibe eder. Bu inhibisyon, hücre döngüsü arresti ve mitozun inhibisyonu da dahil olmak üzere hücresel aktivitelerin bozulmasına neden olur (Mackler ve Pienta, 2005).

Dosetaksel (kimyasal formülü, $C_{43}H_{53}NO_{14}$ ve moleküler ağırlığı, 807.9 g mol^{-1}), suda çözünmeyen bir anti-mitotik kemoterapötik ajandır. Hidrofobik yapısı nedeniyle, hücre içerisindeki taşınması lipoproteinler, albümin ve α_1 asit glikoprotein gibi plazma proteinlerinin yardımıyla gerçekleşir (Clarke ve Rivory, 1999). Dosetaksel hücre içerisine alındığı zaman, C13 yan zincirindeki tert-butil grubunun metil grubunda hidroksilasyon meydana gelir. Bu hidroksilasyon dosetakselin daha da oksitlenmesini ve hayvanlar ve insanlarda döngüsel bir forma dönüştürülmesini sağlar (Royer ve ark., 1996). Dosetaksel'in bu siklik formu, mikrotübülün bağlanması ve mikrotübül yapısının stabilize edilmesinden sorumludur. Bu tür mikrotübül polimer hiperstabilizasyonu, hücre döngüsünün G2/M fazında arreste ve böylece hücre ölümüne neden olur (Verweij ve ark., 1994). Dosetaksel karaciğerde metabolize olur ve sitokrom P450 üyesi olan CYP3A4 enzimi tarafından parçalanır (Kruijtzter ve ark., 2002).

2.5.2. Abirateron Asetat

Abirateron asetat, pregnelanon analogu olup spesifik ve geri dönüşsüz CYP17A1 (Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1) inhibitörüdür (Potter ve ark., 1995; Rowlands ve ark., 1995). CYP17A1, 2 adet enzimatik reaksiyonun katalizlenmesinden (enzimin oluşumundan) sorumlu monooksijenazdır; ilki kortizolün öncüsü 17OH-pregnelanonun oluşumu, ikincisi ise 17OH-pregnelanondan 19 karbonlu seks steroidleri dihidroepiandrostenedion (DHEA), DHEA-sülfat ve androstenedion oluşumu reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonların ilki 17α -hidroksilaz, ikincisi ise C17,20 liyaz ile gerçekleştirilir. Bu enzimler testis, adrenal bezi ve prostatik tümör dokularında

eksprese edilir (Miller ve Auchus, 2011). DHEA ve androstenedionun çoğunluğu 17β -hidroksisteroid dehidrogenaz ile testosterona ve 5α -redüktaz ile dihidrotestosterona dönüştürülür. Testiküler ve adrenal androjenler, prostat epitelinde yerleşik bazal hücrelerin proliferasyonunu, farklılaşmasını, luminal hücrelerin devamlılığı ve sekresyonunu sağlamaktadır. Abirateron asetat ile CYP17A1 aktivitesi inhibe edildiği zaman, sirkülasyondaki testosteron ve dihidrotestosteron gibi androjenlerin seviyesi azalır. Abirateron asetat, CYP17A1 inhibisyonu ile bütün bu AR aktivitesine sebep olan salınımları engeller ve Pca hastalarının yaşama şansını artırır. Abirateron asetat, AR antagonisti ve 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz inhibitörü olarak da fonksiyon görebilmektedir (Yin ve Hu, 2014).



Şekil 2.8. Adrenal bez ve testis kaynaklı androjenler ve androjen prekürsörleri tümör hücrelerine girdikten sonra androjen prekürsörleri tümör hücreleri tarafından androjenlere dönüştürülür ve androjenler, androjen reseptörüne bağlanarak nükleusa transloke olur. Sonrasında DNA'ya bağlanırlar ve hedef genlerin transkripsiyonunu sağlarlar. Abirateron asetat, testis, adrenal bez ve tümör hücresi kaynaklı androjenlerin sentezini inhibe ederek hücrelerin proliferasyonunu ve sekresyonunu inhibe eder (http://cdmnp.army.mil/pcrp/research_highlights/2011, Erişim tarihi:17.08.2017).

2.6. PC-3 ve LNCaP Hücre Hatları

PC-3 hücre hattı Kafkas ırkından, 62 yaşında, derece IV prostat adenokarsinomlu bir hastanın kemik metastazından elde edilmiştir. Elde edilen hücreler (hücre kültürü), ilk tümörden üretilen hücre hattının karakteristiğini yansıtmaktadır. Karakteristik olarak zemine yapışarak çoğalırlar. PC3 prostat kanseri hücre hattı prostat epitel hücresi ile karşılaştırıldığında androjene cevap vermezler. Androjen yokluğu terapisi ve kemoterapiye dirençlidirler. Bu hücrelerde androjen reseptör fonksiyonu yoktur. LNCaP hücre hattı Kafkas ırkından 50 yaşında prostat kanserli hastanın subklavikular lenf düğümü metastazından elde edilmiştir. Androjen duyarlı özelliğe sahip olup androjen reseptörü fonksiyonu vardır. Hücreler epitel özelliğinde olup karakteristik olarak zemine yapışarak çoğalırlar.

Sonuç olarak, bu güne kadar yapılan çalışmalar gözden geçirildiğinde, prostat kanserinin dosetaksel ve abirateron asetatin birlikte uygulaması yoluyla tedavisi ile Notch sinyal yolu ilişkisine dayalı herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup konunun araştırılması, orijinal ve ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

PCa'ların çoğunluğunda PTEN (Phosphatase and tensin homolog) proteinin ekspresyonunda kayıp gözlenmiştir. PTEN, proliferasyonda önemli bir rol alan PI3K/Akt yolağının önemli bir inhibitörüdür (Shen ve Abate-Shen, 2010). Daha önce yapılan bazı kanser çalışmalarında Notch1'in Hes1 aracılığı ile PTEN promotorunu baskılayarak PTEN kaybına neden olabileceği gösterilmiştir (Palomero ve ark., 2008). Yapılan çalışmalara bakıldığında prostat kanseri progresyonu arttıkça Notch1, Jagged1 ve Hes1 ekspresyonunun arttığı gözlenmektedir. Biz bu çalışmayı planlarken dosetaksel ve abirateron asetatin, Notch1, Jagged1 ve Hes1'in ekspresyonunu azaltarak, PTEN proteinin ekspresyon artışına neden olabileceğini düşündük. Artan PTEN ekspresyonunda, PIP3'ü PIP2'ye dönüştürerek Akt yolağının inaktive olmasına ve prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonlarının azalmasına veya durmasına sebep olabileceğini öngörmüştük.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Kullanılan cihaz, malzeme ve solüsyonlar;

- ❖ RPMI 1640 Besi Yeri (ATCC, #30-2001)
- ❖ Penisilin/streptomisin (10.000 U/mL) (LİFE TECH, #15140122) %1 olarak medyuma eklendi.
- ❖ Fötal Bovine Serum (FBS) (LİFE TECH, #10270106) %10 olarak medyuma eklendi.
- ❖ Tripsin-EDTA solüsyonu: %0.025 Trypsin-EDTA (1X) (Gibco, #25200-056)
- ❖ PC3 Hücre Hattı: (ATCC, #CRL1435)
- ❖ LNCaP Hücre Hattı: (ATCC, #CRL1740)
- ❖ Steril Kabin: Esco Class II BSC
- ❖ İnkübatör: Heraeus HeraCell 150 (Karbondioksit, 37C°)
- ❖ Sıcak Su Banyosu: Raypa (20 ~80 C°)
- ❖ Mikroskop: Olympus CKX41 (Inverted)
- ❖ Soğutmalı Santrifüj: Beckman&Coulter Microfuge 22R (+4C°)
- ❖ Santrifüj: Nüve NF400
- ❖ Soğutucu: Bosch (-20 C°)
- ❖ Dondurucu: Hettich HS 2486 (-80 C°)
- ❖ Sıvı Azot Tankı (-196 C°)
- ❖ Hücre Dondurma Kabı: Nalgene® Cryo 1°C Freezing Container (#5100-0001)
- ❖ Medyum:
 - RPMI 1640 Besi Yeri (ATCC, #30-2001)
 - %10 FBS (LİFE TECH, #10270106)
 - %1 Penisilin/streptomisin (10.000 U/mL) (LİFE TECH, #15140122)
- ❖ Dondurma Medyumu:
 - %80 Medyum
 - %10 FBS
 - %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Bu çalışmada, hücre kültürü için, ATCC (American Type Culture Collection)'den satın alma yolu ile temin edilmiş olan PC3 (androjen dirençli) ve LNCaP (androjen duyarlı) prostat kanseri hücre hatları kullanıldı.

Hücre kültürü odasında çalışmaya başlamadan steril 75 cm²'lik flasklar ve 10 ml'lik pipetler UV'ye maruz kalacak şekilde oda masası üzerine çıkartıldı. Çalışmaya başlamadan 30 dk önce oda içi UV lambası, steril kabinin UV lambası ve 37°C'ye ayarlı su banyosu açıldı. 30 dk sonra steril kabin içerisi %70'lik alkol ile silindi ve steril kabin hava filtreleri çalıştırıldı. İlk olarak 50 ml'lik şişelerde bulunan %0.025 Trypsin-EDTA ve penisilin/streptomisin su banyosunda eritilerek 5 ml'lik steril enjektörlere bölündü ve -20°C soğutucuda saklandı. 500ml'lik şişelerde bulunan ve -20 °C soğutucuda saklanan Fötal Bovine Serum (FBS) su banyosunda eritildi ve 50 ml'lik steril falkonlara bölünerek daha sonraki medyum hazırlanmasında kullanılmak üzere -20 °C soğutucuda saklandı. Sonraki aşamada medyum hazırlığı yapıldı. Medyum hazırlamak için +4°C'de muhafaza edilen 500 ml RPMI 1640 besi yeri, -20°C soğutucuda saklanan 50 ml FBS ve 5 ml penisilin/streptomisin kullanıldı. RPMI 1640 besi yerinin 55 ml'si steril falkona alındı ve geri kalan 445 ml 1640 besi yerine 50 ml FBS ve 5 ml penisilin/streptomisin eklendi ve homojen şekilde karışım sağlandı. Hazırlanmış olan medyum 100 ml'lik steril cam şişelere bölünerek +4°C'de muhafaza edildi. Medyum içeren bu cam şişelerden bir tanesi su banyosuna koyularak 37°C'ye gelmesi sağlandı. Sıcaklığı 37°C'ye ulaşan medyum şişesi %70'lik alkolden geçirilerek steril kabin içerisine alındı. Steril 10ml'lik pipetler ve 75 cm²'lik flasklar da steril kabin içerisine alındı. Flasklar üzerine hücrenin adı ekilme tarihi ve pasaj sayısı yazıldı. Daha sonra 75 cm²'lik flasklara otomatik pipet ucuna takılan 10 ml'lik pipet ile 10 ml medyum eklendi. Bu işlem sonrasında sıvı azotta saklanan hücreler bulunduğu yerden alınarak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü ve medyum üzerine eklendi. Sonrasında her hücre için ayrı pipet kullanılarak pipetaj yapıldı ve hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlandı. Homojen dağılımı sağlanan flasklar 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı ve tek katman halinde kültüre edildi. Hücreler 24 saat sonra kontrol edildiğinde hücrelerin flask tabanına tutunduğu gözlemlendi. Hücre ekiminden üç gün sonra hücrelerin medyumları değiştirildi. Hücre kültürü kabininde çalışmaya başlamadan 30 dk önce 37°C'ye ayarlı su banyosu açıldı ve içerisine önceden hazırlamış olduğumuz ve 100 ml'lik şişelerde +4°C'de muhafaza ettiğimiz

medyum şişesi koyuldu ve oda içi UV lambası, steril kabinin UV lambası açıldı. 30 dk sonra steril kabin içerisi %70'lik alkol ile silindi ve steril kabin hava filtreleri çalıştırıldı. Su banyosu içerisindeki medyum şişesi %70'lik alkol ile silindikten sonra kabin içerisine alındı. İnkübatörde bulunan hücreler kabin içerisine alındı. Atık medyum kabı olarak kullandığımız steril şişe %70'lik alkol ile silinerek kabin içerisine alındı. Kabin içerisinde sağ tarafa temiz malzemeler, sol tarafa ise kirli malzemeler koyuldu. İlk olarak flasklar içerisindeki medyumlar her hücre için ayrı pipet olacak şekilde farklı pipetler ile atık medyum kabına atıldı. Sonrasında temiz bir pipet ucu ile taze medyum alınarak hücre flasklarına eklendi, her flaska yaklaşık 10 ml taze medyum eklendi.

3.1.1. Hücre Pasajlanması

Flask doluluğu %90 olduğu zaman hücreler pasajlandı. Pasaj işlemi öncesinde flaskların medyumunu uzaklaştırılarak yaklaşık 0,5 ml %0.025 Trypsin-EDTA eklendi ve tüm flask tabanına yayılarak FBS'nin etkinliğinin nötralize olması sağlandı ve uzaklaştırıldı. Pasaj için her flaska 2 ml %0.025 Trypsin-EDTA eklendi ve 2 dk'lığına inkübatör içerisinde tutuldu. Flasklar mikroskop altında hücrelerin flasktan ayrılıp ayrılmadığı değerlendirildikten sonra eğer hücreler ayrılmamışsa flaska nazik şekilde vurularak hücrelerin ayrılması sağlandı. Sonra içerisine %0.025 Trypsin-EDTA hacminin 3 katı kadar olacak şekilde 6 ml medyum eklendi ve böylece %0.025 Trypsin-EDTA'nın etkinliği durduruldu. Flaskın tabanı ve duvarları 10 ml'lik pipet kullanılarak içerideki hücre-medyum süspansiyonu ile iyice pipetlendi ve hücre süspansiyonu steril 10 ml'lik falkona alındı. 10 ml'lik falkonlar 1500 g'de 5dk santrifüj edildi ve oluşan süpernatant atıldıktan sonra pellet haldeki hücreler üzerine 1 ml medyum eklenerek süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonunun 100 µl'si içerisine 10 ml medyum koyulan flaska eklendi ve hücrelerin homojen dağılımı için iyice pipetlendi. Flasklar inkübatörde üç günde bir medyum değişimi yapılarak inkübasyonu sağlandı. PC3 hücreleri 20 pasaja, LNCaP hücreleri 23 pasaja kadar kullanıldı. Pasaj sayılarını dolduran hücreler atılarak sıvı azotta stoklanmış düşük pasaj sayılı hücrelerden çözülerek kullanıldı.

3.1.2. Hücrelerin Dondurulması

Santrifüj sonrası 1 ml medyum ile çözülen hücre süspansiyonunun 100 µl yeniden ekildikten sonra kalan 900 µl hücre süspansiyonu donduruldu. Bu hücre süspansiyonu 4

kryotüpe bölünecek şekilde toplam hacim 4 ml olacak şekilde dondurma medyumunu hazırlandı. 900 µl hücre süspansiyonu üzerine 2300 µl medyum, 400 µl DMSO ve 400 µl FBS sırasıyla eklenerek hücrelerin eşit dağılımı için pipetlendi. Kriyotüplere 1ml olarak eklendi ve hücre dondurma kabına konularak bir gece - 80°C’de bekletildi. Sonraki gün - 196°C’deki azot tankına alınarak stoklandı. Bu işlem tez için yeterli hücre stoğu oluşuncaya kadar devam etti.

3.2. Grupların Belirlenmesi

PC3 ve LNCaP hücrelerine Dosetaksel ve Abirateron asetat ilaçları uygulandı. Her hücre hattı kendi içinde 5 (beş) gruba ayrıldı.

1. **Kontrol grubu:** Bu grupta, sadece kültür medyumunu ile kültürasyon işlemi gerçekleştirildi.
2. **DMSO grubu:** Bu grupta, kültür medyumuna sadece uygulanan maddelerin çözüldüğü çözen solüsyonu (DMSO) eklenerek kültürasyon işlemi gerçekleştirildi. DMSO konsantrasyonu tümör hücreleri için sitotoksik olmayan <math><0,01</math> konsantrasyonunda ayarlandı.
3. **Dosetaksel grubu:** Bu grupta, kültür medyumuna çözen solüsyonu ile birlikte Dosetaksel eklenerek kültürasyon işlemi gerçekleştirildi.
4. **Abirateron asetat grubu:** Bu grupta, kültür medyumuna çözen solüsyonu ile birlikte Abirateron asetat eklenerek kültürasyon işlemi gerçekleştirildi.
5. **Abirateron asetat+Dosetaksel grubu:** Bu grupta, kültür medyumuna çözen solüsyonu ile birlikte Abirateron asetat+Dosetaksel eklenerek kültürasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.3. MTT Proliferasyon Testi ile İlaç Dozlarının Belirlenmesi

Kullanılan cihaz ve malzemeler;

- ❖ Cell Proliferation Kit I (MTT): (ROCHE, #11465007001)
 - MTT labeling reagent
 - Solubilization solution

- ❖ Thoma lamı, Çift Kamera, (CE): (Marienfeld, #C964710)
- ❖ Abirateron Asetat: (MEDKOO, #200030)
- ❖ Dosetaksel: (MEDKOO, #100270)
- ❖ Steril düz tabanlı 96 kuyucuklu plate: (Falcon®, #353072)
- ❖ Spektrofotometre: µQuant BioTek Spectrophotometer
- ❖ İnkübatör: Heraeus HeraCell 150 (Karbondioksit, 37C°)
- ❖ Medyum:
 - RPMI 1640 Besi Yeri (ATCC, #30-2001)
 - %10 FBS (LİFE TECH, #10270106)
 - %1 Penisilin/streptomisin (10.000 U/mL) (LİFE TECH, #15140122)

Hücre proliferasyon testi ile metabolik olarak aktif hücreler belirlenecektir. Aktif hücrelerin sarı renkte olan MTT'yi (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromidin) enzimatik olarak indirgemesi sonucu mor renk şekillenecek ve hücre içi formazan oluşacaktır.

Tetrazolyum tuzu çözeltileri renksizdir veya sadece zayıf renklidir ve formazan ürünü oluştururken güçlü renkli bir çözeltiliye dönüşür. Histokimya, hücre biyolojisi, biyokimya ve biyoteknoloji gibi farklı uygulamalar için yıllarca farklı tetrazolyum tuzları geliştirildi. Hücre kültürü uygulamaları için en önemli tetrazolyum tuzları MTT, XTT, MTS ve WST'dir (Berridge ve ark., 2005).

Hücre kültüründe, ilk ve en çok kullanılan tetrazolyum tuzu MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazolyum bromür)'dir. İlk defa Mosmann tarafından tanıtılan 96 kuyucuklu plâtelere yüksek çözünürlüklü taramalarda proliferasyon ve sitotoksiteyi ölçmek için kullanılmaktadır (Mosmann, 1983). Lipofilik yan grupları ve pozitif net yükü nedeniyle MTT, hücre zarını geçebilir ve canlı hücrelerde mitokondriyal veya hücre plazması enzimleri oksidoredüktazlar, dehidrojenazlar, oksidazlar ve peroksidazlar elektron vericisi olarak NADH, NADPH, süksinat veya piruvatı kullanarak MTT'yi indirgerler. Bu indirgenme, MTT'nin suda çözünmeyen formazana dönüştürülmesine neden olur. Formazan kristalleri iğne benzeri yapıda şekillenir, hücrenin bütünlüğünü bozar ve böylece hücre ölümüne yol açar. Bütünlüğün bozulması ile hücre metabolizması bozulur ve MTT'nin formazana reaksiyonu çok hızlı bir şekilde kesilir. Formazan

kristalleri hücre içi oluştuğu için, MTT'ye dayalı deney protokolleri genellikle bir spektroskopik ölçüm yapılmadan önce bir hücre lizis adımı ve birde formazan eritme adımı içerir (Berridge ve ark., 2005).

İlk gün hücreler medyum içerisinde 96 kuyucuklu platalere her kuyucuğa 5×10^3 hücre / 100µl olacak şekilde sayılarak ekildi ve grup başına 4 tekrar yapıldı. 37°C'lik inkübatörde 24 saat inkübe edilerek hücrelerin yapışması sağlandı. İkinci gün bütün hücrelerin medyumları uzaklaştırıldı ve kontrol, DMSO (%<0,01), 0,1 / 1 / 10 / 100 / 1000 µM abirateron asetat, 0,1 / 1 / 10 / 100 / 1000 nM dosetaksel içeren medyumlar kuyucuklara eklendi ve 37°C'lik inkübatörde 24, 48, 72, 96, 120 saat süreyle inkübe edildi. Üçüncü gün 24 saat süreyle uygulanan plate her kuyucuğa 10 µl MTT labeling reagent eklendi ve 37°C'lik inkübatörde 4 saat inkübe edilerek metabolik olarak aktif hücrelerde formazan oluşması sağlandı. 4 saat sonra her kuyucuğa 100 µl Solubilization solution eklendi ve 37°C'lik inkübatörde gece boyu inkübe edildi. Dördüncü gün sabah 24 saatlik plate spektrofotometrede 570 nm absorbans ve referans dalga boyu >650 nm olacak şekilde ölçüm yapıldı. Aynı gün 48 saat inkübe olan plate her kuyucuğa 10 µl MTT labeling reagent eklendi ve 37°C'lik inkübatörde 4 saat inkübe edilerek metabolik olarak aktif hücrelerde formazan oluşması sağlandı. 4 saat sonra her kuyucuğa 100 µl Solubilization solution eklendi ve 37°C'lik inkübatörde gece boyu inkübe edildi. Beşinci gün sabah 48 saat inkübe edilen plate spektrofotometrede ölçüldü. Aynı gün 72 saat inkübe edilen plate her kuyucuğuna 10 µl MTT labeling reagent eklendi ve 37°C'lik inkübatörde 4 saat inkübe edilerek metabolik olarak aktif hücrelerde formazan oluşması sağlandı. 4 saat sonra her kuyucuğa 100 µl Solubilization solution eklendi ve 37°C'lik inkübatörde gece boyu inkübe edildi. Altıncı gün sabah 72 saat inkübe edilen plate spektrofotometrede ölçümü yapıldı. Aynı gün 96 saat inkübe edilen plate her kuyucuğuna 10 µl MTT labeling reagent eklendi ve 37°C'lik inkübatörde 4 saat inkübe edilerek metabolik olarak aktif hücrelerde formazan oluşması sağlandı. 4 saat sonra her kuyucuğa 100 µl Solubilization solution eklendi ve 37°C'lik inkübatörde gece boyu inkübe edildi. Yedinci gün sabah 96 saat inkübe edilen plate'in spektrofotometrede ölçümü yapıldı. Aynı gün 120 saat inkübe edilen plate her kuyucuğuna 10 µl MTT labeling reagent eklendi ve 37°C'lik inkübatörde 4 saat inkübe edilerek metabolik olarak aktif hücrelerde formazan oluşması sağlandı. 4 saat sonra her kuyucuğa 100 µl Solubilization solution eklendi ve 37°C'lik inkübatörde

gece boyu inkübe edildi. Sekizinci gün sabah 120 saat inkübe edilen plate'in spektrofotometrede ölçümü yapıldı. Bütün uygulamalar aseptik koşullarda yapıldı.

Spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen bütün verilerin analizi için GraphPad Prism 6 Software (GraphPad Software, Inc.) kullanılarak abirateron asetat ve dosetakselin LNCaP ve PC3 hücreleri proliferasyonları üzerine etkinlikleri IC50 (hücre proliferasyonunu %50 oranında inhibe eden doz) değerine göre hesaplandı.

3.4. Western Blot Analizi

3.4.1. PC3 ve LNCaP Hücre Lizatı Hazırlama

Kullanılan solüsyonlar;

- ❖ Lizis Buffer:
 - 10ml 0,1M Tris (pH 7.4), (Bio-Rad, #161-0719)
 - 90ml distile su, 1ml 100X Na-orthovanadate (Sigma, #S6508)
 - 1gr SDS (Sigma, #L4390)
- ❖ Proteaz İnhibitör Kokteyli (1X):
 - 40 µl PİK 25X (2 ml dH₂O + 1 tablet PİK (Roche, #11697498001))
 - 600 µl dH₂O
- ❖ PBS:
 - 100 ml dH₂O
 - Phosphate Buffer Saline (PBS) Tablet (Invitrogen, #003002)
- ❖ Hücre kazıyıcı (Cell Scraper, Corning #3010)
- ❖ Sonikatör: Bendelin UW2070
- ❖ Soğutmalı Santrifüj: Beckman&Coulter Microfuge 22R (+4°C)

Her grup için ayrı bir 75cm²'lik flaska hücre ekimi yapıldı. Flask hücre doluluğu %70-80 ulaştığı zaman gruplara ve dozlara uygun ilaç uygulaması yapıldı. 72 saat 37°C'lik inkübatörde inkübe edildikten sonra, 75cm²'lik flasklardaki hücrelerin medyumunu uzaklaştırılarak hücreler 3-4 ml soğuk PBS ile 2 kez yıkandı. Yıkamanın ardından 500 µl Laemli Buffer + 8 µl PİK karışımı flaska eklendi ve flask tabanına iyice yayıldı. Hücre kazıyıcı yardımı ile hücreler kazınarak 1,5ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı ve buz üzerine alındı. Eppendorflardaki hücreler 10 sn %70 power güç ile 9 siklus sonikatörden

geçirildi. Sonraki aşamada +4°C’de 20 dk 12000 rpm santrifüj yapılarak süpernatantlar yeni ependorflara alındı. Protein ölçümü yapılanaya kadar hücre lizatları -20 °C’de saklandı.

3.4.2. Protein Miktarının Belirlenmesi

Kullanılan solüsyonlar ve cihazlar;

- ❖ Bovine Serum Albümin (BSA)(Sigma, #A9647)
- ❖ Bicinchoninic Acid Kit (BCA):
 - Bicinchoninic Acid Solution (Sigma, #B9643-1L)
 - Copper (II) sulfate solution (Sigma, #C2284-25mL)
- ❖ Lizis Buffer:
 - 10ml 0,1M Tris (pH 7.4), (Bio-Rad, #161-0719)
 - 90ml distile su, 1ml 100X Na-orthovanadate (Sigma, #S6508)
 - 1gr SDS (Sigma, #L4390)
- ❖ İnkübatör: Nüve EN 500
- ❖ Spektrofotometre: µQuant BioTek Spectrophotometer

Lizatların içerdiği protein miktarının belirlenmesi için BCA yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde standart olarak protein içeriği 1mg/ml olan BSA kullanıldı. BSA’nın S0 (1000 µg/ml), S1 (500 µg/ml protein), S2 (250 µg/ml), S3 (125 µg/ml), S4 (62,5 µg/ml), S5 (31,3 µg/ml), S6 (15,6 µg/ml), S7 (7,8 µg/ml) dilüsyonları yapılarak standart protein aralığı hazırlandı. Lizatlar, 1:50 oranında lizis buffer ile dilüe edildi ve iyice vortekslendi. Kör olarak lizis buffer kullanıldı. BCA kit içeriğindeki Bicinchoninic Acid Solution ve Copper(II) Sulfate Solution’nun karışımı 98:2 oranında sağlanarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Ardından 96 kuyucuklu plate standartlar, blank ve örnekler kuyucuğa 25 µl olacak şekilde yüklendi. Üzerlerine her kuyucuğa 200 µl olacak şekilde çalışma solüsyonu eklendi. Her kuyucukda toplam hacim 225 µl oldu. Daha sonra 60°C’lik inkübatörde 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okunması sağlandı. Standartlar ile karşılaştırılarak her bir numunenin protein miktarı tespit edildi. Tüm numunelerin protein miktarlarının eşit olması sağlanarak Western Blot analizlerinde kullanıma hazır hale getirildi.

3.4.3. SDS-PAGE Western Blot Protokolü

Kullanılan solüsyonlar;

- ❖ Sample Buffer 2X, Laemmli electrophoresis Reagent (Sigma, # S-3401)
- ❖ 5X Yürütme Tamponu:
 - 9 g Tris (Bio-Rad, #161-0719)
 - 43.2 g Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
 - 3g SDS (Sigma, #L4390)
 - 600 ml Distile Su
 - Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı
- ❖ Transfer Tamponu:
 - 14.3 g Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
 - 3 g Tris (Bio-Rad, #161-0719)
 - 700 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Bu solüsyona 200 ml Metanol (Merck, #1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- ❖ Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):
 - 5g süt tozu (Bio-Rad) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4°C'de en fazla 24 saat kalacak şekilde muhafaza edildi.
- ❖ 10X TBS Tamponu:
 - 60.55 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719) 41
 - 87.66 gr NaCl (Carlo Erba, #368257)
 - 800 ml distile suda çözdürülür. PH HCl ile 7.4'e ayarlanır. PH ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.
- ❖ TBS-T Solüsyonu:
 - 1 litre 1X TBS içerisine 1000µl Tween-20 (Lab Vision, #TA-125-TW) eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.
- ❖ Hybond blotting paper (GE Healthcare, #RPN6101M)
- ❖ Blotting-Grade Blocker nonfat dry milk (Süt tozu) (Bio-Rad, #170-6404)
- ❖ West Pico Chemiluminescent substrates (Thermo, #34080)
- ❖ PVDF Membran (Bio-Rad, #162-0177)
- ❖ Kaleidoscope Prestained Standards, broad range (Bio-Rad, #161-0324)

- ❖ CL-Xposure film 18x24 cm (Thermo Scientific, #34089)
- ❖ İlford Multigrade Paper Developer 5L (ILFORD, #1757855)
- ❖ İlford Rapid Film&Paper Fixer 5L (ILFORD, #1984565)

Protein ölçümü sonrası hazırlanan lizatların protein miktarları distile su ile eşitlendi. Sonrasında lizatlar 1:1 oranında lemlerle karıştırıldı ve 95°C’de 5 dakika kaynatılarak numuneler yüklemeye hazır hale getirildi. Çalışılacak olan proteinin kilo dalton (kDa) ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Her kuyucuğa 10 mikrolitre numune yüklenerek jel elektroforezi gerçekleştirildi. Elektroforez sonrasında immunoblotting yapılarak jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda sıcaklığında pH’sı 7.2-7.4 olan, % 0.1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solüsyonu ile hazırlanan % 5 lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Membran Notch1, Jagged1, Hes1 ve Beta Aktin antikorları ile uygun sıcaklık ve sürede karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar liste halinde Tablo 3.4.1.’de görülmektedir. İnkübasyon sonrasında, 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkamanın ardından membran, sekonder antikorla oda ısısında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar 3 kez 10 dakika (dk) TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membran Chemiluminisans’la uygun sürede geliştirilip, membrandaki protein bantları karanlık odada hiperfilme aktarıldı.

Tablo 3. 1. Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Primer Antikor	Dilüsyon	Katalog numarası	Sekonder Antikor
Notch1	1:1000	Cell Signaling 4380S	1:2000 Vector PI-1000
Jagged1	1:350	Santa Cruz Sc6011	1:2000 Vector PI-9500
Hes1	1:1000	Cell Signaling 11988S	1:2000 Vector PI-1000
Beta Aktin	1:1000	Cell Signaling #4970	1:2000 Vector PI-1000

3.5. İmmüno Floresan Boyanma ve Analizi;

Kullanılan cihaz, malzeme ve solüsyonlar;

- ❖ BD Falcon® 8 Well Culture Slide: (BD Falcon, #354118)
- ❖ Aseton: (Merck, #1.00.014.2500)
- ❖ Metanol: (Merck, #1.06.008.2500)
- ❖ Kapatma Medyumu: (Vector, #H-1000)

- ❖ UV Block: (LabVision Corporation, #TA-125UB)
- ❖ Thoma lamı, Çift Kamera, (CE): (Marienfeld, #C964710)
- ❖ İnkübatör: Heraeus HeraCell 150 (Karbon dioksit, 37°C°)
- ❖ Floresan Mikroskopu: Olympus BX61
- ❖ PBS:
 - 100 ml dH₂O
 - 1 adet Phosphate Buffer Saline (PBS) Tablet: (Invitrogen, #003002)
- ❖ Permeabilizasyon Solüsyonu:
 - 40 ml PBS
 - 40 µl Triton X 100 (Alfa aesar, #A16046)
- ❖ DAPI 1000X
 - 1 ml dH₂O
 - 1 mg DAPI (4,6 Diamidino-2 phenylindole): (Sigma, #08417)
 - Distile su ile 1X olacak şekilde dilüe edilerek kullanılır.
- ❖ Medyum:
 - RPMI 1640 Besi Yeri (ATCC, #30-2001)
 - %10 FBS (LİFE TECH, #10270106)
 - %1 Penisilin/streptomisin (10.000 U/mL) (LİFE TECH, #15140122)

PC3 ve LNCaP hücreleri thoma lamı ile sayılarak 8 kuyucuklu Chamber slide'lara hücre ekimi yapıldı. Her kuyucuğa 250 ml medyum içerisinde 10⁴ hücre ekimi yapıldı. Gece boyunca 37°C'lik inkübatörde tutuldu ve kontrol edildi. Kuyucuktaki hücre doluluğu %70-80 oranında ise kuyucuk içerisindeki medyum uzaklaştırıldı ve gruplara uygun ilaç uygulamaları yapılarak 72 saat 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası chamber slide'lar soğuk PBS ile yıkanıp, 1:1 oranında metanol-aseton karışımı (soğuk) ile -20°C'de 10dk fikse edildi. Sonrasında metanol-aseton karışımı uzaklaştırılarak oda sıcaklığında gece boyu kurumaya bırakıldı. Aynı gün içerisinde kullanılmayacaksa -20°C'de saklanabilir. Kurutmadan sonra örnekler PBS ile 2 kez 5 dk yıkandı ve permeabilizasyon solüsyonu ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonra PBS ile 2 kez 5 dakika yıkanarak Ultra V Block ile 5 dk bloklama yapıldı. PBS ile hazırlanmış olan Notch1, Jagged1 ve Hes1 primer antikörleri oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. PBS ile 2 x 5 dk yıkama yapıldı. Sonrasında floresan işaretli sekonder antikor ile 45 dk karanlıkta

ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar liste halinde Tablo 3.5.1.'de görülmektedir. Bu aşamadan sonra slaytlar hep karanlıkta tutuldu. PBS ile 2 x 5dk yıkama sonrası DAPİ ile 1dk inkübe edildi. Tekrar PBS ile 2 x 5dk yıkama yapıldı ve kapama solüsyonu ile kapatıldı. Bütün gruplarda, NOTCH1, JAGGED1 ve HES1 proteinlerinin immüno Floresan boyanmaları Floresan mikroskobu ile görüntüledi ve fotoğraflandırıldı. Elde edilen fotoğraflar, Image J programı ile analizleri yapılarak değerlendirildi.

Tablo 3. 2. İmmüno Floresan analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Primer Antikor	Dilüsyon	Katalog numarası	Sekonder Antikor
Notch1	1:100	Cell Signaling 4380S	1:500 Thermo A-110034
Jagged1	1:250	Abcam ab109536	1:500 Thermo A-110034
Hes1	1:100	Cell Signaling 11988S	1:500 Thermo A-110034

3.6. Kantitatif RT-PCR Analizi

Görel ve kesin mRNA miktarını belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir yöntem olan kantitatif real time PCR, gen ekspresyonu çalışmalarında yoğun olarak kullanılan güvenilir bir tekniktir. Notch sinyal yolağı üyelerinden *NOTCH1*, *JAGGED1* ve *HES1*'in abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel uygulanmış LNCaP ve PC3 metastatik prostat kanser hücre hatlarında gen ekspresyonlarını belirlemek için sırasıyla total RNA izolasyonu, DNaz uygulaması, cDNA eldesi ve real time PCR basamakları uygulandı.

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Kullanılan cihaz, malzeme ve solüsyonlar;

- ❖ Kuru ısıtıcı: Dry Bath Incubator, MK200-2
- ❖ Vorteks: Genie 2- Scientific Industries, Inc.
- ❖ Soğutmalı Santrifüj: Beckman&Coulter Microfuge 22R (+4C°)
- ❖ Hücre kazıyıcı (Cell Scraper, Corning #3010)
- ❖ Dondurucu: Hettich HS 2486 (-80 C°)
- ❖ Trizol (İnvitrogen, #15596018)
- ❖ Kloroform (Fisher Scientific, #BP1145-1)
- ❖ İzopropanol (Merck, #8187661000)

- ❖ 100 ml %70'lik Etanol
 - 70 ml Ethanol Absolute (Merck, #100983)
 - 30 ml Nükleaz free water (LIFE TECH, #10977-023)
- ❖ 100 ml PBS:
 - 100 ml Nükleaz free water (LIFE TECH, #10977-023)
 - Phosphate Buffer Saline (PBS) Tablet (Invitrogen, #003002)

Her grup için ayrı bir 75cm²'lik flaska hücre ekimi yapıldı. Flask hücre doluluğu %70-80 ulaştığı zaman gruplara ve dozlara uygun şekilde ilaç uygulaması yapıldı. 72 saat 37°C'lik inkübatörde inkübe edildikten sonra, 75cm²'lik flasklardaki hücre medyumları aspire edilerek hücreler 1-2 ml soğuk PBS ile 2 kez yıkandı ve PBS tamamen aspire edilerek üzerine 1 ml Trizol eklendi. Flask tabanına iyice yayılması sağlandı ve hücre kazıyıcı ile flask tabanı tamamen kazınarak bir kenarda birikmesi sağlandı. Pipet yardımı ile hücre+trizol süspansiyonu 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Tüpler, oda sıcaklığında beş dakika inkübe edildikten sonra üzerlerine 100 µl kloroform eklendi; iyice karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda tüpler, 15 dakika, +4°C'de, 13200 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde RNA'nın bulunduğu şeffaf kısım, mikropipet ile steril 1.5 ml'lik yeni tüplere alındı. Tüplere 500 µl izopropanol eklenip, yavaşça çalkalandı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda, tüpler 8 dakika, +4°C'de, 11000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerin süpernatantları atılıp, geriye kalan pelet üzerine 1 ml %70'lik etanol eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Tüpler 5 dakika +4°C'de 8400 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatantları mikropipet yardımıyla atıldı. Tüpler oda sıcaklığında en fazla 10 dakika bekletildikten sonra, 50 µl RNaz içermeyen distile su ile çözüldü. Çözülen RNA'ları içeren tüpler kuru ısıtıcı ile 55 °C'de 10dk inkübe edildi ve -80 °C'de saklandı.

3.6.2. İzole Edilen RNA'lara DNaz Uygulaması:

Kullanılan cihaz ve malzemeler;

- ❖ Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)
- ❖ RNase-Free DNase Set (50) (QIAGEN, #79254)
 - RNase-free DNase I
 - RNase-free Buffer RDD

- RNase-free water for 50 RNA
1. Genomik DNA'nın ortamdan uzaklaştırılması için DNaz uygulaması gerçekleştirilecek. Elde edilen RNA hacminden $\leq 87,5$ μl ayrı steril bir 0.2 ml'lik ependorfa alındı üzerine 10 μl RNaz içermeyen Buffer RDD solüsyonundan ve 2,5 μl RNaz içermeyen DNaz I stok solüsyonundan eklendi ve toplam hacim steril RNaz içermeyen distile su ile 100 μl 'ye tamamlandı. 0.2 ml'lik PCR tüpüne konulan içerikler, 20-25°C'de 10 dakika inkübe edildi.
 2. Genomik DNA uzaklaştırıldıktan sonra Epoch cihazı ile RNA saflığı ölçüldü.

3.6.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

Kullanılan cihaz ve malzemeler;

- ❖ PCR Cihazı: MyCycler Thermocycler, BioRAD
- ❖ Votrex: Genie 2- Scientific Industries, Inc.
- ❖ RETROscript (40 rxn) Kit (Life tech, #AM1710)
 - Random Dekamer
 - 10X Tampon RT
 - dNTP (2.5 mM)
 - RNaz inhibitör (10 unit/ μl)
 - MMLV-geri transkriptaz
 - RNase-free water

DNaz uygulaması yapılmış olan tüplerin her birine homojen ve eşit miktarda reaksiyon karışımı ekleyebilmek amacıyla bir ana karışım hazırlandı. Ana karışımdan her bir tüpe 8 μl koyuldu.

İçerik	Hacim (μl)	Son konsantrasyon (20 μl 'de)
10X Tampon RT	2	1x
dNTP (2.5 mM)	4	0.5 mM
RNaz inhibitör (10 unit/ μl)	1	10 unite
MMLV-geri transkriptaz	1	100 unite
Toplam	8	

1. 0.2 µl'lik reaksiyon tüplerine izole edilmiş olan RNA'lardan 2 µg'lık hacimde konularak üzerlerine 2 µl random dekamer eklendi ve toplam hacim RNaz içermeyen distile su ile 12 µl'ye tamamlandı. RNA ve random dekamer karışımı thermal cycler'da 85°C'de 3 dakika inkübe edildi, sekonder RNA kıvrımlarının açılması sağlandı.
2. Daha sonra, her bir tüpe 8 µl ana karışımdan eklendi ve 44°C'de, 60 dakika inkübe edildi.
3. Son olarak tüplerin, 92°C'de 10 dakika inkübasyonu sonucunda elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.6.4. qRT-PCR Uygulama Basamakları

Kullanılan cihaz ve malzemeler;

- ❖ Rotor-Gene® Q Pure Detection qRT-PCR cihazı (Qiagen)
- ❖ IQtm SYBR green super mix (BIORAD, #170-8880)
- ❖ Notch1 Primer (İnvitrogen)
- ❖ Jagged1 Primer (İnvitrogen)
- ❖ Hes1 Primer (İnvitrogen)
- ❖ Beta Aktin Primer (İnvitrogen)
- ❖ Nükleaz free water (LIFE TECH, #10977-023)

Çalışmada, her hücrede sabit miktarda eksprese olduğu bilinen beta aktin gen ekspresyonu temel alınarak abirateron asetat, dosetaksiel ve abirateron asetat+dosetaksiel uygulanmış PC3 ve LNCaP metastatik prostat kanser hücre hatlarında *NOTCH1*, *JAGGED1* ve *HES1* genlerinin kantitatif ekspresyon düzeyleri belirlendi. Aşağıdaki belirtilen içerikler konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

İçerik	Miktar (µl)
1. SybrGreen süper karışımı	12.5
2. Primer 1 (10 µM)	0.75
3. Primer 2 (10 µM)	0.75
4. Nükleaz içermeyen su	10.0
5. cDNA	1

Tablo 3. 3. qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler.

	Forward primer	Reverse primer	Annealing sıcaklığı (°C)
Notch1	5'-CACTGTGGGCGGGTCC-3'	5'-GTTGTATTGGTTCGGCACCAT-3'	56,1
Jagged1	5'-CAACCGCATCGTGCTGC-3'	5'-CGCCTCCACAAGCAACGTAT-3'	58,7
Hes1	5'-AGTGAAGCACCTCCGGAA C-3'	5'-CGTTCATGCACTCGCTGA-3'	56,5
Beta Aktin	5'-CCACACTGTGCCCATCTAC G-3'	5'-AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC AG-3'	57

Notch sinyal yolağı üyeleri Notch1, Jagged1, Hes1 ve Beta aktin için qRT-PCR uygulaması üç kuyucuklu (triplicate) olarak gerçekleştirildi. Kullanılan primerler liste halinde Tablo 3.6.1.'de görülmektedir. Notch1, Jagged1, Hes1 ve beta aktin için hazırlanan örnekler kantitatif qRT-PCR aletinde analiz edildi. Amplifikasyon, 40 siklusta gerçekleştirildi. Ayrıca, melting curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen T_m değerleri karşılaştırılarak, PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirildi.

1. qRT-PCR programı

Başlangıç denatürasyonu (1x):

95°C'de 3 dakika

10 siklus (touch-down uygulandı) (-1°C/siklus)

92°C → 20 saniye

65°C → 20 saniye

72°C → 30 saniye

30 siklus

92°C → 20 saniye

55°C → 20 saniye

72°C → 30 saniye

Melting curve

1 siklus

95°C → 1 dakika

55°C → 1 dakika

80 siklus (her siklusta 0.5°C artmakta)

55°C → 10 saniye

2. qRT-PCR aletinin vermiş olduğu görelî miktara göre *NOTCH1*, *JAGGED1* ve *HES1* gen ekspresyonlarının görelî değışimleri belirlendi.

Normalize hedef genin ekspresyonu=hedef genin görelî miktarı/ beta aktin görelî miktarı formülü ile normalize değerler bulundu. Abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel uygulanmış PC3 ve LNCaP metastatik PCa hücre hatlarından elde edilen bu değerlerden en küçüğüne diğer gruplardan elde edilen değerler bölünerek *NOTCH1*, *JAGGED1* ve *HES1* genlerinin ekspresyonlarındaki kat değışimleri belirlendi. Elde edilen bulgular, istatistiksel olarak değlendirilerek farklı prostat kanseri tedavileri sonrasında Notch sinyal yolağı üyelerinden Notch1, Jagged1 ve Hes1 kantitatif değışimleri belirlendi.

Proje kapsamında gerçekleştirilen tüm parametreler 3 kez tekrarlandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Kontrol, DMSO, abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında; Hücre proliferasyon testinin matematiksel değerlerinin istatistiksel analizi Sigma Plot 12.0 (Systat Software, San Jose, California, USA) programı ile yapıldı ve $p \leq 0,001$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

NOTCH1, JAGGED1 ve HES1 proteinlerinin immünofloresan ve Western Blot bulguları İmageJ programı ile değlendirildi. Western Blot verileri Beta Aktin yoğunluklarına göre normalize edildi. Değerler Sigma Plot 12.0 programı kullanılarak One Way ANOVA testi Holm Sidak metodu ile istatistiksel olarak analizi yapıldı ve $p \leq 0,001$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Farklı deney gruplarında; kantitatif real time PCR sonrası *NOTCH1*, *JAGGED1* ve *HES1* genlerinin ekspresyonlarının istatistiksel analizleri Sigma Plot 12.0 programı kullanılarak one-way ANOVA testinde Holm Sidak metodu kullanılarak yapıldı ve $p \leq 0,001$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmamızda, yaptığımız istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, kontrol grubu ile DMSO (çözgen) grubu arasında anlamlı bir istatistiksel fark bulunamadı ($p>0,001$).

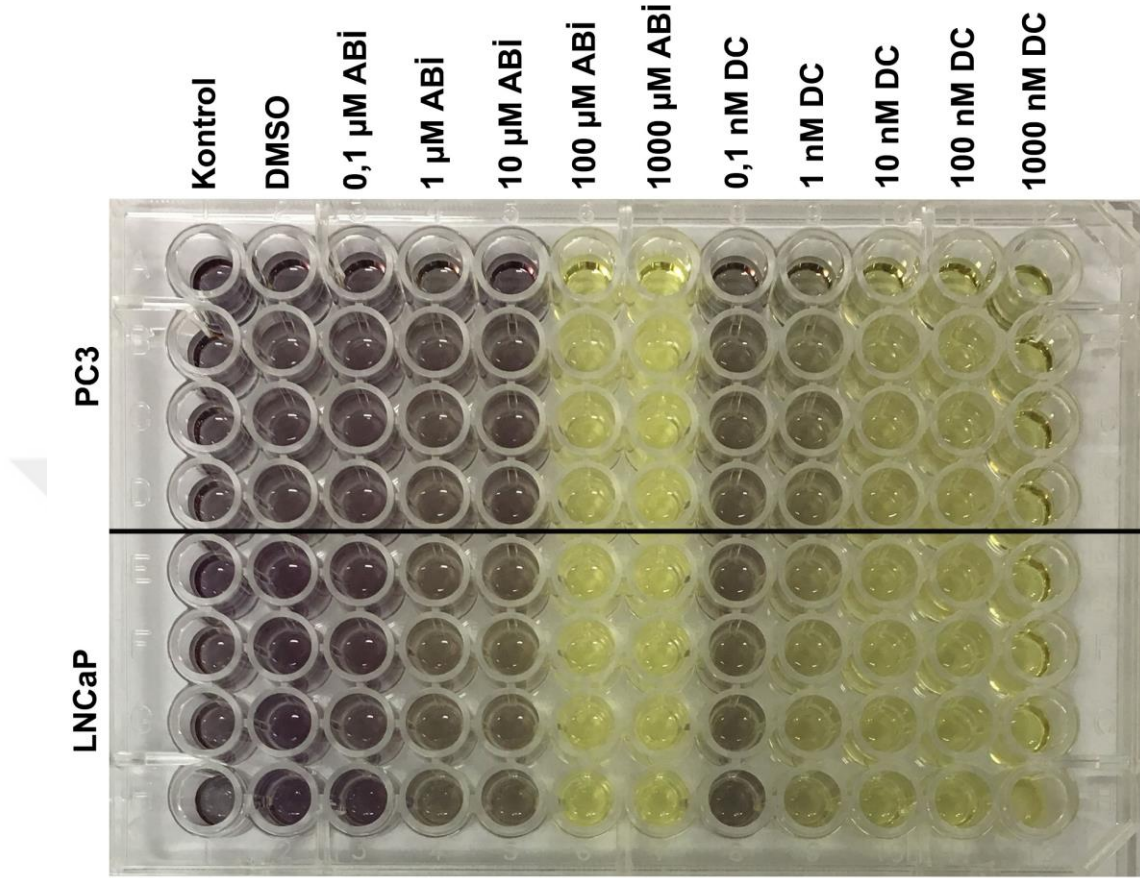
Ayrıca, daha önce yapılan çalışmalarda (Brossard ve ark., 2013; Weiss ve ark., 2016); ilaç gruplarının IC50 değeri standardizasyonları, DMSO grubu (çözgen grubu) temel alınarak yapılmış olduğu anlaşılmaktadır.

Dolayısıyla bizim çalışmamızda da, daha önceki çalışmalarda yapıldığı gibi, tüm anlamlılık testleri, DMSO (çözgen) grubu temel alınarak yapıldı.

Gruplar arasındaki anlamlılıklar, a; DMSO, b; Abirateron asetat, c; Dosetaksel, d; Abirateron asetat+Dosetaksel, e; Abirateron asetat ve Abirateron asetat+Dosetaksel, ve f; DMSO, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarına göre istatistiksel anlamlılığı gösterir şekilde simgelendirildi ($p<0,001$).

4.1. MTT Proliferasyon Testi Bulguları

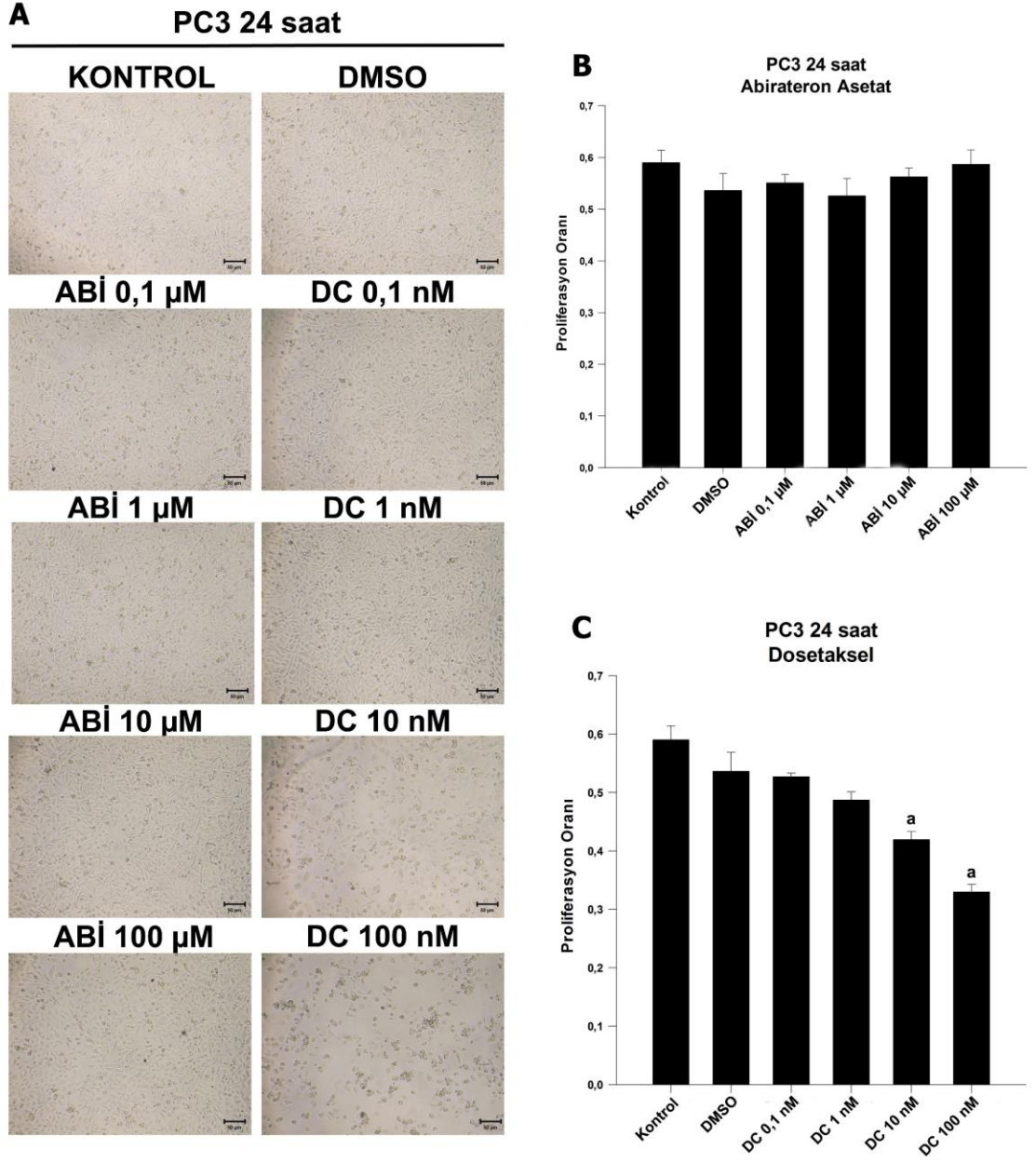
Hücre kültürü sonrasında, PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücreleri 96 kuyucuklu plate ekilerek literatürde belirtilen dozlar ve süreleri kapsayacak şekilde, abirateron asetat ve docetaksel ile inkübe edildi. Sonrasında, MTT proliferasyon testi uygulandı. Uygulama sonucunda, canlı hücrelerin oranının azalışına bağlı olarak renk mor renkten açık yeşile doğru değişim gösterdiği belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 96 kuyucuklu platlerde, MTT proliferasyon testi uygulaması sonrasında kuyucuklardaki renk değişimi görünümü. Şekilde, canlı hücrelerin oranının azalışına bağlı olarak renk mor renkten açık yeşile doğru değişim gösterdiği görülmektedir. **DMSO**: dimetil sülfoksit, **ABI**: abirateron asetat, **DC**: dosetaksel.

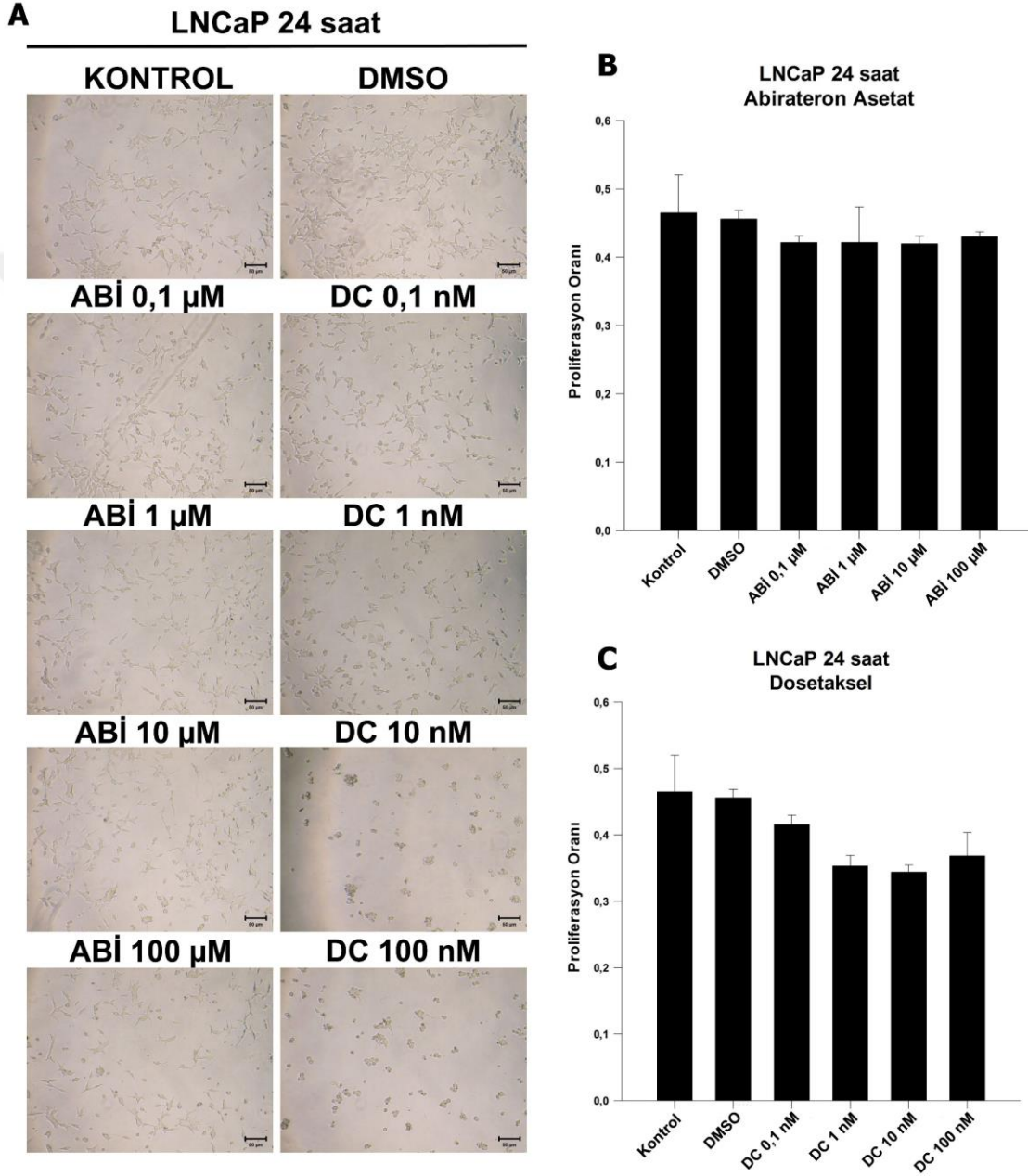
4.1.1. Abirateron Asetat ve Dosetaksel'in Farklı Dozları ile 24 Saat İnkübasyon:

PC3 hücrelerinin abirateron asetat'ın farklı dozları ile 24 saat inkübasyonu, PC3 hücrelerinin proliferasyonunu, DMSO grubuna göre anlamlı bir şekilde değiştirmedir ($p > 0,001$) (Şekil 4.2.A, Şekil 4.2.B). Buna karşılık, PC3 hücrelerinin dosetaksel'in 10 nM, 100 nM doz uygulanan gruplarında, proliferasyon oranı, DMSO'ya göre anlamlı bir azalış gösterdiği belirlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.2.A, Şekil 4.2.C).



Şekil 4.2. PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 24 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi bulguları. **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozlarının uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin invert mikroskopu ile görünümü gözlenmektedir (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABI:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

LNCaP hücrelerinin, abirateron asetat ve dosetaksel'in farklı dozları ile 24 saat inkübasyonu sonrasında, DMSO gruplarına göre proliferasyonun anlamlı bir şekilde değişmediği gözlemlendi ($p>0,001$) (Şekil 4.3.A, Şekil4.3.B, Şekil 4.3.C).

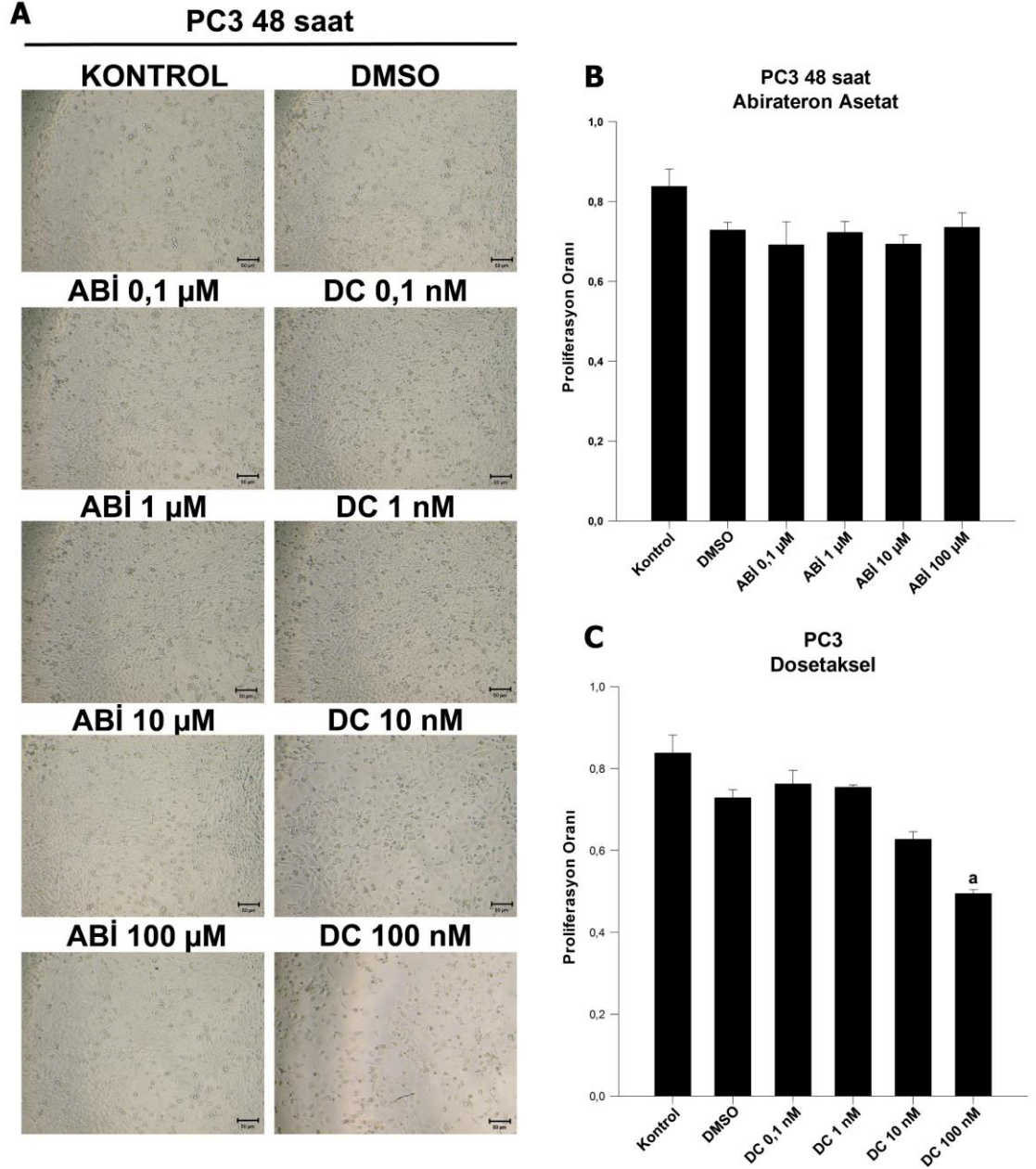


Şekil 4.3. LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 24 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi bulguları **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozlarının uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin görünümü (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel.

4.1.2. Abirateron Asetat ve Dosetaksel'in Farklı Dozları ile 48 Saat İnkübasyon:

PC3 hücrelerinin abirateron asetat ile 48 saat inkübasyonu sonrasında, DMSO grubu ile abirateron asetat uygulanan gruplar arasında anlamlı bir proliferasyon farkı gözlenmedi ($p>0,001$) (Şekil 4.4.A, Şekil 4.4.B). Dosetaksel uygulanan gruplardan 100 nM doz grubunda, proliferasyon oranı ise DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0,001$) (Şekil 4.4.A, Şekil 4.4.C).

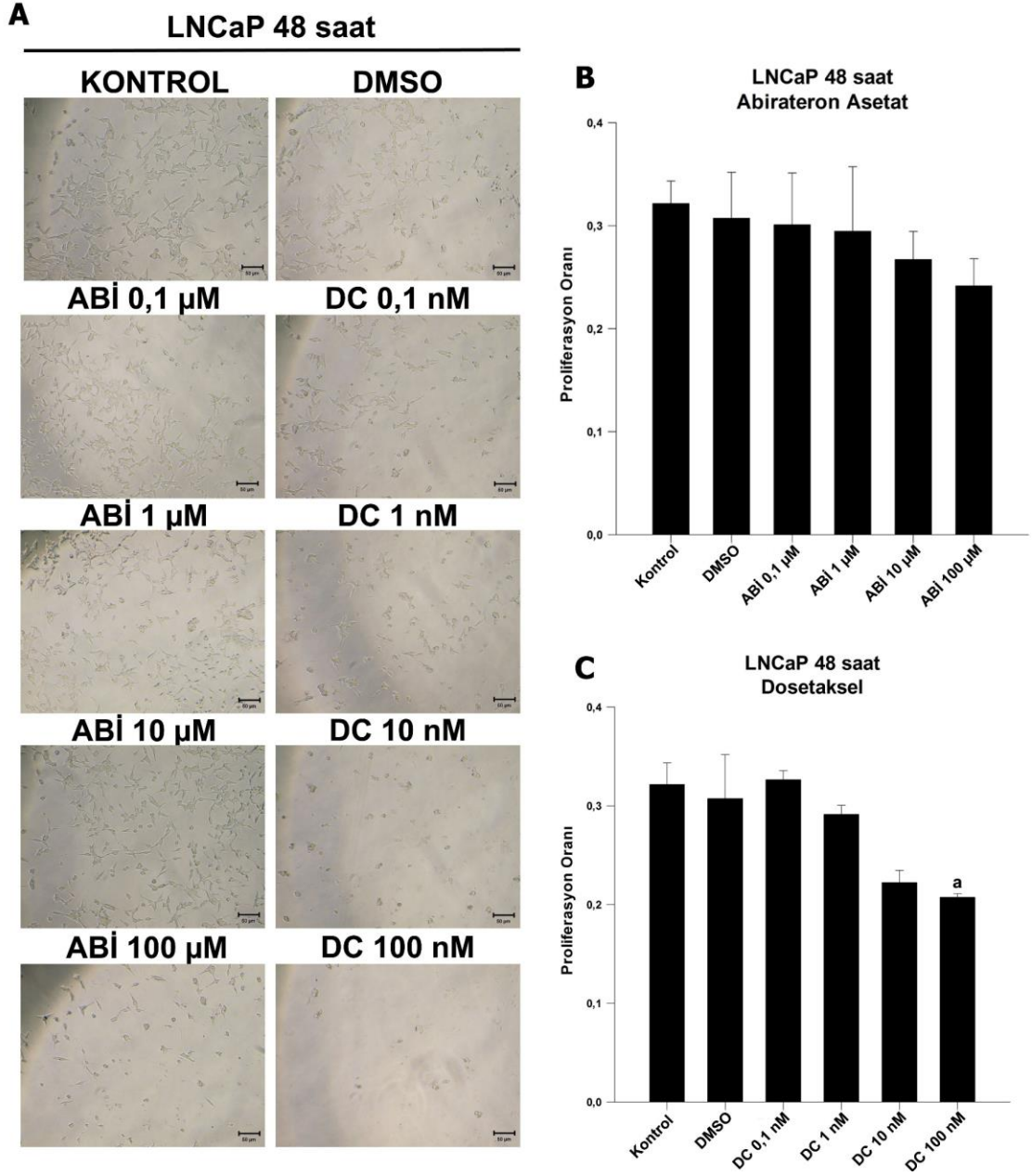




Şekil 4.4. PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi bulguları. **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozların uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin görünümü (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

LNCaP hücrelerinde, abirateron asetat uygulanan gruplar ile DMSO grubu arasında anlamlı bir proliferasyon farkı gözlenmedi ($p > 0,001$) (Şekil 4.5.A, Şekil 4.5.B). Dosetaksel uygulanan gruplarda ise, 100 nM doz grubunda DMSO grubuna göre hücre

proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.5.A, Şekil 4.5.C).

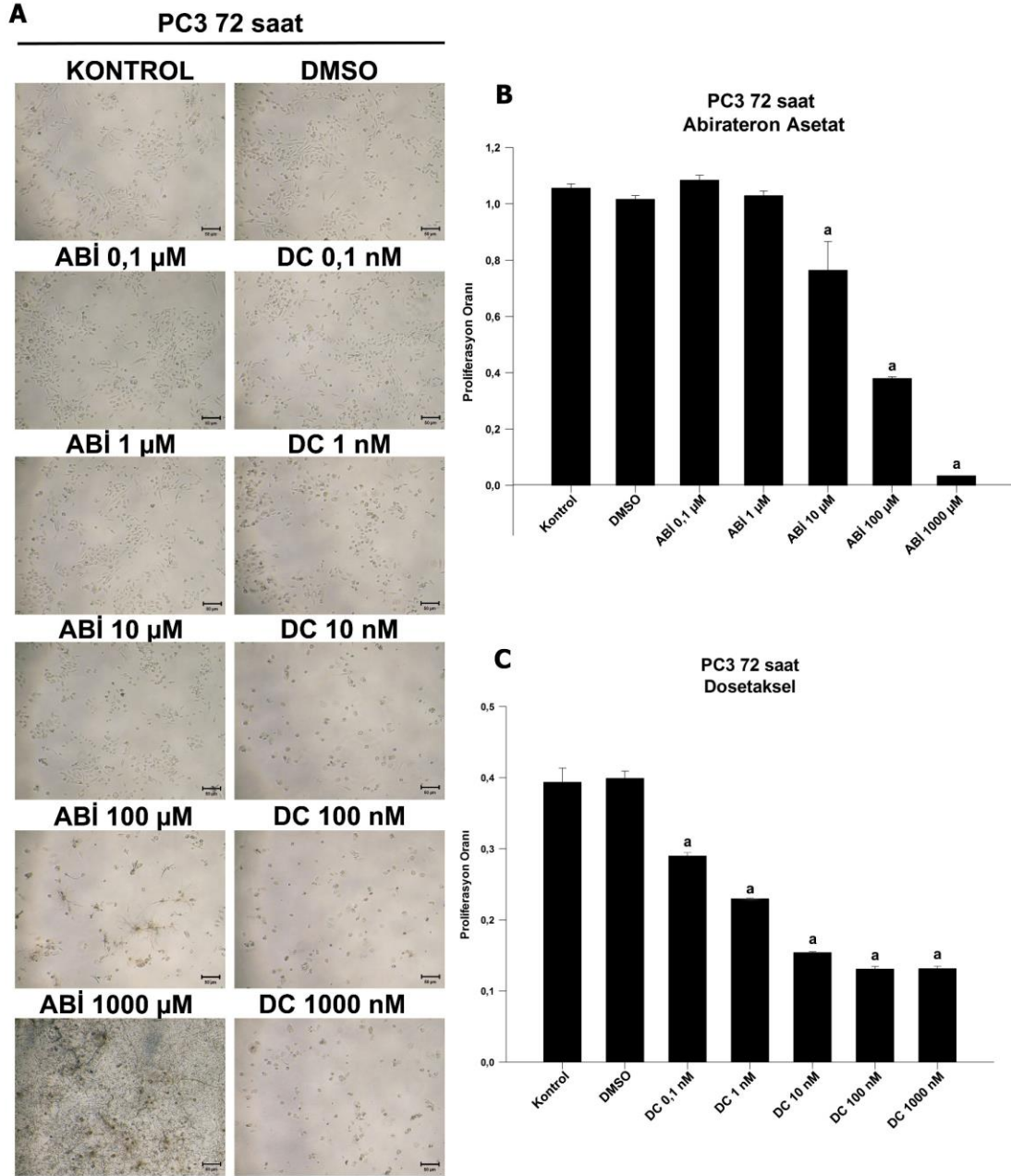


Şekil 4.5. LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi bulguları **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozların uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin invert mikroskupu ile görünümü (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

4.1.3. Abirateron Asetat ve Dosetaksel'in Farklı Dozları ile 72 Saat İnkübasyon:

PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel'in farklı dozları ile 72 saat inkübasyonu sonrasında, abirateron asetatın 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M dozlarında ($p<0,001$) (Şekil 4.6.A, Şekil 4.6.B), dosetaksel uygulamasının ise, bütün grupların proliferasyon oranını, DMSO'ya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı ($p<0,001$) belirlendi (Şekil 4.6.A, Şekil 4.6.C).



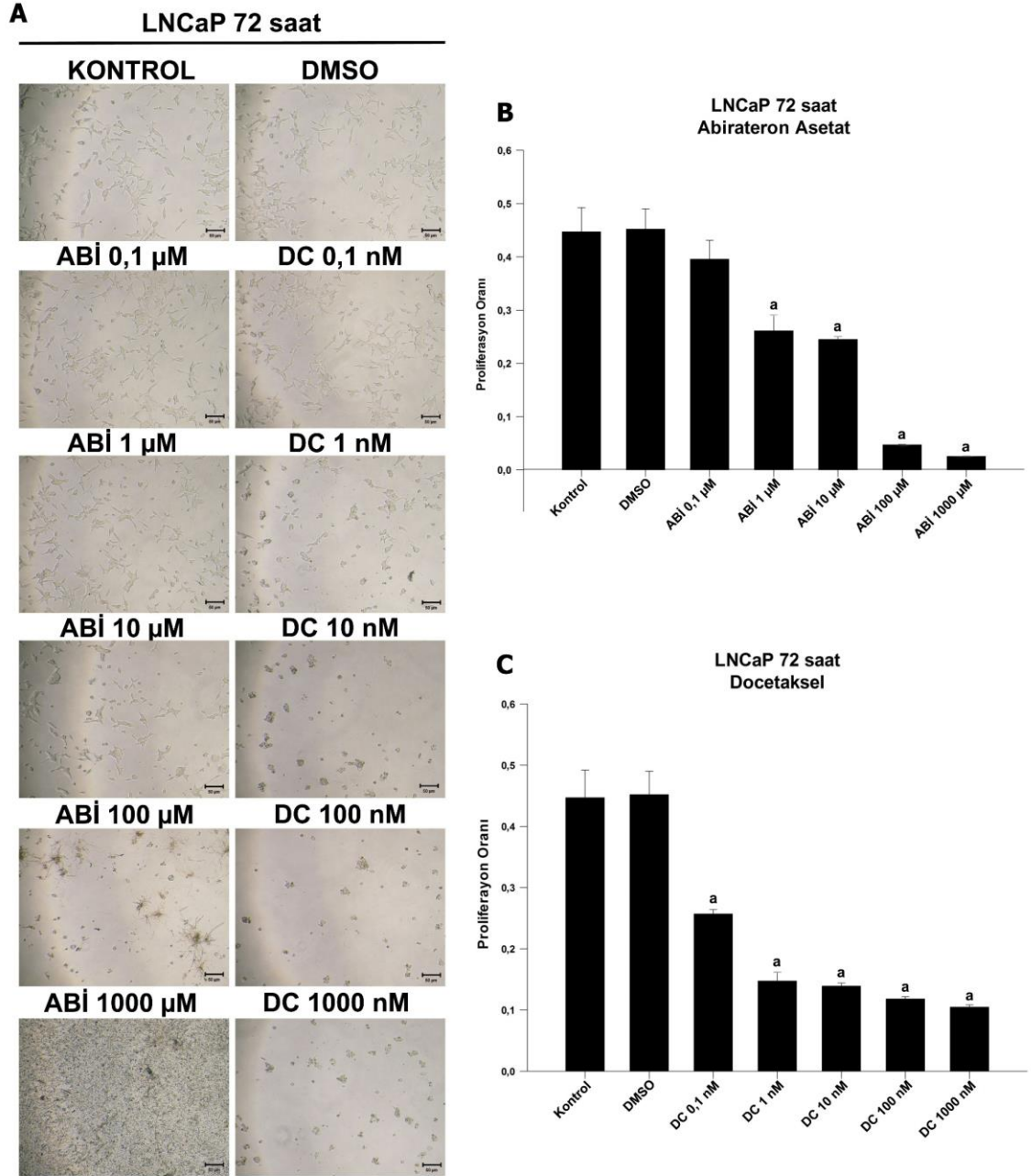


Şekil 4.6. PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi bulguları. **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozların uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin invert mikroskopu ile görünüşleri (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABI:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel'in farklı dozları ile 72 saat inkübasyonu sonrasında, abirateron asetatın 0,1 µM uygulandığı grup hariç, diğer 1 µM, 10 µM, 100 µM ve 1000 µM doz gruplarının proliferasyon oranının, DMSO grubuna

kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.7.A, Şekil 4.7.B). Dosetakselin 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM ve 1000 nM dozlarında uygulandığı grupların tümünde, DMSO grubuna kıyasla proliferasyon oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.7.A, Şekil 4.7.C).

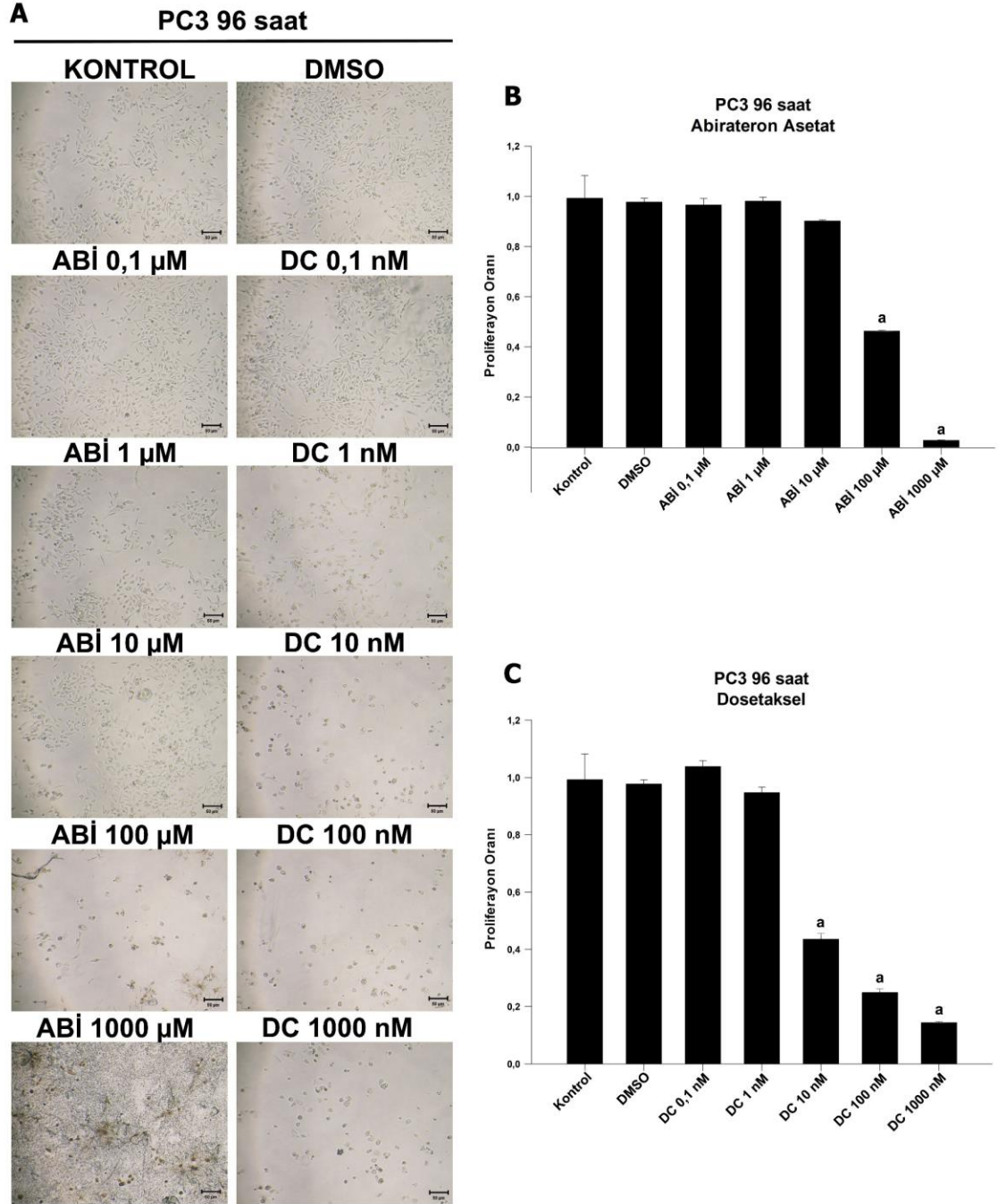




Şekil 4.7. LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi bulguları. **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozların uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin invert mikroskopu ile görünüşleri (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

4.1.4. Abirateron Asetat ve Doksetaksel'in Farklı Dozları ile 96 Saat İnkübasyon:

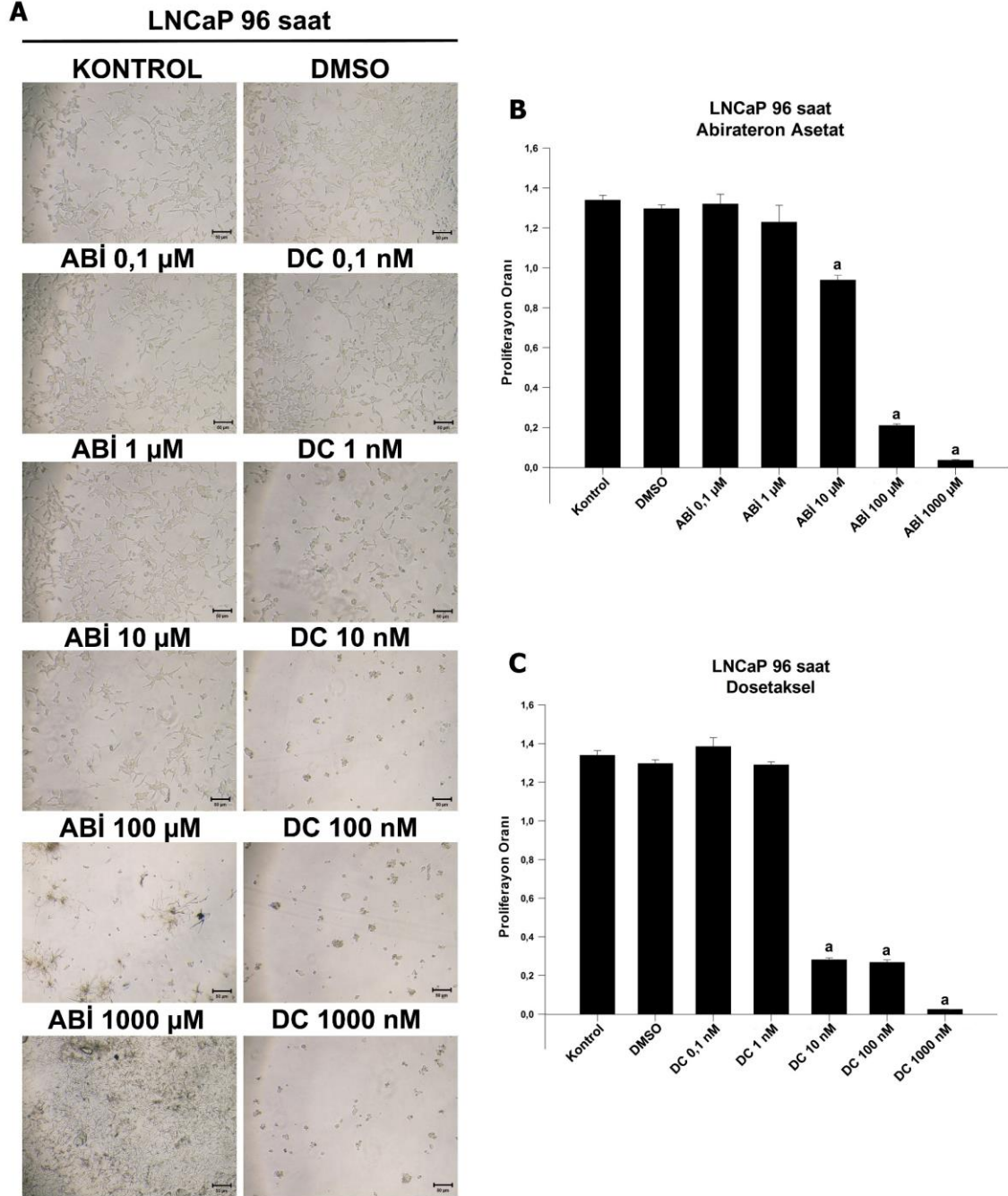
PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel'in farklı dozları ile 96 saat inkübasyonu sonrasında, 0,1 μM , 1 μM , 10 μM dozlarında abirateron asetat uygulanan gruplarda, proliferasyon oranlarında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken ($p>0,001$); 100 μM ve 1000 μM olarak uygulandığı grupların proliferasyon oranı DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,001$), (Şekil 4.8.A, Şekil 4.8.B). 0,1 nM ve 1 nM doz dosetaksel uygulanan gruplarda, proliferasyon oranında ise anlamlı bir değişiklik gözlenmezken ($p>0,001$), 10 nM, 100 nM ve 1000 nM dozlarda dosetaksel uygulanan grupların proliferasyon oranı, DMSO grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi, ($p<0,001$) (Şekil 4.8.A, Şekil 4.8.C).



Şekil 4.8. PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 96 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi bulguları. **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozların uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin invert mikroskopu ile görünüşleri (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **a;** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir($p < 0,001$).

LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetakselin farklı dozları ile 96 saat inkübasyonu sonrasında, abirateron asetatın 0,1 μM ve 1 μM dozlarında uygulandığı grupların proliferasyon oranında, DMSO grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmez iken, 10 μM , 100 μM ve 1000 μM doz gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalış gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.9.A, Şekil 4.9.B). Dosetakselin 10 nM, 100 nM, 1000 nM dozlarında uygulandığı gruplarda proliferasyon oranı DMSO grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.9.A, Şekil 4.9.C).

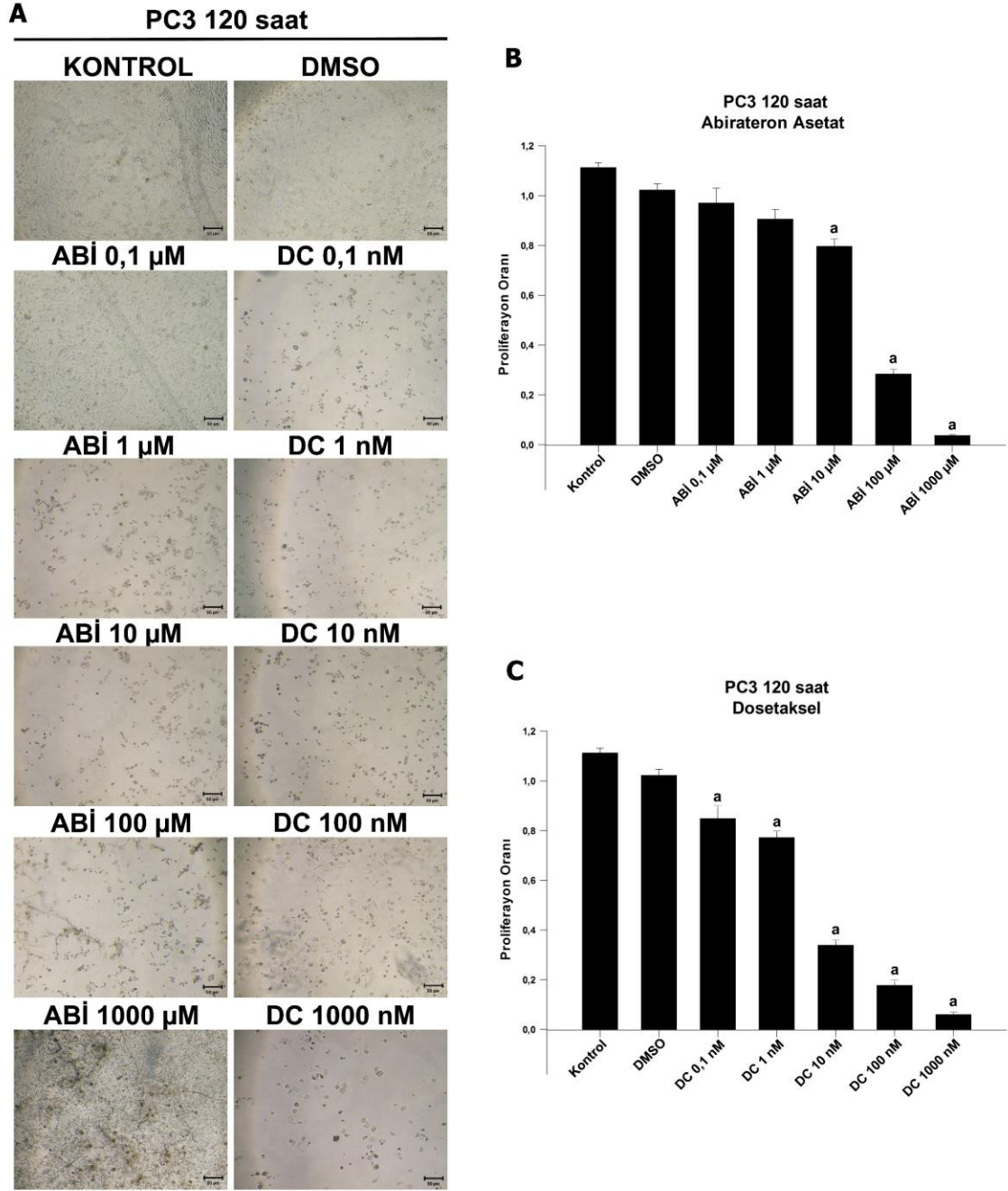




Şekil 4.9. LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 96 saat inkübasyonu sonrasında, MTT proliferasyon testi bulguları. **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozların uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin invert mikroskopu ile görünüşleri (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

4.1.5. Abirateron Asetat ve Dosetaksel'in Farklı Dozları ile 120 Saat İnkübasyon:

PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetakselin farklı dozları ile 120 saat inkübasyonu sonrasında, abirateron asetatın 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M uygulandığı doz grupları proliferasyon oranının DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.10.A, Şekil 4.10.B). Ancak abirateron asetatın 0,1 μ M ve 1 μ M uygulandığı grupların proliferasyon oranında ise anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,001$) (Şekil 4.10.A, Şekil 4.10.B). Dosetakselin 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM olarak uygulandığı bütün doz grupları proliferasyon oranlarının, DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tesbit edildi ($p < 0,001$) (Şekil 4.10.A, Şekil 4.10.C).

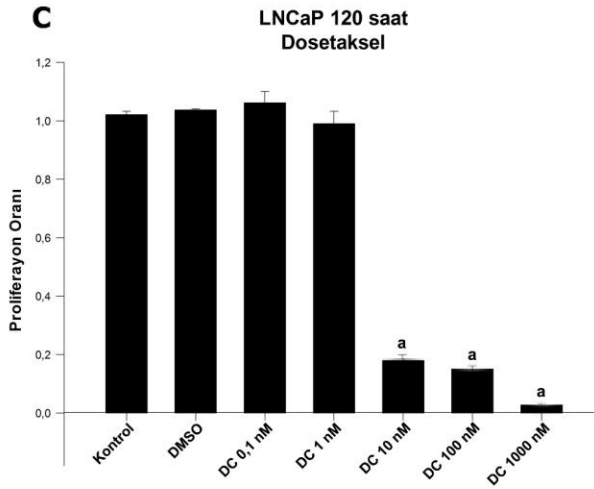
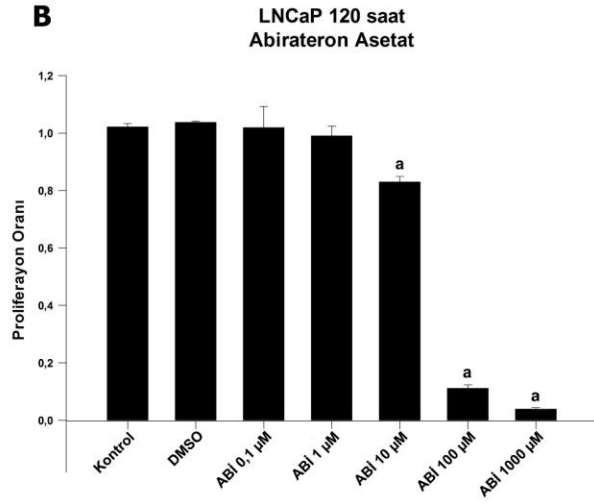
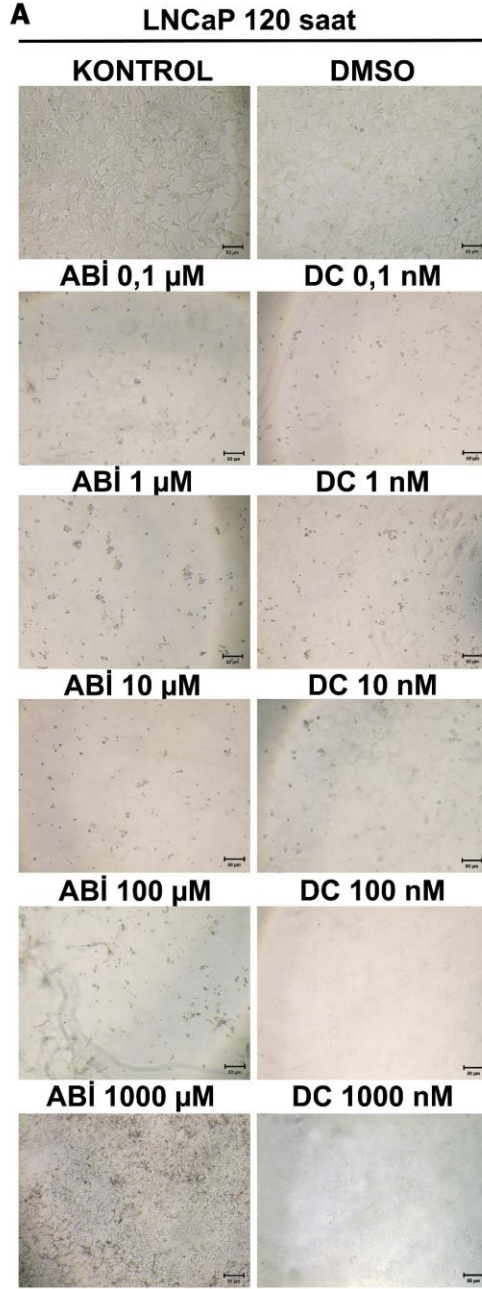


Şekil 4.10. PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 120 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi bulguları. **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozların uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin görünümü (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **a;** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 120 saat inkübasyonu sonrasında, abirateron asetatın 0,1 µM ve 1 µM gruplarının proliferasyon oranında DMSO grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmez iken ($p > 0,001$), 10 µM, 100 µM ve 1000 µM gruplarının

proliferasyon oranının ise anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.11.A, Şekil 4.11.B). Dosetakselin 10 nM, 100 nM ve 1000 nM olarak uygulandığı doz gruplarında, proliferasyon oranı DMSO grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalırken ($p < 0,001$), 0,1 nM ve 1 nM grupları proliferasyon oranında ise anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,001$), (Şekil 4.11.A, Şekil 4.11.C).





Şekil 4.11. LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 120 saat inkübasyonu sonrasında MTT proliferasyon testi sonuçları gözlenmektedir. **A)** Farklı ilaçlar ve farklı dozların uygulandığı plate kuyucuklarındaki hücrelerin invert mikroskopu görüntüleri (10x). **B)** Abirateron asetat uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik. **C)** Dosetaksel uygulanan hücrelerin proliferasyon oranını gösteren grafik, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **a;** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

4.2. MTT Proliferasyon Testi Bulgularına Göre, En Etkin Süre ve Dozun Belirlenmesi:

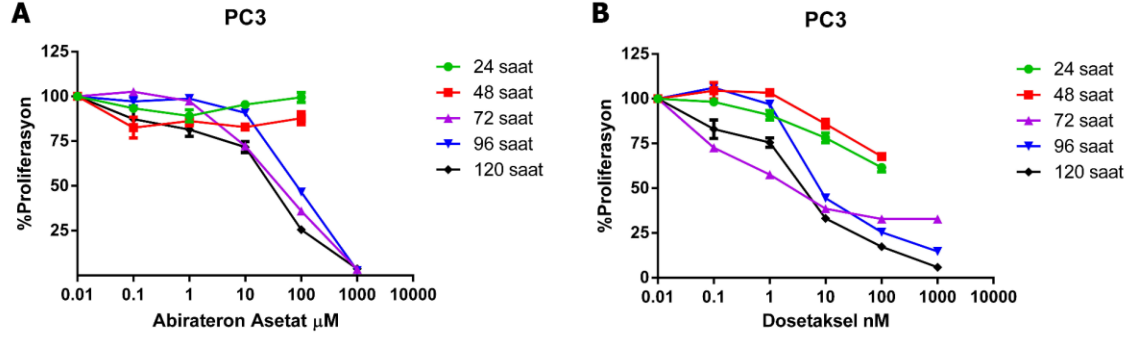
4.2.1. En Etkin Sürenin Belirlenmesi:

MTT Proliferasyon Testi bulgularına göre, en etkin süre ve dozun belirlenmesi işlemi, Hücrelere MTT proliferasyon testi uygulandıktan sonra, elde edilen bulguların GraphPad Software programı ile değerlendirilerek belirlendi.

Proliferasyon değişimleri araştırılırken hücre proliferasyonunu %50 oranında inhibe eden dozun, uygulanan ilacın IC50 değeri olarak ifade edildiğini dikkate alarak, hücrelerde %50 ve üzerinde proliferasyon inhibisyonu yapan saatler dikkate alındı. Saatlere göre hücrelerin proliferasyon değişimleri incelendiği zaman;

PC3 hücrelerinde, abirateron asetatın farklı dozları ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonrasında, DMSO grubuna göre proliferasyonu değiştirmedeği gözlemlendi (Şekil 4.12.A). Ancak 72 saatlik inkübasyon hücrelerin proliferasyonunu DMSO grubuna göre % 50 ve üzerinde inhibe ettiği gösterildi (Şekil 4.12.A). 96 ve 120 saat inkübasyon sonrasında, PC3 hücreleri proliferasyonunun, DMSO grubuna göre % 50 ve üzerinde inhibe ettiği gözlemlendi ve bu sonuçlar 72 saatlik inkübasyon sonuçları ile benzerlik göstermekteydi (Şekil 4.12.A).

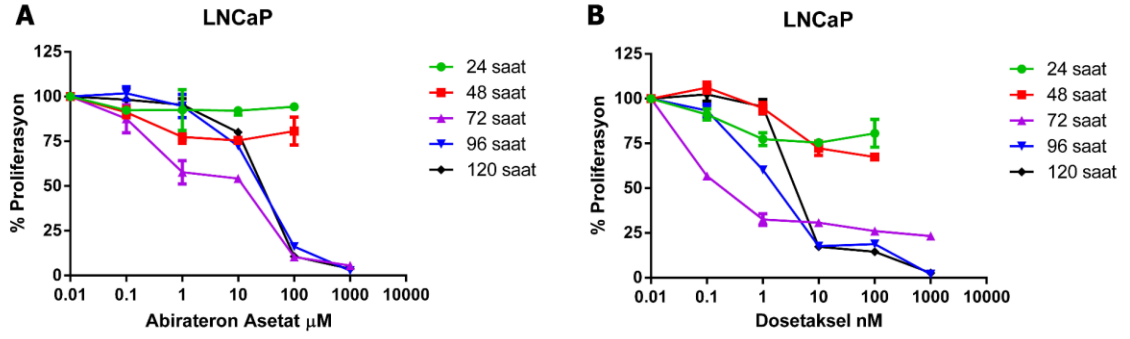
PC3 hücrelerine, dosetakselin farklı dozlarının 24 ve 48 saat uygulanması sonrasında, hücre proliferasyonu inhibisyonu %50'ye ulaşmadığı belirlendi (Şekil 4.12.B). 72, 96 ve 120 saatlik inkübasyonu PC3 hücrelerinin proliferasyonunu DMSO grubuna kıyasla doz artışına bağlı olarak doğrusal şekilde %50 üzerinde inhibe ettiği gözlemlendi (Şekil 4.12.B).



Şekil 4.12. PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 24, 48, 72, 96 ve 120 saat inkübasyonu sonrasındaki MTT proliferasyon testi bulgularının GraphPad Software programı ile değerlendirilmesi. Her iki şekilde de, 72. saat ve sonrasında hücre proliferasyonunun DMSO grubuna göre %50'sinin inhibe olduğu gözlenmektedir. **A)** Abirateron asetatın proliferasyon değişimini gösteren grafik, **B)** Dosetakselin proliferasyon değişimini gösteren grafik.

LNCaP hücrelerinde, abirateron asetatın 24 ve 48 saat inkübasyonu sonrasında, hücrelerin proliferasyonunun yeterince inhibe olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.13.A). 72, 96 ve 120 saat abirateron asetat inkübasyonu sonrasında, LNCaP hücrelerinin proliferasyonu DMSO grubuna kıyasla doz artışına bağlı doğrusal şekilde %50 üzerinde inhibe olduğu gösterildi (Şekil 4.13.A).

Dosetakselin farklı dozlarının LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması sonrasında hücre proliferasyonu inhibisyonunun %50'ye ulaşmadığı gözlemlendi (Şekil 4.13.B). LNCaP hücrelerinin dosetaksel ile 72, 96 ve 120 saat inkübasyonu sonrasında ise hücrelerin proliferasyonunun DMSO grubuna kıyasla %50 üzerinde inhibe olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.B).



Şekil 4.13. LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 24, 48, 72, 96 ve 120 saat inkübasyonu sonrasındaki MTT proliferasyon testi bulgularının GraphPad Software programı ile değerlendirilmesi. Her iki şekilde de, 72. saat ve sonrasında hücre proliferasyonunun DMSO grubuna göre %50'sinin inhibe olduğu gözlenmektedir. **A)** Abirateron asetatın proliferasyon değişimini gösteren grafik, **B)** Dosetakselin proliferasyon değişimini gösteren grafik.

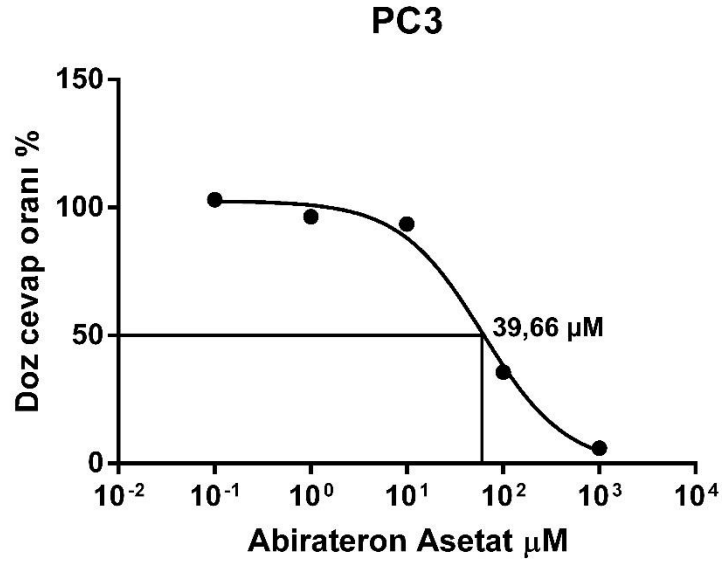
Yukarıda verilen MTT proliferasyon testi sonuçlarının GraphPad Software programı ile analizine göre, hücrelere uygulanan her iki ilacın da (Abirateron asetat ve Dosetaksel) 72, 96 ve 120 saat inkübasyon sonrasında, hücre proliferasyonunun DMSO grubuna kıyasla %50 üzerinde inhibe olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlara göre, proliferasyon inhibisyonu 72. saatte başlamakta ve 96 ve 120. saatlerde de devam etmektedir. Bu sonuçlardan, her iki ilaç için de proliferasyon inhibisyonu için, en etkili sürenin 72 saatlik inkübasyon olduğu kanısına varılmıştır.

4.2.2. En Etkin Dozun Belirlenmesi:

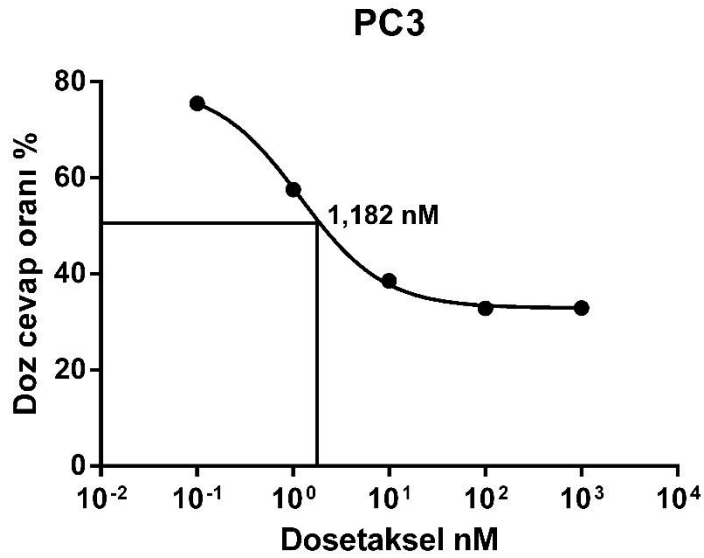
Bizim elde ettiğimiz MTT proliferasyon testi bulgularının GraphPad Software programı ile değerlendirilmesi sonucuna göre;

PC3 ve LNCaP hücrelerinin abirateron asetat veya dosetaksel ile inkübasyonu sürecinde, her iki ilacın da IC50 değerlerinin 72. saatte ortaya çıktığı gözlemlendi.

PC3 hücreleri için, Abirateron asetatın IC50 değerinin 39,66 μM (Şekil 4.14) ve dosetaksel'in IC50 değerinin ise 1,182 nM olduğu hesaplandı (Şekil 4.15).

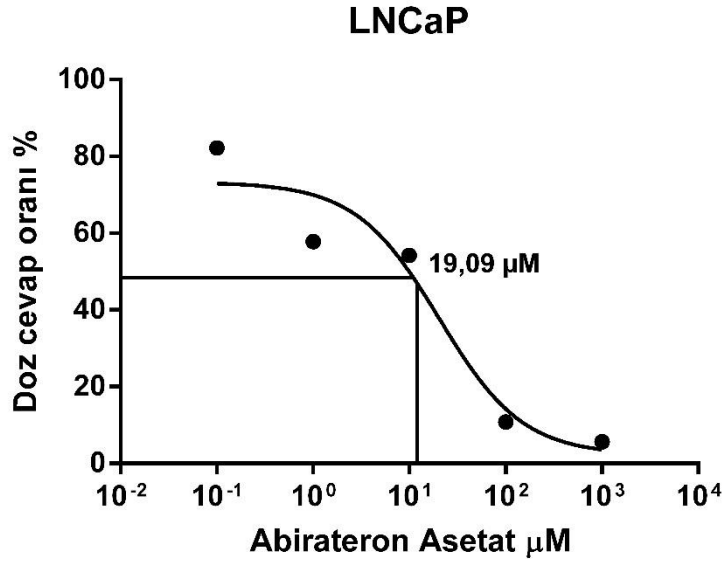


Şekil 4.14. PC3 hücrelerinde, MTT proliferasyon testi sonucuna göre abirateron asetatın 72'lik saat inkübasyonu sonrasında IC50 değerinin 39,66 µM olduğu görülmektedir.

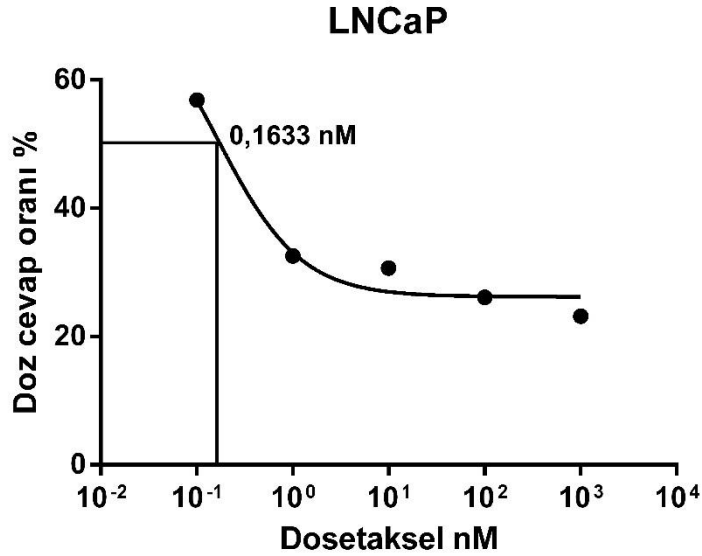


Şekil 4.15. PC3 hücrelerinde MTT proliferasyon testi sonucuna göre; doseetakselin IC50 değerinin 1,182 nM olduğu gözlenmektedir.

LNCaP hücreleri için, abirateron asetatın IC50 değerinin 19,09 µM (Şekil 4.16). doseetakselin IC50 değerinin ise 0,1633 nM olduğu hesaplandı(Şekil 4.17).



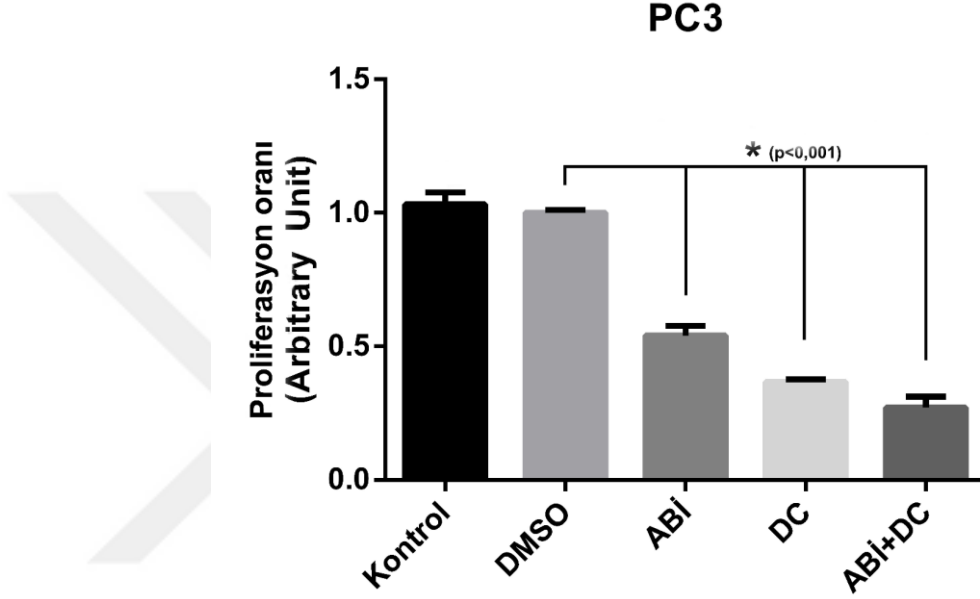
Şekil 4.16. LNCaP hücrelerinde MTT proliferasyon testi sonucuna göre, abirateron asetatın IC₅₀ değerinin 19,09 µM olduğu görülmektedir.



Şekil 4.17. LNCaP hücrelerinde MTT proliferasyon testi sonucuna göre, doseetakselin IC₅₀ değerinin 0,1633 nM olduğu gözlenmektedir.

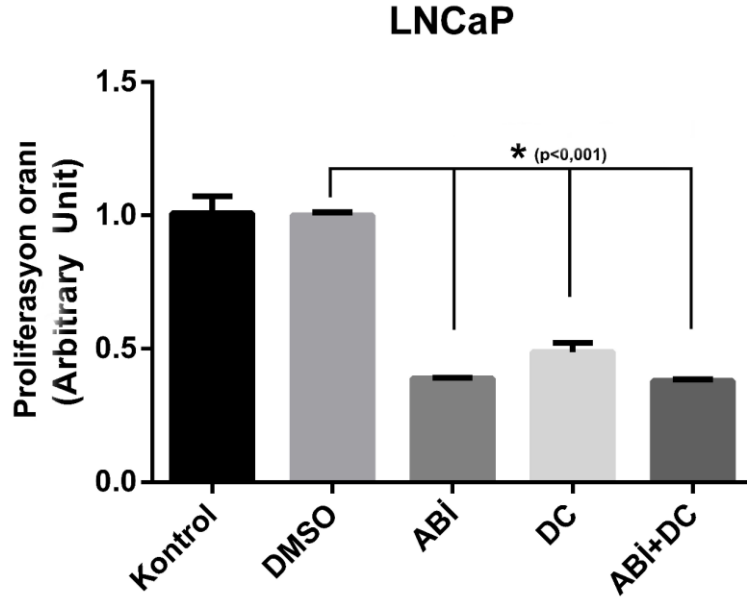
Bulunan IC₅₀ değerlerinin etkinliğini değerlendirmek için, PC3 ve LNCaP hücreleri, 96 kuyucuklu plate'lere tekrar ekilerek, bu çalışmada kullanılan ilaçların hesaplanan IC₅₀ değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları ile hücreler 72 saat inkübe edildi ve MTT proliferasyon testi uygulandı. Bu testin bulgularına göre;

PC3 hücrelerinde, abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel IC50 değerlerine karşılık gelen dozlarının, gerçekten de bu hücreler üzerinde etkili olduğu ve hücrelerin proliferasyonunu DMSO (Çözgen) grubuna göre %50 ve üzerinde inhibe ettiği gösterildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. PC3 hücrelerinde, uygulanan ilaçların belirlenen IC50 değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları ile 72 saat inkübasyonu sonrasında, hücrelerin proliferasyonlarının, DMSO (Çözgen) grubuna göre %50 ve üzerinde inhibe olduğu görülmektedir. **DMSO**: dimetil sülfoksit, **ABI**: abirateron asetat, **DC**: dosetaksel, **ABI+DC**: abirateron asetat+dosetaksel.

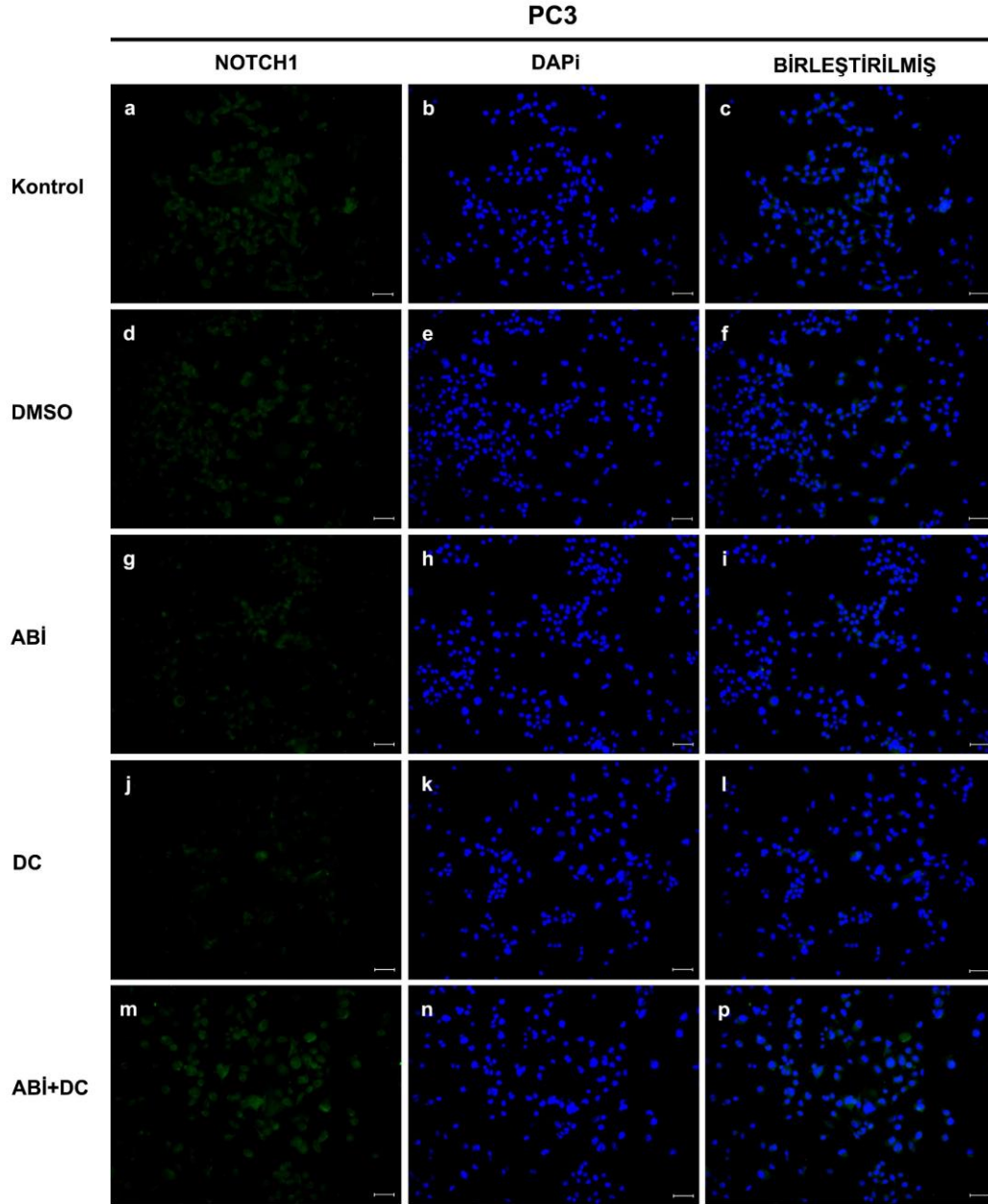
PC3 hücrelerine benzer şekilde, LNCaP hücrelerinde de, DMSO'ya göre abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetakselin IC50 değerlerine karşılık gelen dozlarının, hücrelerin proliferasyonunu, DMSO (Çözgen) grubuna göre, %50 ve üzerinde inhibe ettiği gösterildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. LNCaP hücrelerinde, kullanılan ilaçların belirlenen IC50 değerlerine karşılık gelen dozları ile 72 saat inkübasyonu sonrasında, hücrelerin proliferasyonunu, DMSO (Çözgen) grubuna göre, %50 ve üzerinde inhibe ettiği görülmektedir. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABI:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABI+DC:** abirateron asetat+dosetaksel.

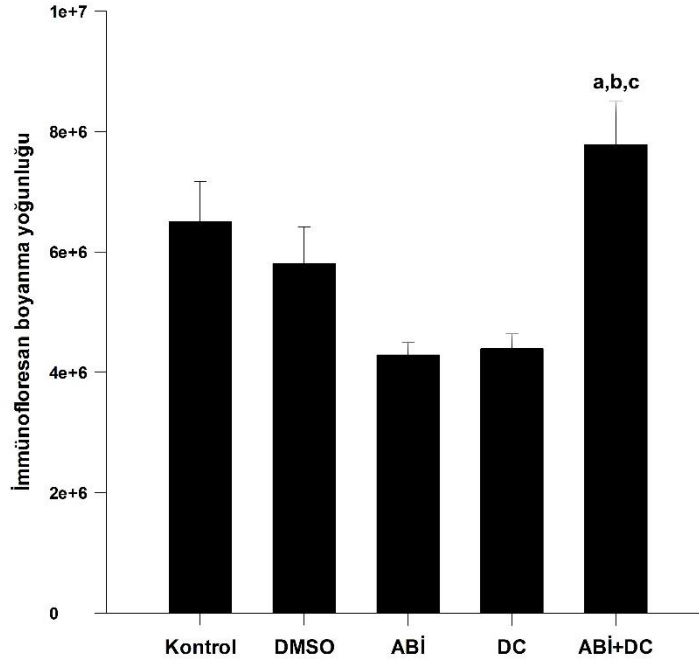
4.3. İmmünofloresan Analizi Bulguları

PC3 hücrelerinde, NOTCH1 ekspresyonunun abirateron asetat ve dosetaksel uygulanan gruplarda, DMSO grubu ile benzerlik gösterdiği ve anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlendi ($p>0,001$) (Şekil 4.20, Şekil 4.21). Abirateron asetat+dosetaksel grubunda, DMSO, abirateron asetat ve dosetaksel gruplarına kıyasla, NOTCH1 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.20, Şekil 4.21).



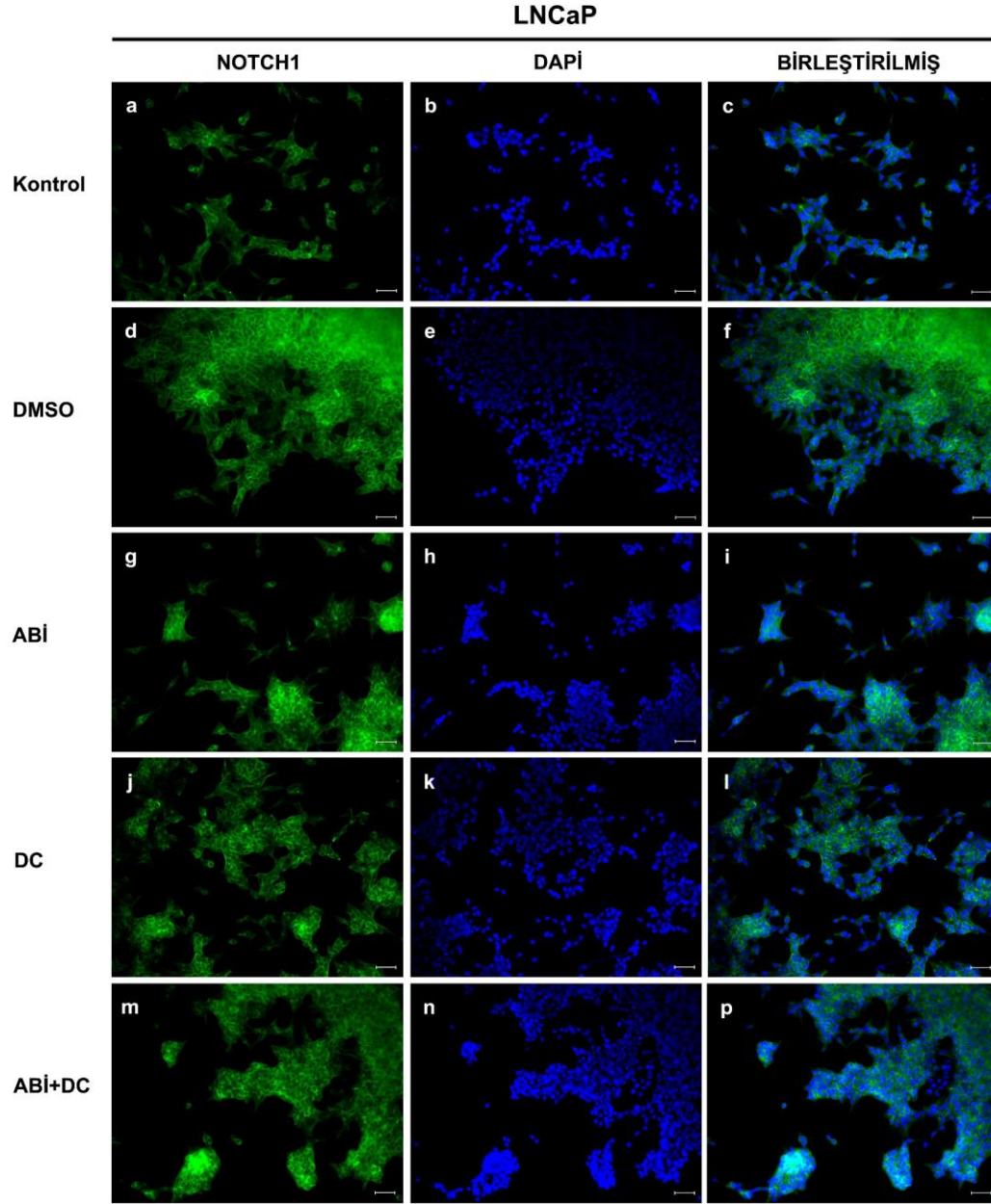
Şekil 4.20. PC3 hücrelerinde NOTCH1 immünofloresan boyanması. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel (20X).

PC3 / NOTCH1



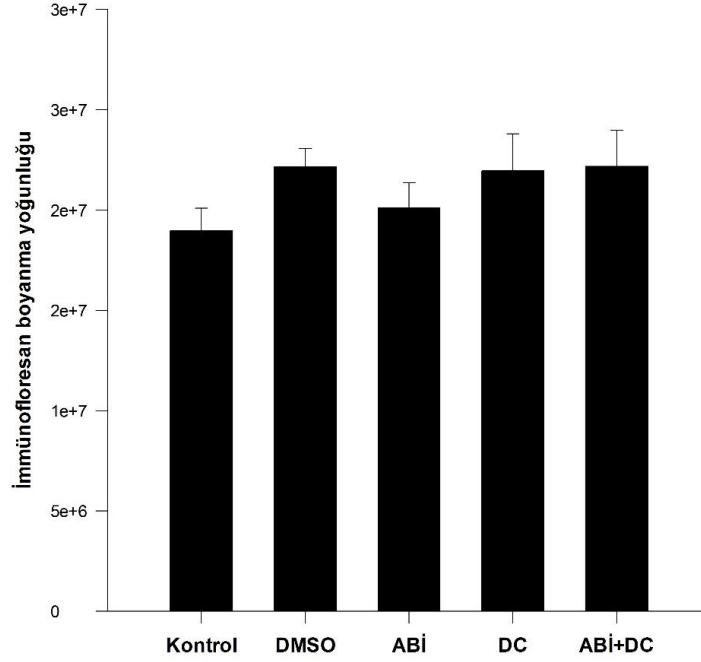
Şekil 4.21. PC3 hücrelerinde, NOTCH1 proteininin immunofloresan analizi bulguları. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel. Şekilde, **a:** DMSO, **b:** abirateron asetat ve **c:** dosetaksel grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0,001$).

Abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında, LNCaP hücreleri NOTCH1 proteini ekspresyonunun, DMSO ve kontrol grupları ile benzerlik gösterdiği belirlendi ($p>0,001$) (Şekil 4.22, Şekil 4.23).



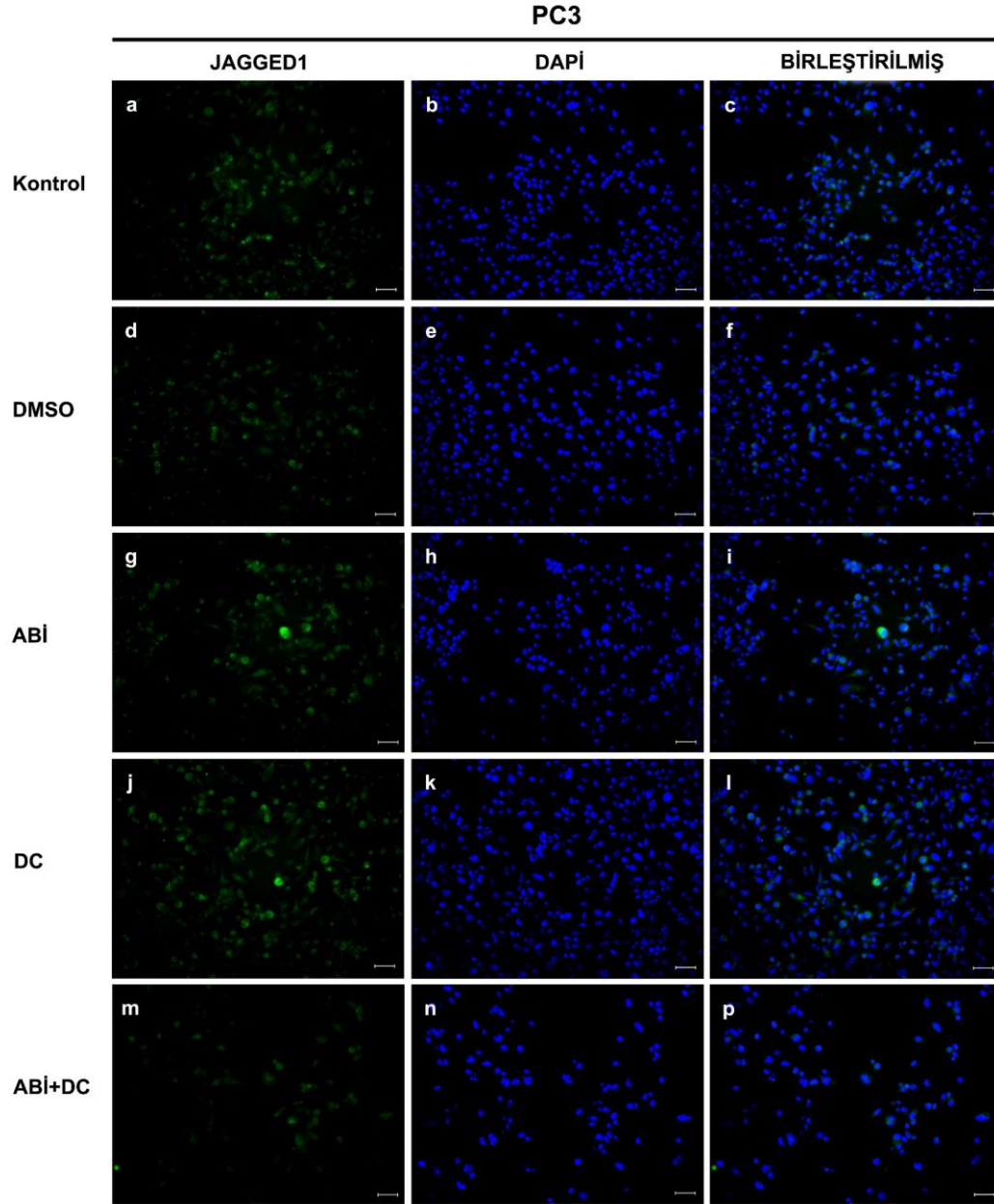
Şekil 4.22. LNCaP hücrelerinde NOTCH1 immüno Floresan boyanması. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel (20X).

LNCaP / NOTCH1



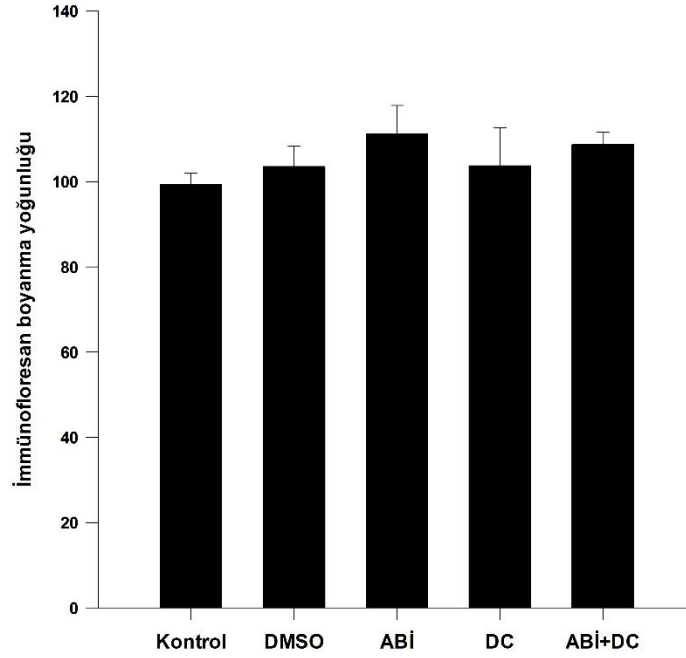
Şekil 4.23. LNCaP hücrelerinde, NOTCH1 proteininin immünofloresan analizi bulguları. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel.

PC3 hücrelerinde, abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında, JAGGED1 proteini ekspresyonu, DMSO grubu ile benzerlik gösterdiği ve istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlendi ($p>0,001$) (Şekil 4.24, Şekil 4.25).



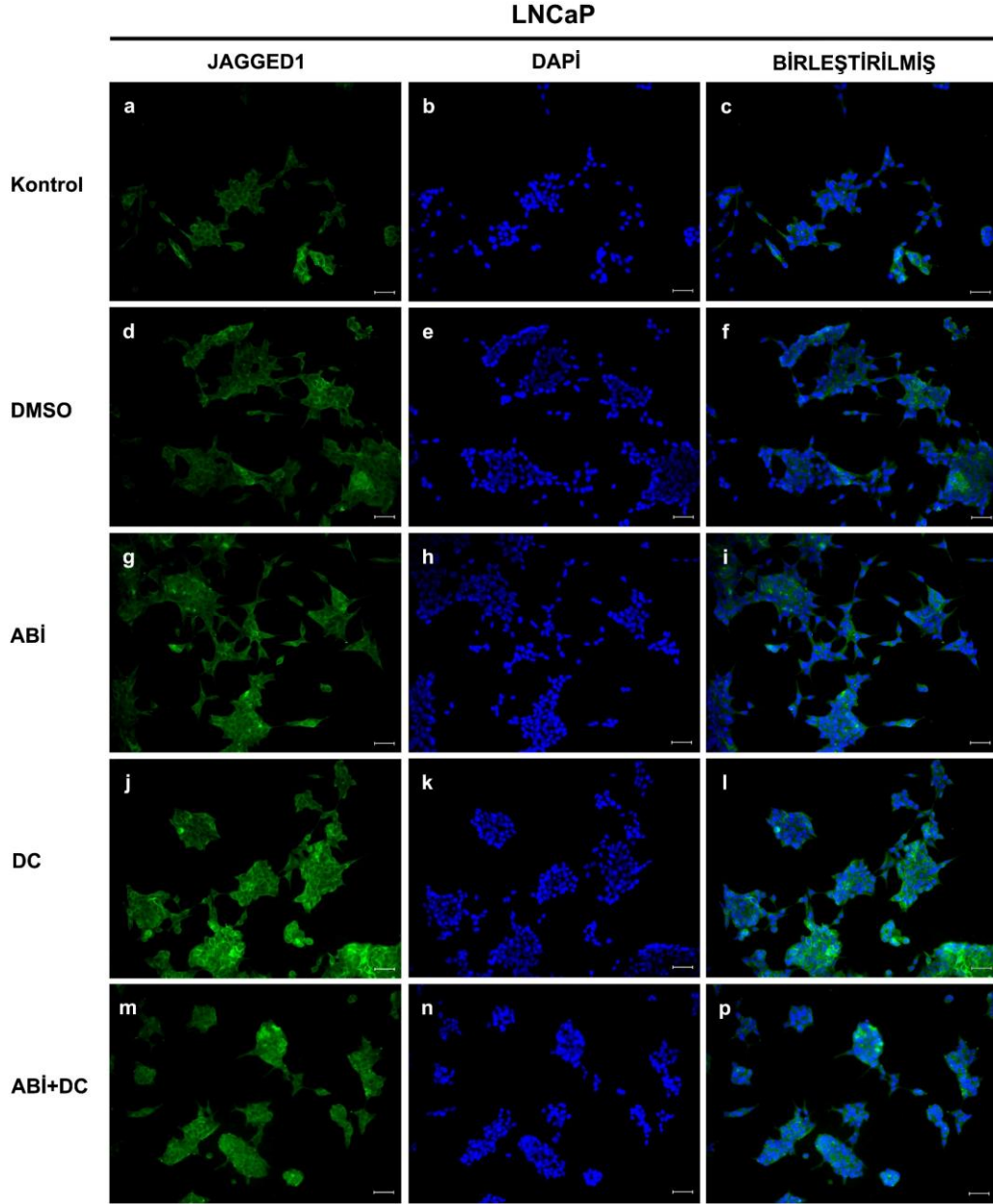
Şekil 4.24. PC3 hücrelerinde JAGGED1 immünofloresan boyanması. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel grubu. (20X).

PC3 / JAGGED1



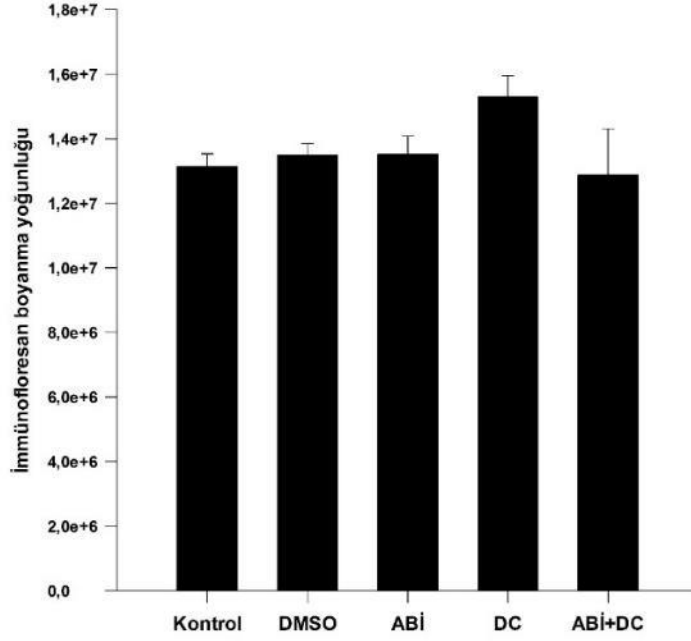
Şekil 4.25. PC3 hücrelerinde, JAGGED1 proteininin immüno Floresan analizi bulguları. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel grubu.

LNCaP hücrelerinde de, PC3 hücrelerinde olduğu gibi gruplar arasında JAGGED1 proteini ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p>0,001$) (Şekil 4.26, Şekil 4.27).



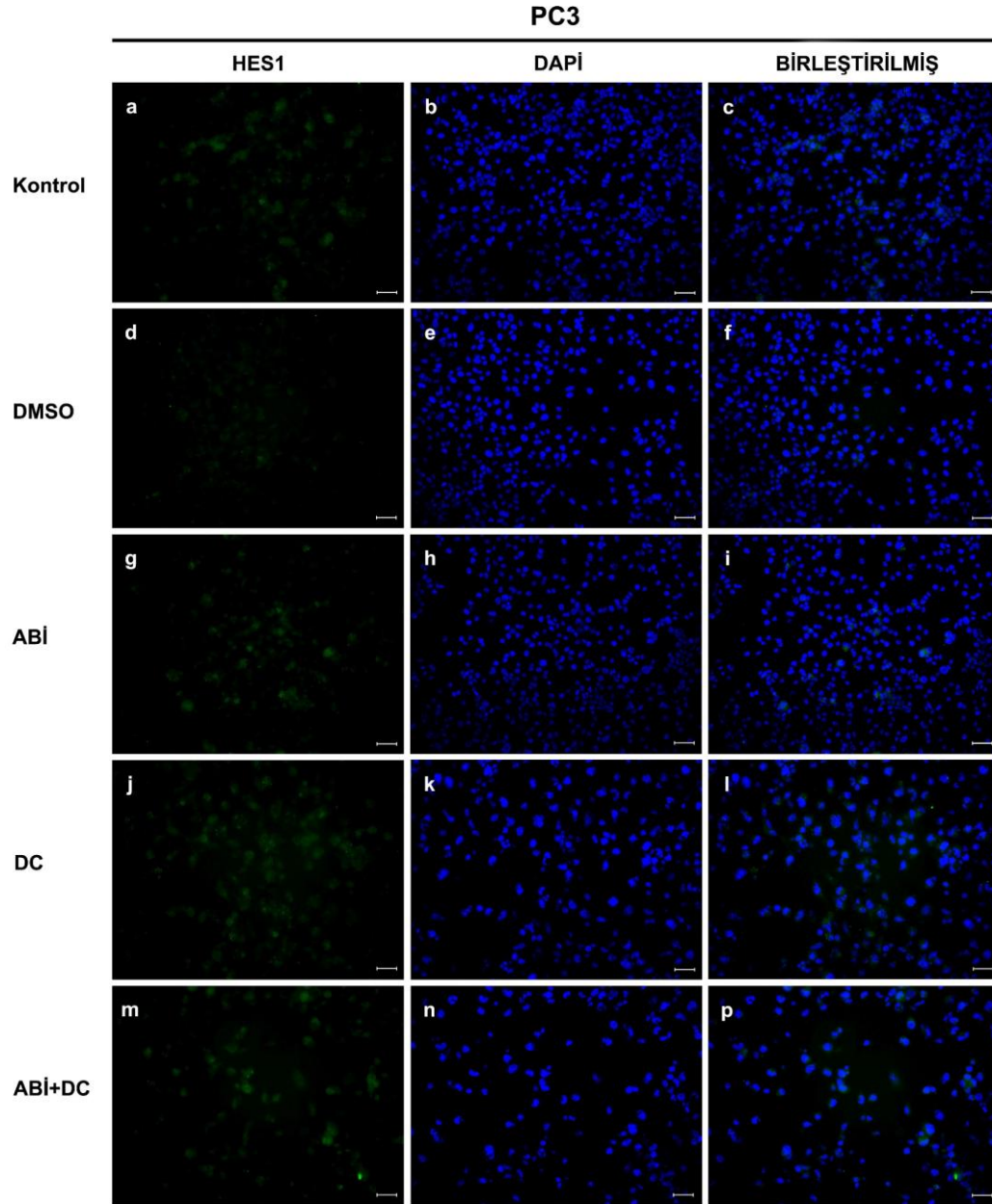
Şekil 4.26. LNCaP hücrelerinde, JAGGED1 immüno Floresan boyanması. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel grubu. (20X).

LNCaP / JAGGED1



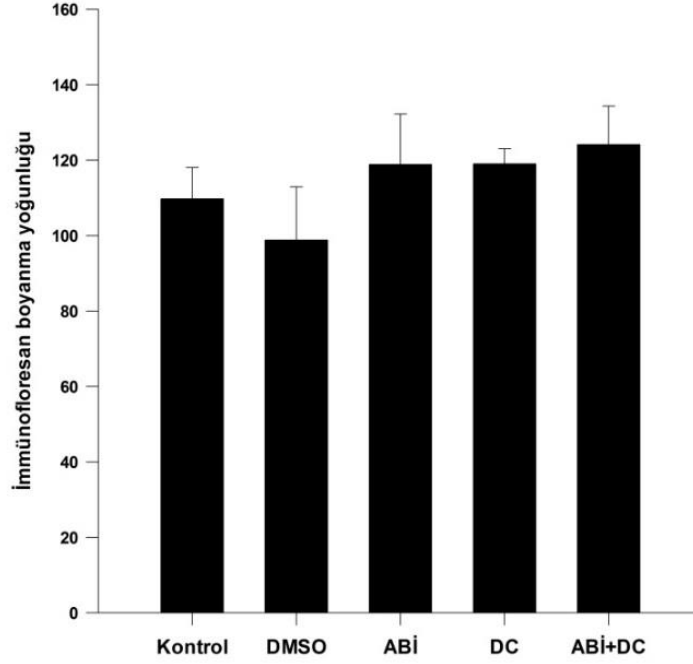
Şekil 4.27. LNCaP hücrelerinde, JAGGED1 proteininin immünofloresan analizi bulguları. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel.

PC3 hücrelerinde, abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında, DMSO grubuna göre, HES1 ekspresyonunun arttığı belirlendi, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,001$) (Şekil 4.28, Şekil 4.29).



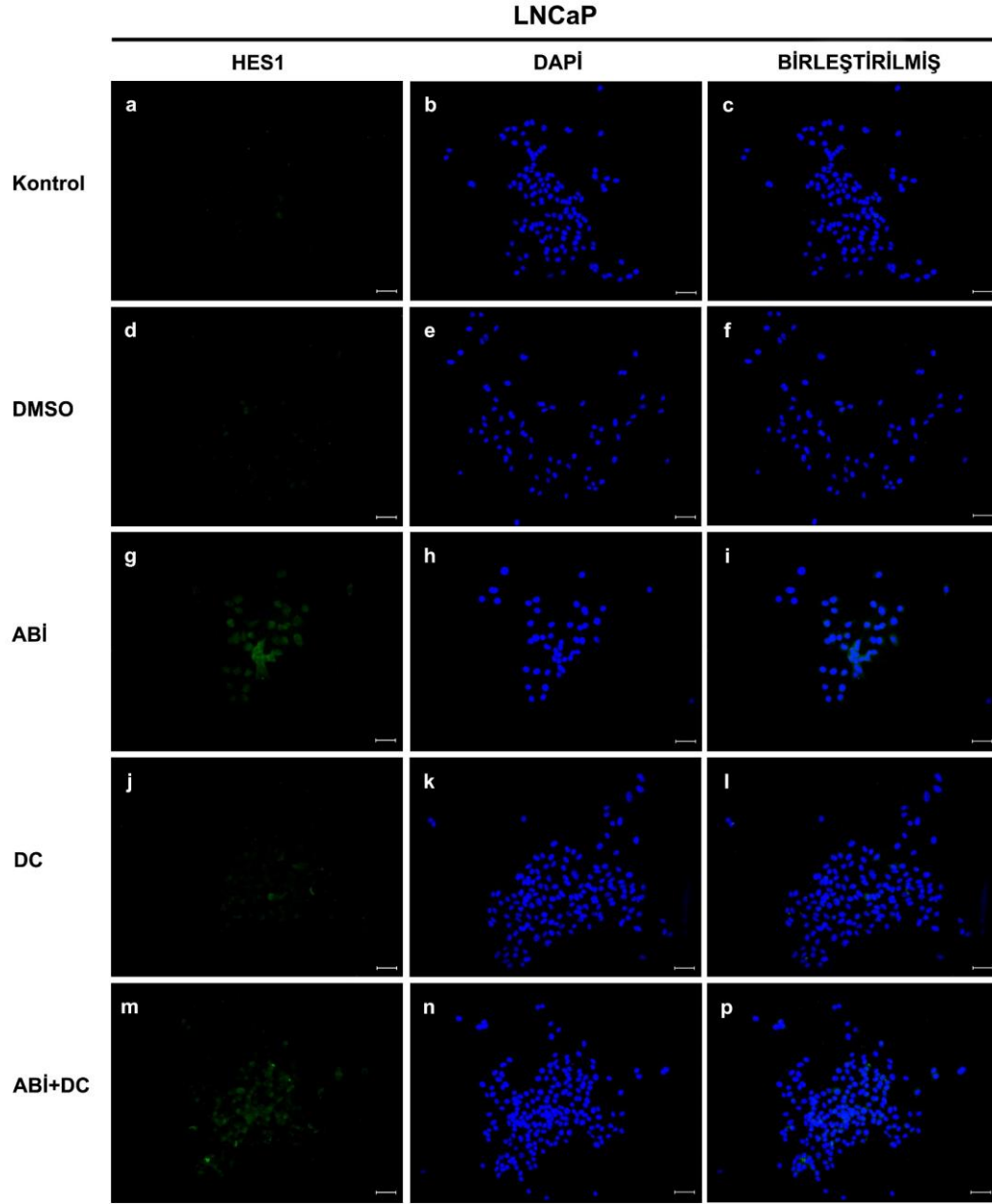
Şekil 4.28. PC3 hücrelerinde HES1 immüno Floresan boyanması. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel grubu. (20X).

PC3 / HES1



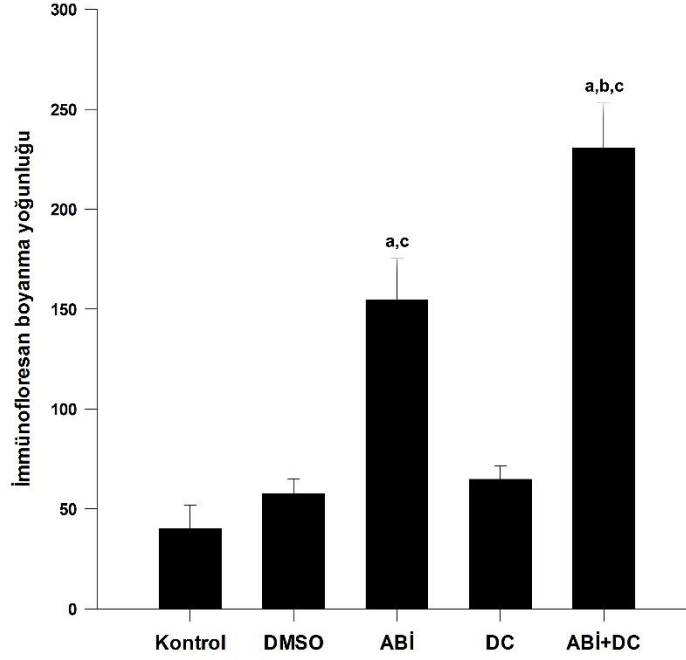
Şekil 4.29. PC3 hücrelerinde, HES1 immüno Floresan analizi bulguları. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel.

LNCaP hücrelerinde, abirateron asetat grubunda, DMSO ve dosetaksel gruplarına kıyasla, HES1 proteini ekspresyonunun, istatistiksel olarak anlamlı oranda artış gösterdiği belirlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.30, Şekil 4.31.). Dosetaksel grubunda, DMSO gruplarına göre HES1 ekspresyonu yönünden anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,001$) (Şekil 4.30, Şekil 4.31). Abirateron asetat+dosetaksel grubunda ise çalışılan tüm diğer gruplara göre, HES1 proteini ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.30, Şekil 4.31).



Şekil 4.30. LNCaP hücrelerinde HES1 immüno Floresan boyanması. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel grubu. (20X).

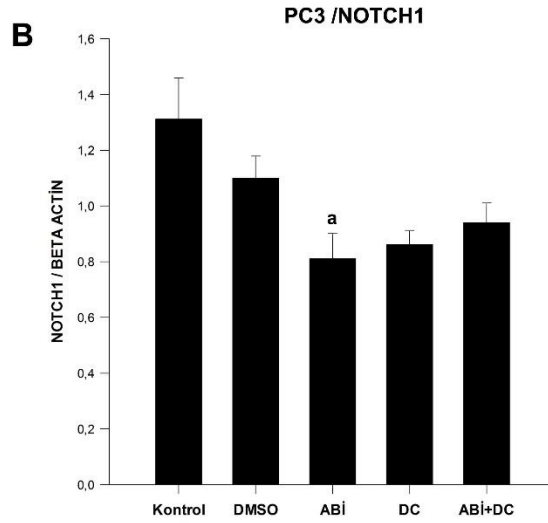
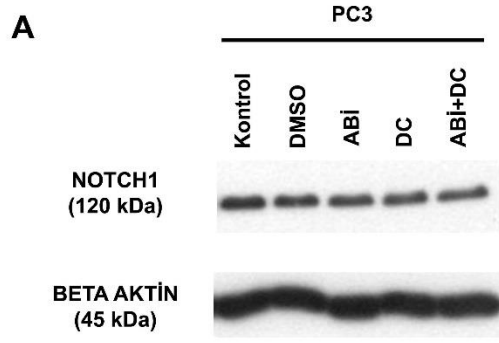
LNCaP / HES1



Şekil 4.31. LNCaP hücrelerinde HES1 immunofloresan analizi bulguları. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel. Şekilde, **a:** DMSO'ya, **b:** abirateron asetata ve **c:** dosetaksele göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

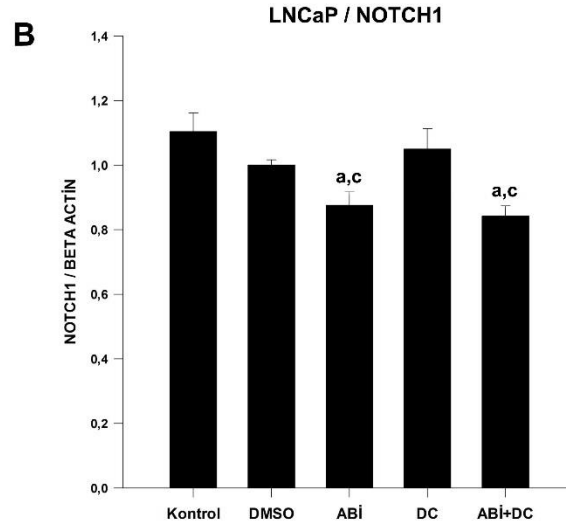
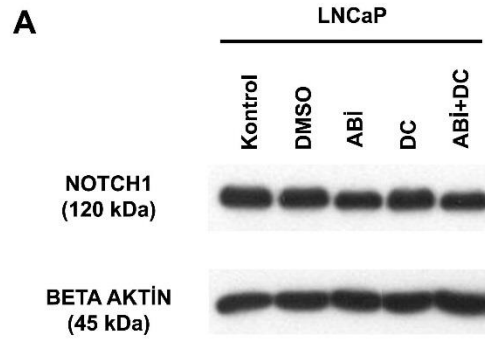
4.4. Western Blot Bulguları

PC3 hücrelerinde NOTCH1 proteini ekspresyon seviyesi değerlendirildiğinde, sadece abirateron asetat uygulanan grupta DMSO'ya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalış gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.32).



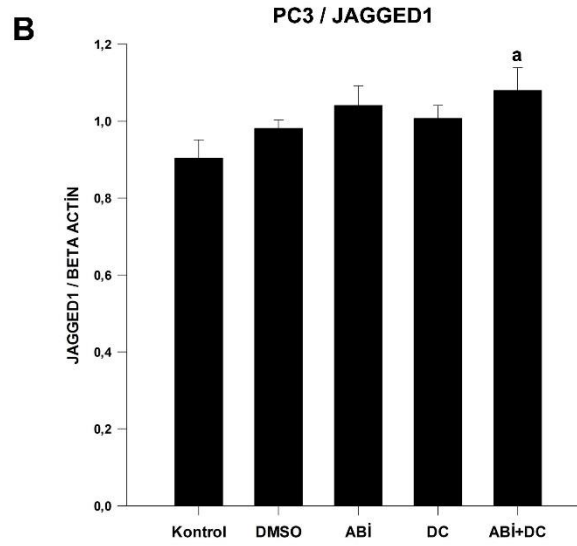
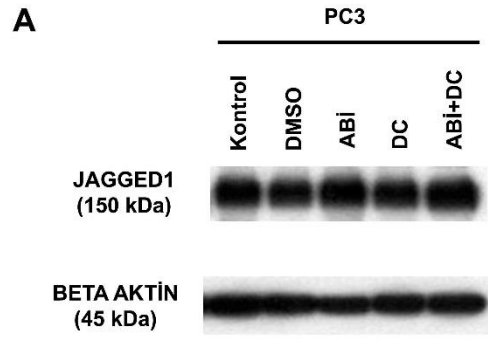
Şekil 4.32. PC3 hücrelerinde NOTCH1 proteini Western Blot sonuçları. **A)** NOTCH1 proteini Western Blot bantları, **B)** NOTCH1 proteini seviyesinin Western Blot analizi bulguları, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel. Şekilde, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

LNCaP hücrelerinde, NOTCH1 proteini ekspresyon seviyesi, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında, DMSO ve dosetaksel gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.33.). Dosetaksel uygulanan grupta ise DMSO grubuna göre NOTCH1 ekspresyon seviyesinde herhangi bir farklılık gözlemlenmedi ($p > 0,001$) (Şekil 4.33).



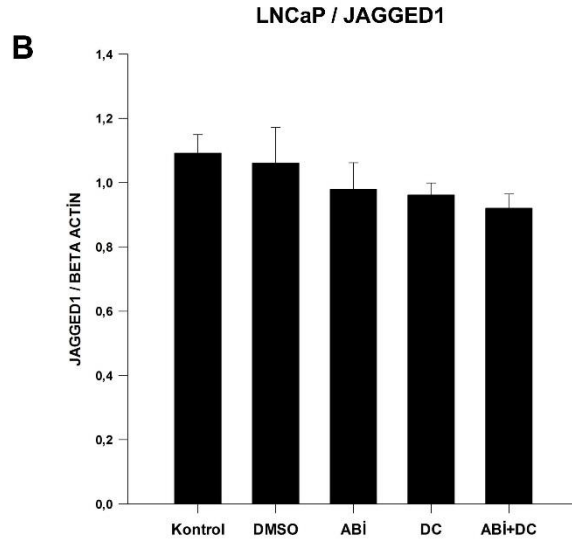
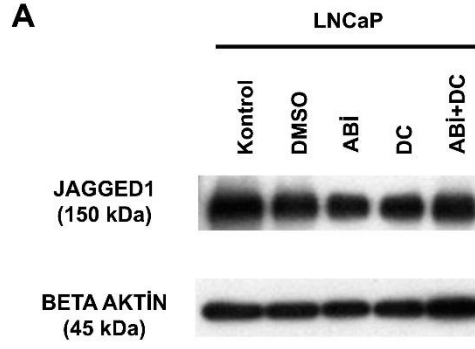
Şekil 4.33. LNCaP hücrelerinde NOTCH1 proteini Western Blot sonuçları. **A)** NOTCH1 proteini Western Blot bantları, **B)** NOTCH1 protein seviyesinin Western Blot analizi bulguları, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel. Şekilde, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı, **c:** dosetaksele göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 72 saat inkübasyonu sonrasında JAGGED1 proteini seviyesinin, abirateron asetat+dosetaksel grubunda, DMSO'ya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.34).



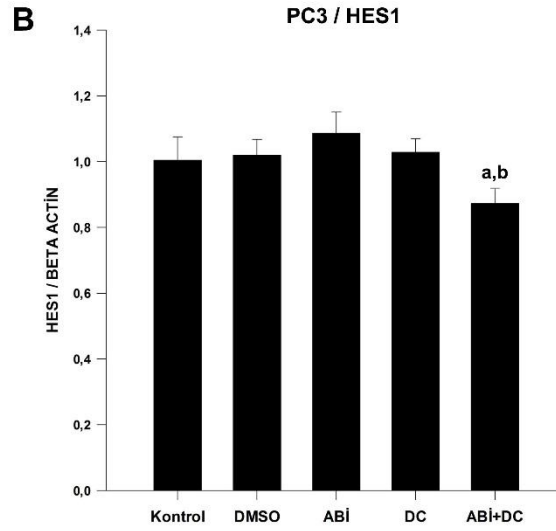
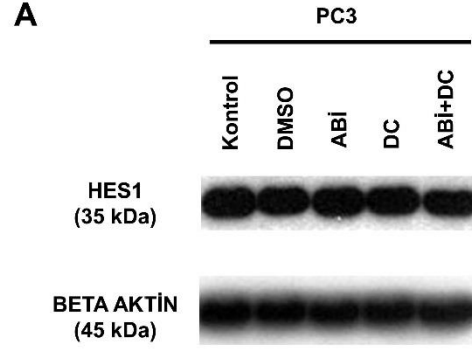
Şekil 4.34. PC3 hücrelerinde JAGGED1 proteini Western Blot sonuçları. **A)** JAGGED1 proteini Western Blot bantları, **B)** JAGGED1 protein seviyesinin Western Blot analizi bulguları. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel. Şekilde, **a;** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

LNCaP hücrelerinde abirateron asetat ve dosetaksel ile 72 saat inkübasyonu sonrasında JAGGED1 proteini seviyesi ise abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında DMSO grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,001$) (Şekil 4.35).



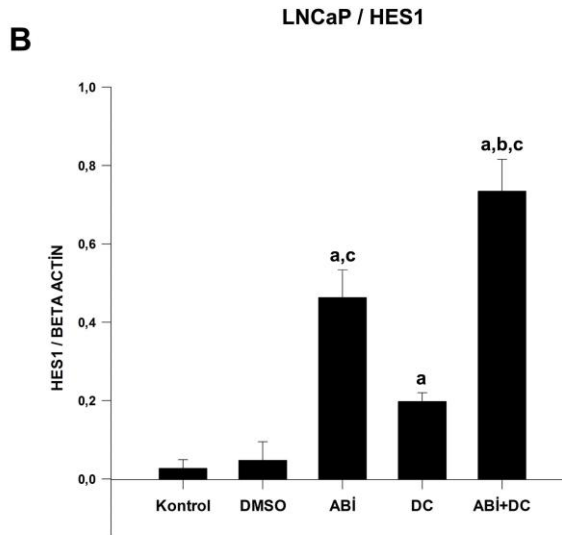
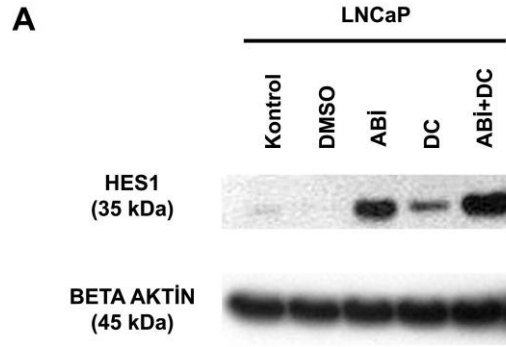
Şekil 4.35. LNCaP hücrelerinde JAGGED1 proteini Western Blot sonuçları. **A)** JAGGED1 proteini Western Blot bantları, **B)** JAGGED1 protein seviyesinin Western Blot analizi bulguları. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABI:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABI+DC:** abirateron asetat+dosetaksel.

PC3 hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 72 saat inkübasyonu sonrasında HES1 proteini seviyesi, abirateron asetat+dosetaksel uygulanmış grupta, DMSO ve abirateron asetat gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.36.). Ancak abirateron asetat ve dosetaksel grupları JAGGED1 protein seviyesinde, DMSO'ya kıyasla anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,001$) (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. PC3 hücrelerinde HES1 proteini Western Blot sonuçları. **A)** HES1 proteini Western Blot bantları, **B)** HES1 protein seviyesinin Western Blot analizi bulguları. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel. Şekilde, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı, **b:** abirateron asetata göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

LNCaP hücrelerinin abirateron asetat ve dosetaksel ile 72 saat inkübasyonu sonrasında HES1 proteini seviyesi, abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında, DMSO (Çözgen) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.37). Ayrıca abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel grupları JAGGED1 proteini seviyesinin dosetaksel grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. LNCaP hücrelerinde HES1 proteini Western Blot sonuçları. **A)** HES1 proteini Western Blot bantları, **B)** HES1 protein seviyesinin Western Blot analizi bulguları **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABI:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABI+DC:** abirateron asetat+dosetaksel. Şekilde, **a:** DMSO'ya göre istatistiksel anlamlılığı, **c:** dosetaksele göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

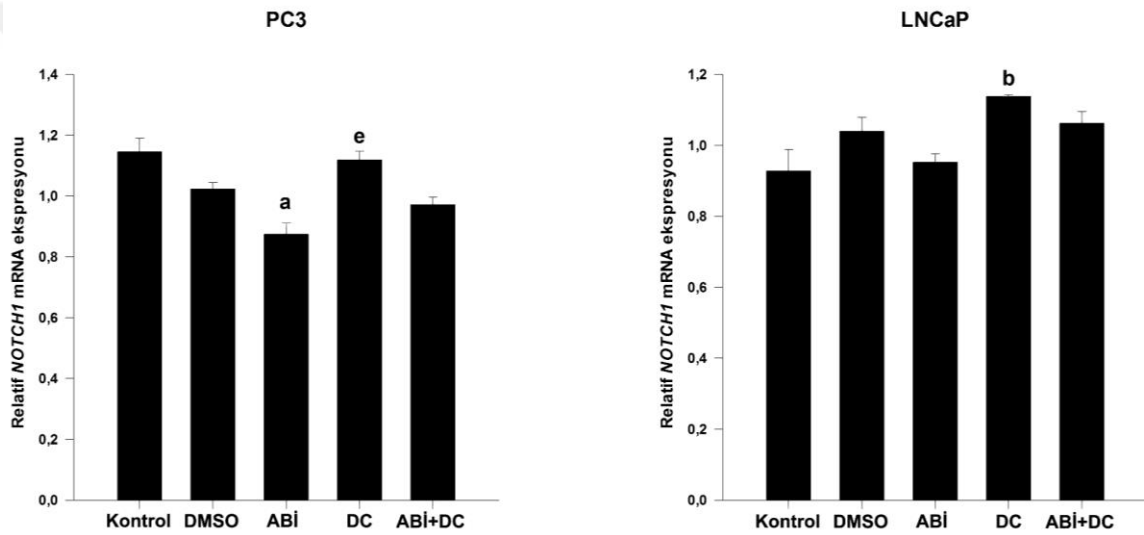
4.5. Kantitatif Real Time PCR Bulguları

PC3 ve LNCaP hücrelerinin abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel ile 72 saat inkübasyonu sonrasında *NOTCH1*, *JAGGED1* ve *HES1* genlerinin mRNA ekspresyon değişimi kantitatif real time PCR ile incelendi.

PC3 hücrelerinin ilaçlarla 72 saat inkübasyonu sonrasında, *NOTCH1* geni ekspresyonu abirateron asetatın uygulandığı grupta, DMSO grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p < 0,001$) (Şekil 4.38.A). Dosetaksel grubunda ise, DMSO grubuna göre

anamlı bir fark gözlenmez iken, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarına kıyasla anlamlı derecede bir artış belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.38.A).

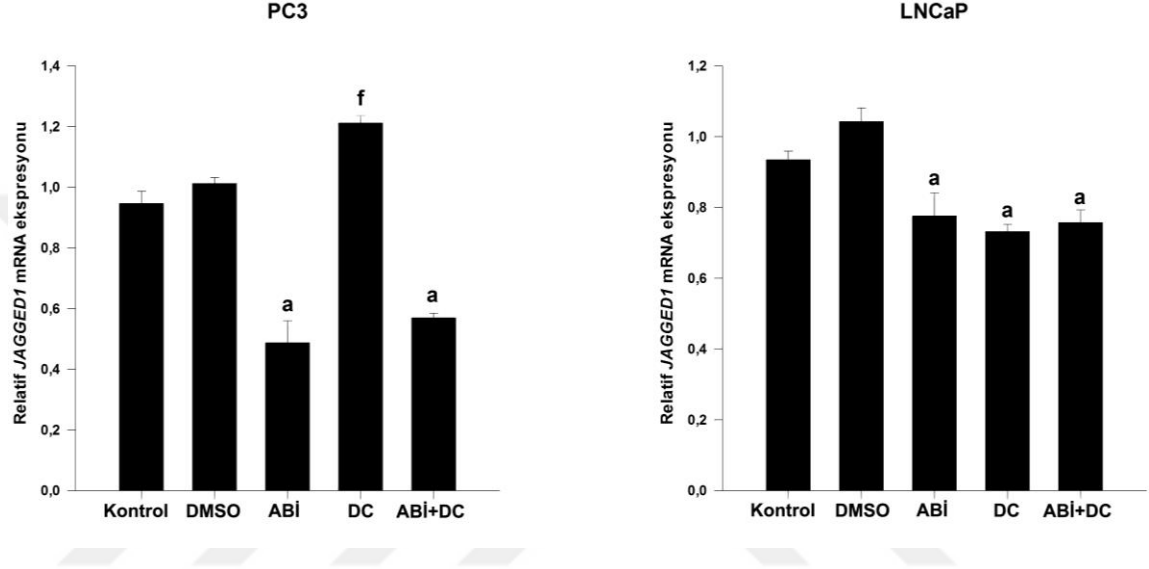
LNCaP hücrelerinin ilaçlarla 72 saat inkübasyonu sonrasında ise, *NOTCH1* geni mRNA ekspresyonu, sadece dosetaksel uygulanan grupta kontrol ve abirateron asetat uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.38.B). Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,001$) (Şekil 4.38.B).



Şekil 4.38. PC3 ve LNCaP hücrelerinde *NOTCH1* mRNA'sının qRT-PCR ile analizi bulguları. **A)** PC3 hücrelerinde *NOTCH1* geninin mRNA ekspresyonu analizi, **B)** LNCaP hücrelerinde *NOTCH1* geninin mRNA ekspresyonu analizi, **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel. Şekilde, **a;** DMSO grubuna göre anlamlılığı, **b;** abirateron asetat grubuna göre anlamlılığı **e;** Abirateron asetat ve Abirateron asetat+Dosetaksel gruplarına göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0,001$).

PC3 hücrelerinin ilaçlarla 72 saat inkübasyonu sonrasında, *JAGGED1* geni mRNA ekspresyonunun, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında, DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.39.A). Dosetaksel grubunda ise, DMSO, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarına kıyasla *JAGGED1* geni mRNA ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.39.A).

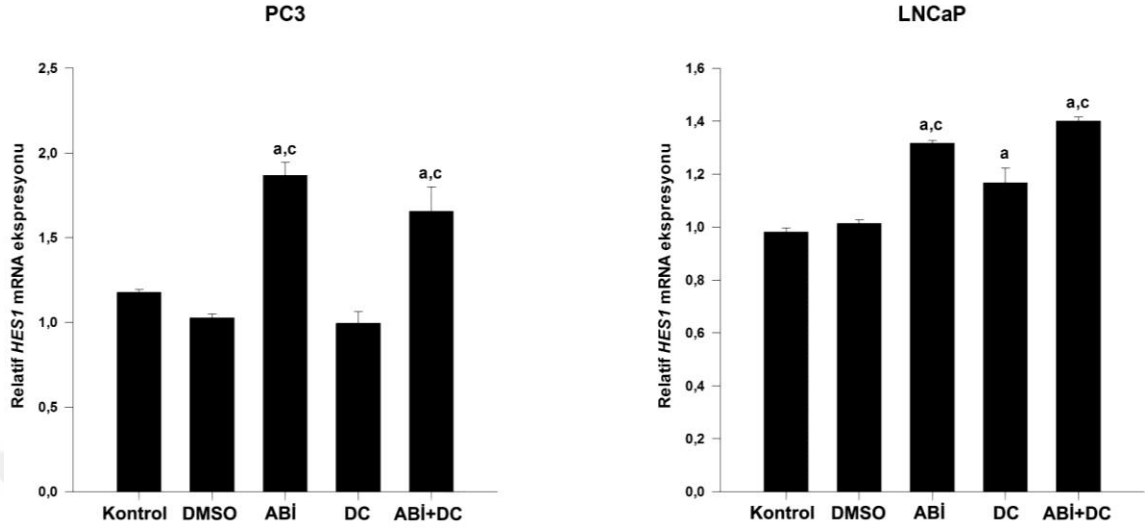
LNCaP hücrelerinin ilaçlarla 72 saat inkübasyonu sonrasında *JAGGED1* geninin mRNA ekspresyonu ise, abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında, DMSO grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.39.B).



Şekil 4.39. PC3 ve LNCaP hücrelerinde *JAGGED1* mRNA'sının qRT-PCR ile analizi bulguları, **A)** PC3 hücrelerinde *JAGGED1* geninin mRNA ekspresyonu analizi, **B)** LNCaP hücrelerinde *JAGGED1* geninin mRNA ekspresyonu analizi. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABI:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABI+DC:** abirateron asetat+dosetaksel, **a:** DMSO grubuna göre anlamlılığı, **f:** DMSO, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarına göre anlamlılığı göstermektedir ($p<0,001$).

PC3 hücrelerinin ilaçlarla 72 saat inkübasyonu sonrasında, *HES1* geni mRNA ekspresyonu, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında, DMSO ve dosetaksel gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.40.A). Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,001$) (Şekil 4.40.A).

LNCaP hücrelerinde *HES1* geninin mRNA ekspresyonu, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel gruplarında, DMSO ve dosetaksel gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.40.B). Dosetaksel grubunda ise, DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.40.B).



Şekil 4.40. PC3 ve LNCaP hücrelerinde *HES1* mRNA'sının qRT-PCR ile analizi bulguları **A)** PC3 hücrelerinde *HES1* geninin mRNA ekspresyonu analizi, **B)** LNCaP hücrelerinde *HES1* geninin mRNA ekspresyonu analizi. **DMSO:** dimetil sülfoksit, **ABİ:** abirateron asetat, **DC:** dosetaksel, **ABİ+DC:** abirateron asetat+dosetaksel, **a:** DMSO grubuna göre anlamlılığı, **c:** dosetaksele göre anlamlılığı göstermektedir ($p < 0,001$).

5. TARTIŞMA

PCa, bugüne kadar, erkeklerde en sık teşhis edilen neoplazmlardan biridir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı mortalitede ikinci sırayı almaktadır (Siegel ve ark., 2017). PCa, önceleri bilateral orşitektomi veya anti-androjenler ile kastre edilerek tedavi edilmeye çalışılmıştır. Metastatik PCa hastalarının tedavisindeki köşe taşı, anti-androjenler ile yapılan tedavidir. Tedavi alan kişilerdeki başlangıç cevabı oldukça iyidir; nitekim bu hastalarda başlangıç cevabı PSA ve yumuşak doku metastazında azalma gözlenmesidir. Ancak, bu tedaviden yaklaşık 18-24 ay sonra, hastalarda hormon tedavisine direnç gelişir ve CRPC ortaya çıkar (Pienta ve Bradley, 2006; Sinibaldi, 2007). Bunun sebebinin ise, PCa hücrelerinden ve adrenal bez tarafından üretilen androjenlerin olabileceği belirtilmiştir (Attard ve ark., 2005; Bruno ve Njar, 2007). Anti-androjenler ile yapılan tedavi, ilerleyen süreçte PCa hücreleri üzerine agonistik etki yaparak AR'nin aşırı ekspresyonuna veya AR mutasyonuna neden olduğu, ve ayrıca mutasyona uğrayan reseptörün androjen yokluğunda bile aktive olmasına yol açtığı vurgulanmıştır (Chen ve ark., 2004). Hormon dirençli prostat kanseri, klinikte dosetaksel ve/veya abirateron asetat ile tedavi edilmeye çalışılmaktadır (Sinibaldi, 2007). *In vitro*'da, PCa hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda da, çoğunlukla bu ilaçlar kullanılmakta ve bu ilaçların, hücresel düzeyde etkilediği moleküler mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Bu çalışma, metastatik AR(-) PC3 ve AR(+) LNCaP prostat kanser hücre hatlarına abirateron asetat ve dosetaksel uygulandığı zaman, Notch sinyal yolağı üyelerinden Notch1, Jagged1 ve Hes1'in ekspresyonlarının nasıl etkilendiğine ilişkin, günümüze kadar yapılan ilk orijinal çalışmadır.

Literatürde, *in vitro*'da, PCa hücre hatlarına, abirateron asetat (Richards ve ark., 2012; Brossard ve ark., 2013; van Soest ve ark., 2013; Iuliani ve ark., 2015) ve dosetaksel'in (Ting ve ark., 2007; Henry ve ark., 2012; Liu ve ark., 2013; Pham ve ark., 2014; Mimeault ve ark., 2015) uygulandığı birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmaların çoğunluğunda, PC3 ve LNCaP hücreleri için, proliferasyon testi tekniği kullanılarak, etkinliği belirlenmiş IC50 dozu ve süresi belirlenmesi parametreleri eksik bırakılmıştır. Bununla birlikte, daha önceki çalışmalarda, abirateron asetat için 10 µM, dosetaksel için

ise 5 nM dozları kullanılmış ve süre ise her iki ilaç için de 48 saat olarak uygulanmıştır (Iuliani ve ark., 2015; Mimeault ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda, literatürdeki dozları ve süreleri de kapsayacak şekilde yapılan uygun doz ve süre belirleme sürecinde, literatürde belirtilen doz ve sürenin etkin olmadığı belirlenmiş ve ardından yeniden abirateron asetat ve dosetaksel için en uygun IC50 dozları ve süreleri belirlenmiş ve ardından belirlenen bu doz ve süreler deney boyunca uygulanmıştır.

Notch sinyal yolağı, normal prostat gelişimi için gerekli olduğundan (Wang ve ark., 2006) yola çıkılarak, bu yolağın prostat kanseri gelişimine de katkıda bulunabileceği beklenir. Notch1 reseptörünün aktive edici mutasyonları, sıklıkla lösemi ve akciğer kanserinde gözlenmiştir (Radtke ve Raj, 2003; Weng ve ark., 2004; Roy ve ark., 2007; Maraver ve ark., 2012). Bununla birlikte, PCa'de Notch mutasyonları nadiren bildirilmiştir, bu nedenle, PCa'de Notch sinyal yolağının nasıl düzenlendiği hala tam olarak anlaşılammıştır. PCa'de Notch sinyalizasyonunun aktivasyonunu sağlayan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, PCa hastaları için Notch inhibitörlerinin klinik gelişimi için büyük önem taşır. Daha önce yapılan prostat kanseri çalışmaları incelendiği zaman, Notch sinyal yolağı üyelerinden özellikle Notch1, Jagged1 ve Hes1 üzerinde durulmuş olduğu görülmektedir (Shou ve ark., 2001; Santagata ve ark., 2004; Scorey ve ark., 2006; Wang ve ark., 2010; Wang ve ark., 2011; Soylu ve ark., 2015).

Bu çalışmada, PC3 hücrelerine abirateron asetat uygulanması sonrasında, Notch1 ekspresyonunun gen ve protein seviyesi düzeyinde azaldığı, bununla birlikte, immünofloresan düzeyinde herhangi bir önemli değişiklik gözlenmedi. İmmünofloresan yöntemi, daha çok Notch1 proteinin lokasyonu ve dağılımı hakkında bilgi verir, dolayısıyla bize göre, protein seviyesi hakkında daha net bilgi veren western blot sonuçları daha önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalarda; PC3 prostat kanseri hücre hattında, Notch1 ve ligandı olan Jagged1'in ekspresyonunun azalmasının, S fazı hücre siklusu ilerlemesini geciktirdiği ve hücre büyümesinin inhibe olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2006). Bin Hafeez ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; insan dokuları ve insan PCa hücre hatlarında, Notch1'in aşırı ekspresyonunun tümör invazyonunu desteklediği gösterilmiş, PC3 ve 22Rv1 insan prostat kanseri hücre hatlarında Notch1'in knockdown edilmesinin ise, hücre invazyonunu önemli derecede azalttığı vurgulanmıştır. Ayrıca,

Notch1'in knockdown edilmesinin, Notch1'in - NF-KB yolağının hedef genleri olan matriks metalloproteinaz-9 (MMP9) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) dahil olmak üzere hücre invazyonunda rol alan hücre dışı proteinlerinin ekspresyonunda belirgin bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Bin Hafeez ve ark., 2009). Bir başka çalışmada, prostat kanseri kemik metastazında, Notch1 aşırı ekspresyonu gözlenmiştir (Sethi ve ark., 2010). 2017 yılında yayınlanan bir çalışmada, Notch1'in aşırı ekspresyonunun, PC3 hücrelerinde migrasyon ve invazyonu artırdığı, Notch1'in baskılanmasının ise, migrasyon ve invazyonu geciktirdiği gösterilmiştir. Ayrıca Notch1'in aşırı ekspresyonu, PC3 hücrelerinde EMT (epithelial–mesenchymal transition)'ye neden olmuştur (Zhang ve ark., 2017). Yukarıdaki ifadelerden hareketle, daha önce yapılan çalışmalara göre, Notch1 ekspresyonunun azalması, PCa hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını azaltabilir veya inhibe edebilir. Daha önce yapılan çalışmaların sonuçları gözönüne alınarak, bizim çalışmamızdan elde edilen bulgular yorumlandığında, abirateron asetatın, Notch1 ekspresyonunu azaltarak, PCa hücrelerinin, proliferasyonunu, EMT'sini, migrasyonunu, invazyonunu ve metastazını azaltabileceği vurgulanabilir.

Bizim çalışmamızda, PC3 hücrelerine dosetaksel uygulanması, Notch1 ekspresyonunu gen düzeyinde artırdığı belirlendi. Ancak bu artış, western blot ile belirlenen protein seviyesine ve immünofloresan boyama ile belirlenen protein ekspresyonuna yansımada. Bunun nedeni, hücrenin bu proteine ihtiyacının olmaması veya ilerleyen süreçte translasyon mekanizmaları ile ilişkili bir düzensizlikten kaynaklanıyor olabilir.

Bu çalışmada, LNCaP hücrelerine abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel uygulanması ise, western blot düzeyinde Notch1 protein seviyesini azaltmıştır. Ancak bu azalış gen düzeyine ve immünofloresan boyanmalarına yansımamıştır. Gen düzeyindeki azalış ilk saatlerde gerçekleşmiş olabilir ve 72 saatlik sürenin sonuna doğru ise gen ekspresyonu normal seviyeye ulaşmış olabilir. Shou ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı çalışmada LNCaP, DU145 ve PC3 insan prostat kanser hücrelerinde RT-PCR analizleri ile, Notch1 ekspresyonun normal hücrelere göre artış gösterdiğini tesbit ettiler. TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate) hayvanların primer ve metastatik tümörünün malignant prostatik epiteliyal hücrelerinde ise *in situ* hibridizasyon ile Notch1

ekspresyonunun belirgin derecede arttığını tesbit etmişlerdir (Shou ve ark., 2001). Scorey ve arkadaşları LNCaP, PC3 ve PC-3M hücre hatlarında Notch1-4, Jagged1-2 ve Dll1'in RT-PCR ile analizlerini gerçekleştirmişler, LNCaP, PC3 ve PC-3M hücre hatlarında Notch1 ve Jagged1 ekspresyonunun PNT2 normal hücre hattına kıyasla ekspresyonlarının arttığını belirlemişlerdir (Scorey ve ark., 2006). Bin Hafeez ve arkadaşlarının 2009 yılında PC3, DU-145, LNCaP and 22Rv1 PCa hücre hatlarında Notch1'in western blot analizinde ekspresyonunun normal PrEC hücre hattına göre anlamlı şekilde arttığını belirlemiştir (Bin Hafeez ve ark., 2009). Wang ve arkadaşları 2011 yılında bu çalışmada PC3, DU145, LNCaP, and C4-2B insan PCa hücre hatlarını kullanarak NOTCH1 ve JAGGED1'in hücre büyümesini arttırdığı ve apoptozu inhibe ettiğini tesbit etmişlerdir (Wang ve ark., 2011). Zhu ve arkadaşları 2013 yılında yaptığı çalışmada, 286 benign, high PIN (prostatik intraepitelyal neoplazi) ve düşük veya yüksek grade PCa'li hastaların dokularında, Notch1 ve Jagged1 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede artışını göstermişlerdir (Zhu ve ark., 2013). Su ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, LNCaP hücrelerinde Notch1 hedefli siRNA kullanarak *Notch1* geni ekspresyonu inhibe edildiği zaman, hücre siklusunda arrest, apoptoz ve proliferasyon inhibisyonu gözlenmiştir (Su ve ark., 2013). Bu çalışmada, literatürde ilk defa, LNCaP hücrelerine abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel uygulanması yapılmış ve sonuçta, bu hücrelerde Notch1 protein ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmaların ışığında bizim bulgularımız değerlendirildiğinde, abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel uygulamalarının Notch1 protein ekspresyonunu azaltması, LNCaP hücrelerinin hücre siklusunun arrestine, apoptozuna, proliferasyonunun inhibisyonuna neden olabileceği söylenebilir.

Yukarıda belirtilen bulgularımıza göre; abirateron asetat, tüm vücutta androjen sentezini inhine etmesinin yanında, Notch1 inhibisyonuna da neden olarak, metastatik PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerinde, proliferasyonu, EMT'yi, migrasyonu, invazyonu ve metastazı azaltabileceği veya inhibe edebileceği öne sürülebilir.

Çalışmada, PC3 hücrelerine abirateron asetat uygulaması, Jagged1'in gen düzeyinde mRNA ekspresyonunu azalttı. Ancak bu azalış protein düzeyinde gözlenmedi. Aynı hücrelere dosetaksel uygulanması ise tam tersine Jagged1'in gen düzeyinde mRNA

ekspresyonunu artırdı. Ancak bu artış, protein düzeyine yansımada. PC3 hücrelerine abirateron asetat+dosetaksel uygulaması sonrasında ise, Jagged1 gen düzeyinde mRNA ekspresyonu azalırken, protein düzeyinde artış gösterdiği belirlendi. Memelilerde, mRNA 2,6-7 saat arası stabil kalabilmekte iken, oluşan protein ise 48 saate kadar stabil kalabilmektedir (Vogel ve Marcotte, 2012). Dolayısıyla, mRNA düzeyinde azalış gözlenirken, protein aşamasında artış göstermesi, heriki sürecin stabilitesinin farklı oluşundan kaynaklanıyor olabilir. İlk etapta, oluşan mRNA, sonraki süreçte degrades olabilir. Santagata ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı bir çalışmada, 236 hastanın benign, high-grade PİN (prostatik intraepitelyal neoplazi), lokalize ve metastatik prostat kanseri dokularında immunohistokimya tekniği ile Jagged1 proteininin immüno lokalizasyonu araştırılmış ve sonuçta, metastatik prostat kanseri dokularında benign ve lokalize PCa dokularına kıyasla Jagged1 proteininin ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Santagata ve ark., 2004). Scorey ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış olduğu RT-PCR analizleri ile, LNCaP, PC3 ve PC-3M hücre hatlarında Jagged1 ekspresyonunun PNT2 normal hücre hattına kıyasla ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir (Scorey ve ark., 2006). Wang ve arkadaşları 2011 yılında bu çalışmada PC3, DU145, LNCaP, and C4-2B insan PCa hücre hatlarını kullanarak Jagged1'in hücre büyümesini arttırdığını ve apoptozu inhibe ettiğini tesbit etmişlerdir (Wang ve ark., 2011). Zhu ve arkadaşları 2013 yılında yaptığı çalışmada 286 benign, high PİN (prostatik intraepitelyal neoplazi) ve düşük/yüksek grade PCa'li hastaların dokularında Jagged1'in immünohistokimyasal analizini yapmışlardır. Metastatik veya yüksek grade PCa dokularında Jagged1 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir (Zhu ve ark., 2013). Bizim 2015 yılında yaptığımız çalışmada 20 lokal prostatik adenokarsinoma, 18 High PİN ve 18 normal prostat dokusunda proteinlerinin immünohistokimyasal analizleri yapılmıştır. Prostat kanseri başlangıcı PİN ve prostatik adenokarsinom yapısında Jagged1 proteininin ekspresyonunun belirgin derecede arttığı gösterilmiştir (Soylu ve ark., 2015). Delury ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış olduğu çalışmada, metastatik PC3 hücrelerinde, kemik iliği stromasının, Jagged1 ekspresyonunu indüklediği ve böylece hücre migrasyonunu ilerlettiği gösterilmiştir (Delury ve ark., 2016). Su ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada, Pten null prostat kanseri modelinde, Jagged1'in aşırı ekspresyonu, prostat stromal hücrelerinde Tgfb β sinyal

yolağını uyararak reaktif stromal mikroçevreyi uyararak prostat kanseri ilerlemesine alacılık ettiği gösterilmiştir (Su ve ark., 2017). Daha önce Jagged1 ekspresyonu ile ilgili yapılan çalışmalar dikkate alındığında, bizim çalışmamızda PC3 hücrelerine özellikle abirateron asetat+dosetaksel uygulaması, Jagged1 protein ekspresyonunu artırdığı belirlenmiş olup, Jagged1 protein ekspresyonunun artması, prostat kanserinin ilerlemesi için önemli olan reaktif stroma gelişimi ve ilerlemesini artırabileceği, apoptoz inhibisyonu yapabileceği, hücre büyümesini artırabileceği ve hücrelerin migrasyonuna katkıda bulunabileceği öngörülebilir.

Çalışmamızda, LNCaP hücrelerine abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel uygulaması sonrasında, Jagged1'in sadece gen düzeyinde mRNA ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Protein düzeyinde ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Jagged1 mRNA'sında gözlenen azalışın, protein düzeyine yansımamış olması, translasyon mekanizmaları ile ilişkili bir süreç olabilir (Vogel ve Marcotte, 2012).

PC3 hücrelerine abirateron asetat uygulanmasından sonra, Hes1'in sadece mRNA düzeyinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Western blot ve immünofloresan sonuçlarına göre, HES1 proteini ekspresyonu biraz artmıştır, ancak bu artış anlamlı değildir. HES1'in gen düzeyindeki artışının protein düzeyine yeterince yansımamış olması, ilerleyen süreçte proteine dönüştürülebileceği anlamına da gelebilir. Bu çalışmada PC3 hücrelerine abirateron asetat+dosetaksel uygulaması, HES1'in gen düzeyinde mRNA ekspresyonunu DMSO grubuna göre neredeyse iki kat artırdı. LNCaP hücrelerine abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel uygulanması ise, HES1'in hem protein hemde gen düzeyinde ekspresyonunun anlamlı şekilde artmasına neden oldu. Palomero ve arkadaşları 2007 yılında T-hücre lösemisi ile ilişkili yaptıkları bir çalışmada, Hes1'in doğrudan *Pten* ekspresyonunu baskıladığı ve PI3K yolağının aktivasyonunu sağladığını rapor etmişlerdir (Palomero ve ark., 2007). Wong ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da, Hes1'in *Pten*'i baskıladığı ve böylece in vitro timosit gelişimini düzenlenlediği gösterildi (Wong ve ark., 2012). Gao ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bir çalışmada, insan kolon kanseri dokularında, Hes1'in *PTEN* promotoruna bağlanarak, doğrudan *PTEN*'i regüle ettiği ve böylece *PTEN*/PI3K/Akt yolağınının düzenlenmesinde önemli rol aldığı belirtildi (Gao ve ark., 2015). 2015 yılında yapılan başka bir çalışmada,

insan nazofarengiyal karsinoma hücrelerinde, Hes1'in aşırı ekspresyonu, PTEN'in mRNA ve protein seviyesinde ekspresyonunu azalttığı, Hes1'in knockout edilmesi durumunda PTEN'in mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonunun önemli derecede arttığı gösterildi. Ayrıca kromatin immünopresipitasyon testi ile de Hes1'in *PTEN* lokusu ile ilişkili olduğu ve *PTEN* promotor bölgesine bağlandığı gösterildi (Wang ve ark., 2015). Daha önceki bilgilere göre, klinik prostat kanseri vakalarının yaklaşık %30-70'inde PTEN kaybı gözlenmektedir (Shen ve Abate-Shen, 2010). Yukarıda verilen Hes1-PTEN yolu ile ilgili verilere paralel olarak, hastalığın farklı evrelerindeki PCa hastalarında, PTEN mRNA seviyesi ile HES1 mRNA seviyesinin ters orantılı olduğu insan PCa data set analizleri ile gösterildi (Revandkar ve ark., 2016). 2015 yılında yapılan bir çalışmada, PTEN kaybı olan prostat kanseri hastalarının abirateron asetat ile tedavi edilmesi sonrasında, daha kötü klinik sonuçlar olabileceğini göstermişlerdir (Ferraldeschi ve ark., 2015). Daha önce yapılan yukarıdaki çalışmaların ışığında, PC3 hücrelerinde abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel, LNCaP hücrelerinde abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel uygulaması sonrasında artan Hes1, *PTEN* promotoruna bağlanarak, PTEN ekspresyonunun baskılanmasına neden olabileceği öngörülebilir. PTEN'nin baskılanması, hücrelerde proliferasyon, hayatta kalma ve tümör büyümesini artırıyor olabilir. Aslında bu çalışmanın sonuçlarına göre, abirateron asetatın bir taraftan CYP17A1 inhibitörü olarak PCa'yı tedavi etmeye çalışırken, diğer taraftan Hes1 aracılı PTEN kaybına neden olarak PCa hastalarının prognozunun daha kötüye gitmesine neden olabileceği öngörülebilir.

Scorey ve arkadaşları metastatik LNCaP ve PC3 hücre hatlarında Hes1'in gama sekretaz inhibitörü ile inhibisyonu sonrası, hücre canlılığının 48 saat sonra anlamlı derecede azaldığını tesbit etmişlerdir (Scorey ve ark., 2006). Ayrıca Bizim 2015 yılında yaptığımız çalışmada 20 lokal prostatik adenokarsinoma, 18 High PİN ve 18 normal prostat dokusunda Hes1'in immünohistokimyasal analizleri sonucunda, prostat kanseri başlangıcı olan PİN yapısı ve adenokarsinom yapısında Hes1 proteininin ekspresyonu belirgin derecede arttığı gösterildi (Soylu ve ark., 2015). Abirateron asetat ve dosetaksel uygulamasının artırdığı Hes1 ekspresyonunun, PCa prognozunun daha kötüye gitmesine neden olabileceği ileri sürülebilir.

Çalışmamızda, elde edilen tüm bulgularımız birlikte değerlendirildiğinde; *in vitro* koşullarda prostat kanseri hücrelerine abirateron asetat ve dosetaksel uygulamasının, Notch sinyal yolağı proteinlerinin ekspresyonlarını etkilediği söylenilebilir. Bu ilaçların uygulanması sonucunda, özellikle Hes1 ekspresyonunun, hem androjen reseptörü pozitif olan LNCaP hücrelerinde ve hem de androjen reseptörü negatif olan PC3 hücrelerinde anlamlı şekilde arttığı gösterildi. Sonuçlarımıza göre, *in vivo* koşullarda sadece ilaç uygulaması yerine, ilaçlarla birlikte, Notch sinyal yolağı inhibitörlerinin birlikte uygulanması, Hes1 ekspresyonunu azaltabilir ve uygulama hastanın prognozundaki kötüye gidişi durdurulabilir. Ancak abirateron asetat ve dosetaksel ile birlikte Notch inhibitörlerinin hastalarda kullanılabilmesi için, Notch sinyal yolağının etkilediği diğer moleküler mekanizmaları aydınlatacak yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tezde, *in vitro* koşullarda, PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarına abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel uygulaması sonrasında, hücre proliferasyonu, farklanması, hayatta kalmasında önemli olan Notch sinyal yolağı üyelerinden Notch1, Jagged1 ve Hes1 ekspresyon değişimleri araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

1. PC3 hücrelerine abirateron asetat uygulanması, Notch1 ekspresyonunu hem gen hem de protein düzeyinde azaltmıştır. Ancak immünofloresan düzeyinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Dosetaksel uygulanması sonrasında, sadece gen düzeyinde Notch1 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Abirateron asetat+dosetaksel uygulanması sadece immünofloresan düzeyinde Notch1 ekspresyonunu çok az artırmıştır.
2. LNCaP hücrelerine abirateron asetat ve abirateron asetat+dosetaksel uygulanması, Notch1 ekspresyonunu, western blot sonuçlarına göre sadece protein düzeyinde azaltmıştır.
3. PC3 hücrelerinde Jagged1 ekspresyonu, abirateron asetat uygulandığı zaman sadece mRNA düzeyinde azalmıştır. Dosetaksel uygulandığı zaman sadece mRNA düzeyinde artmıştır. Abirateron asetat+dosetaksel uygulandığında ise, protein düzeyinde artmış iken, mRNA düzeyinde azalmıştır.
4. LNCaP hücrelerinde Jagged1 ekspresyonu, abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel uygulandığında sadece mRNA düzeyinde azaldığı gözlenmiştir, ancak bu azalış protein düzeyine yansımamıştır.
5. PC3 hücrelerinde Hes1 ekspresyonu, abirateron asetat uygulandığı zaman sadece mRNA düzeyinde artmıştır. Dosetaksel uygulandığı zaman anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Abirateron asetat+dosetaksel uygulandığında, mRNA düzeyinde artmıştır, ancak protein düzeyinde ise azalmıştır.
6. LNCaP hücrelerinde Hes1 ekspresyonu, abirateron asetat, dosetaksel ve abirateron asetat+dosetaksel uygulandığında hem gen hem de protein düzeyinde artmıştır. Ancak

dosetaksel uygulaması sonrasında, sadece immünofloresan düzeyinde bir değişim olmamıştır.

7. Bu çalışma *in vitro* koşullarda abirateron asetat ve dosetaksel uygulanması sonrasında, Notch1, Jagged1 ve Hes1 ekspresyon değişimini araştıran ilk çalışmadır.
8. Bu çalışma, abirateron asetat+dosetaksel'in birlikte uygulandığı ilk çalışmadır.
9. Prostat kanseri hücrelerine abirateron asetat ve dosetaksel uygulanmasının, Hes1 ekspresyonunda çok anlamlı oranda artışına neden olduğu literatürde ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak, *in vitro*'da prostat kanseri hücrelerine Abirateron asetat ve dosetaksel uygulandığında, Notch sinyal yolağı proteinlerinin ekspresyonları değişmektedir. Bulgularımıza göre, bu ilaçların uygulanması ile, her iki hücre hattında da, özellikle Hes1 ekspresyonunda çok anlamlı oranda artış görülmektedir. Dolayısıyla, PCa'li hasta tedavisinde, bu kemoterapötik ilaçlarla birlikte, Notch sinyal yolağı inhibitörlerinin birlikte uygulanması, Hes1 ekspresyonunu azaltabilir ve hastanın prognozundaki kötüye gidiş durdurulabilir. Bununla birlikte, abirateron asetat ve dosetaksel ile birlikte Notch inhibitörlerinin hastalarda kullanılabilmesi için, daha ileri çalışmalara gereksinim olduğu açıktır.

KAYNAKLAR

Aboseif S, Shinohara K, Weidner N, Narayan P, Carroll PR. The significance of prostatic intra-epithelial neoplasia. *British journal of urology* 1995;76: 355-359.

Acosta H, Lopez SL, Revinski DR, Carrasco AE. Notch destabilises maternal beta-catenin and restricts dorsal-anterior development in *Xenopus*. *Development* 2011;138: 2567-2579.

Al Ekish S, Nayeemuddin M, Maddox M, Pareek G. The role of cryosurgery of the prostate for nonsurgical candidates. *JLSLS : Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons* 2013;17: 423-428.

Alana L, Sese M, Canovas V, Punyal Y, Fernandez Y, Abasolo I, de Torres I, Ruiz C, Espinosa L, Bigas A et al. Prostate tumor Overexpressed-1 (PTOV1) down-regulates HES1 and HEY1 notch targets genes and promotes prostate cancer progression. *Molecular cancer* 2014;13: 74.

Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in cancer. *Cancer biology & therapy* 2002;1: 466-476.

Andersen P, Uosaki H, Shenje LT, Kwon C. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends in cell biology* 2012;22: 257-265.

Andersson ER, Lendahl U. Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet? *Nature reviews Drug discovery* 2014;13: 357-378.

Aoyagi K, Shima I, Wang M, Hu Y, Garcia FU, Stearns ME. Specific transcription factors prognostic for prostate cancer progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1998;4: 2153-2160.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999;284: 770-776.

Attard G, Belldegrun AS, de Bono JS. Selective blockade of androgenic steroid synthesis by novel lyase inhibitors as a therapeutic strategy for treating metastatic prostate cancer. *BJU international* 2005;96: 1241-1246.

Baade PD, Coory MD, Aitken JF. International trends in prostate-cancer mortality: the decrease is continuing and spreading. *Cancer causes & control : CCC* 2004;15: 237-241.

Bae S, Bessho Y, Hojo M, Kageyama R. The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development* 2000;127: 2933-2943.

Baladron V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Diaz-Guerra MJ, Garcia-Ramirez JJ, Bonvini E, Gubina E, Laborda J. dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Experimental cell research* 2005;303: 343-359.

Barclay WW, Woodruff RD, Hall MC, Cramer SD. A system for studying epithelial-stromal interactions reveals distinct inductive abilities of stromal cells from benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Endocrinology* 2005;146: 13-18.

Berechid BE, Kitzmann M, Foltz DR, Roach AH, Seiffert D, Thompson LA, Olson RE, Bernstein A, Donoviel DB, Nye JS. Identification and characterization of presenilin-independent Notch signaling. *The Journal of biological chemistry* 2002;277: 8154-8165.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review* 2005;11: 127-152.

Bessho Y, Miyoshi G, Sakata R, Kageyama R. Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2001;6: 175-185.

Bin Hafeez B, Adhami VM, Asim M, Siddiqui IA, Bhat KM, Zhong W, Saleem M, Din M, Setaluri V, Mukhtar H. Targeted knockdown of Notch1 inhibits invasion of human prostate cancer cells concomitant with inhibition of matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15: 452-459.

Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 1997;90: 281-291.

Borggreffe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2009;66: 1631-1646.

Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006;7: 678-689.

Bray SJ, Takada S, Harrison E, Shen SC, Ferguson-Smith AC. The atypical mammalian ligand Delta-like homologue 1 (Dlk1) can regulate Notch signalling in *Drosophila*. *BMC developmental biology* 2008;8: 11.

Brossard D, Zhang Y, Haider SM, Sgobba M, Khalid M, Legay R, Duterque-Coquillaud M, Galera P, Rault S, Dallemagne P et al. N-substituted piperazinopyridylsteroid derivatives as abiraterone analogues inhibit growth and induce pro-apoptosis in human hormone-independent prostate cancer cell lines. *Chemical biology & drug design* 2013;82: 620-629.

Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular cell* 2000;5: 207-216.

Bruno RD, Njar VC. Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2007;15: 5047-5060.

Bush G, diSibio G, Miyamoto A, Denault JB, Leduc R, Weinmaster G. Ligand-induced signaling in the absence of furin processing of Notch1. *Developmental biology* 2001;229: 494-502.

Carver BS. Strategies for targeting the androgen receptor axis in prostate cancer. *Drug discovery today* 2014;19: 1493-1497.

Ceder JA, Jansson L, Helczynski L, Abrahamsson PA. Delta-like 1 (Dlk-1), a novel marker of prostate basal and candidate epithelial stem cells, is downregulated by notch

signalling in intermediate/transit amplifying cells of the human prostate. *European urology* 2008;54: 1344-1353.

Chandran UR, Ma C, Dhir R, Bisceglia M, Lyons-Weiler M, Liang W, Michalopoulos G, Becich M, Monzon FA. Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC cancer* 2007;7: 64.

Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, Sawyers CL. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nature medicine* 2004;10: 33-39.

Choi N, Zhang B, Zhang L, Ittmann M, Xin L. Adult murine prostate basal and luminal cells are self-sustained lineages that can both serve as targets for prostate cancer initiation. *Cancer cell* 2012;21: 253-265.

Clarke SJ, Rivory LP. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clinical pharmacokinetics* 1999;36: 99-114.

Cooper CR, Chay CH, Gendernalik JD, Lee HL, Bhatia J, Taichman RS, McCauley LK, Keller ET, Pienta KJ. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer* 2003;97: 739-747.

Cortes JE, Pazdur R. Docetaxel. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1995;13: 2643-2655.

D'Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G. Canonical and non-canonical Notch ligands. *Current topics in developmental biology* 2010;92: 73-129.

Danza G, Di Serio C, Ambrosio MR, Sturli N, Lonetto G, Rosati F, Rocca BJ, Ventimiglia G, del Vecchio MT, Prudovsky I et al. Notch3 is activated by chronic hypoxia and contributes to the progression of human prostate cancer. *International journal of cancer* 2013;133: 2577-2586.

Danza G, Di Serio C, Rosati F, Lonetto G, Sturli N, Kacer D, Pennella A, Ventimiglia G, Barucci R, Piscazzi A et al. Notch signaling modulates hypoxia-induced neuroendocrine

differentiation of human prostate cancer cells. *Molecular cancer research* : MCR 2012;10: 230-238.

Delury C, Hart C, Brown M, Clarke N, Parkin E. Stroma-induced Jagged1 expression drives PC3 prostate cancer cell migration; disparate effects of RIP-generated proteolytic fragments on cell behaviour and Notch signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 2016;472: 255-261.

Demehri S, Liu Z, Lee J, Lin MH, Crosby SD, Roberts CJ, Grigsby PW, Miner JH, Farr AG, Kopan R. Notch-deficient skin induces a lethal systemic B-lymphoproliferative disorder by secreting TSLP, a sentinel for epidermal integrity. *PLoS biology* 2008;6: e123.

Deng G, Ma L, Meng Q, Ju X, Jiang K, Jiang P, Yu Z. Notch signaling in the prostate: critical roles during development and in the hallmarks of prostate cancer biology. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2016;142: 531-547.

Denis L, Morton MS, Griffiths K. Diet and its preventive role in prostatic disease. *European urology* 1999;35: 377-387.

Diaz JF, Andreu JM. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry* 1993;32: 2747-2755.

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991;66: 649-661.

Ferraldeschi R, Nava Rodrigues D, Riisnaes R, Miranda S, Figueiredo I, Rescigno P, Ravi P, Pezaro C, Omlin A, Lorente D et al. PTEN protein loss and clinical outcome from castration-resistant prostate cancer treated with abiraterone acetate. *European urology* 2015;67: 795-802.

Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, Staffurth JN, North S, Vogelzang NJ, Saad F et al. Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-

resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet Oncology* 2012;13: 983-992.

Fleming RJ. Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in cell & developmental biology* 1998;9: 599-607.

Fraering PC, Ye W, Strub JM, Dolios G, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, van Dorselaer A, Wang R, Selkoe DJ, Wolfe MS. Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry* 2004;43: 9774-9789.

Frank SB, Miranti CK. Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development. *Frontiers in oncology* 2013;3: 273.

Frick J, Aulitzky W. Physiology of the prostate. *Infection* 1991;19 Suppl 3: S115-118.

Ganju A, Yallapu MM, Khan S, Behrman SW, Chauhan SC, Jaggi M. Nanoways to overcome docetaxel resistance in prostate cancer. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2014;17: 13-23.

Gao F, Huang W, Zhang Y, Tang S, Zheng L, Ma F, Wang Y, Tang H, Li X. Hes1 promotes cell proliferation and migration by activating Bmi-1 and PTEN/Akt/GSK3beta pathway in human colon cancer. *Oncotarget* 2015;6: 38667-38680.

Gaynor ML. Isoflavones and the prevention and treatment of prostate disease: is there a role? *Cleveland Clinic journal of medicine* 2003;70: 203-204, 206, 208-209 passim.

Grant DS, Williams TL, Zahaczewsky M, Dicker AP. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *International journal of cancer* 2003;104: 121-129.

Grishina IB, Kim SY, Ferrara C, Makarenkova HP, Walden PD. BMP7 inhibits branching morphogenesis in the prostate gland and interferes with Notch signaling. *Developmental biology* 2005;288: 334-347.

Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003;361: 859-864.

Gruyter Wd. PSCHYREMBEL. Klinisches Wörterbuch. 266. edn, 2014. neu eremite Auflage, Berlin.

Hayward P, Brennan K, Sanders P, Balayo T, DasGupta R, Perrimon N, Martinez Arias A. Notch modulates Wnt signalling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity. *Development* 2005;132: 1819-1830.

Henry JY, Lu L, Adams M, Meyer B, Bartlett JB, Dalglish AG, Galustian C. Lenalidomide enhances the anti-prostate cancer activity of docetaxel in vitro and in vivo. *The Prostate* 2012;72: 856-867.

Hu YY, Zheng MH, Zhang R, Liang YM, Han H. Notch signaling pathway and cancer metastasis. *Advances in experimental medicine and biology* 2012;727: 186-198.

Iso T, Sartorelli V, Chung G, Shichinohe T, Kedes L, Hamamori Y. HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding. *Molecular and cellular biology* 2001;21: 6071-6079.

Iuliani M, Pantano F, Buttigliero C, Fioramonti M, Bertaglia V, Vincenzi B, Zoccoli A, Ribelli G, Tucci M, Vignani F et al. Biological and clinical effects of abiraterone on anti-resorptive and anabolic activity in bone microenvironment. *Oncotarget* 2015;6: 12520-12528.

Johnson J, Roach M, 3rd. Prostate cancer: impact of national guidelines on brachytherapy monotherapy. *Nature reviews Urology* 2014;11: 195-196.

Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996;383: 707-710.

Kidd S, Kelley MR, Young MW. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Molecular and cellular biology* 1986;6: 3094-3108.

Kidd S, Lieber T. Furin cleavage is not a requirement for Drosophila Notch function. *Mechanisms of development* 2002;115: 41-51.

Komura K, Inamoto T, Takai T, Uchimoto T, Saito K, Tanda N, Kono J, Minami K, Uehara H, Fujisue Y et al. Single session of high-intensity focused ultrasound for localized prostate cancer: treatment outcomes and potential effect as a primary therapy. *World journal of urology* 2014;32: 1339-1345.

Kruijtzter CM, Beijnen JH, Schellens JH. Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: an overview. *The oncologist* 2002;7: 516-530.

Kumar VL, Majumder PK. Prostate gland: structure, functions and regulation. *International urology and nephrology* 1995;27: 231-243.

Kwon C, Cheng P, King IN, Andersen P, Shenje L, Nigam V, Srivastava D. Notch post-translationally regulates beta-catenin protein in stem and progenitor cells. *Nature cell biology* 2011;13: 1244-1251.

Kwon OJ, Valdez JM, Zhang L, Zhang B, Wei X, Su Q, Ittmann MM, Creighton CJ, Xin L. Increased Notch signalling inhibits anoikis and stimulates proliferation of prostate luminal epithelial cells. *Nature communications* 2014;5: 4416.

Lawson DA, Witte ON. Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *The Journal of clinical investigation* 2007;117: 2044-2050.

Leimeister C, Externbrink A, Klamt B, Gessler M. Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mechanisms of development* 1999;85: 173-177.

Leong KG, Gao WQ. The Notch pathway in prostate development and cancer. *Differentiation; research in biological diversity* 2008;76: 699-716.

Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, Pollet I, Karsan A. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *The Journal of experimental medicine* 2007;204: 2935-2948.

Li JL, Sainson RC, Shi W, Leek R, Harrington LS, Preusser M, Biswas S, Turley H, Heikamp E, Hainfellner JA et al. Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer research* 2007;67: 11244-11253.

Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nature genetics* 1997;16: 243-251.

Liotta LA, Kohn E. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* 2004;430: 973-974.

Liu C, Zhu Y, Lou W, Nadiminty N, Chen X, Zhou Q, Shi XB, deVere White RW, Gao AC. Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. *The Prostate* 2013;73: 418-427.

Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95: 8108-8112.

Long RM, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW. Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin Sci (Lond)* 2005;108: 1-11.

Mackler NJ, Pienta KJ. Drug insight: Use of docetaxel in prostate and urothelial cancers. *Nature clinical practice Urology* 2005;2: 92-100; quiz 101 p following 112.

Maraver A, Fernandez-Marcos PJ, Herranz D, Munoz-Martin M, Gomez-Lopez G, Canamero M, Mulero F, Megias D, Sanchez-Carbayo M, Shen J et al. Therapeutic effect of gamma-secretase inhibition in KrasG12V-driven non-small cell lung carcinoma by derepression of DUSP1 and inhibition of ERK. *Cancer cell* 2012;22: 222-234.

McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campbell ML. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer research* 1992;52: 6940-6944.

McNeal JE. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Progress in clinical and biological research* 1984;145: 27-53.

McNeal JE. Normal histology of the prostate. *The American journal of surgical pathology* 1988;12: 619-633.

McNeal JE, Bostwick DG. Anatomy of the prostatic urethra. *Jama* 1984;251: 890-891.

Menche N. *Biologie Anatomie Physiologie*, 2012. Urban & Fischer/ Elsevier, Munich.

Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews* 2011;32: 81-151.

Mimeault M, Rachagani S, Muniyan S, Seshacharyulu P, Johansson SL, Datta K, Lin MF, Batra SK. Inhibition of hedgehog signaling improves the anti-carcinogenic effects of docetaxel in prostate cancer. *Oncotarget* 2015;6: 3887-3903.

Montero A, Fossella F, Hortobagyi G, Valero V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *The Lancet Oncology* 2005;6: 229-239.

Morgan TH. The theory of the gene. *The American Naturalist* 1917;51: 513-544.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 1983;65: 55-63.

Mukherjee T, Kim WS, Mandal L, Banerjee U. Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of *Drosophila* blood cells. *Science* 2011;332: 1210-1213.

Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside in. *Developmental biology* 2000;228: 151-165.

Nakagawa O, McFadden DG, Nakagawa M, Yanagisawa H, Hu T, Srivastava D, Olson EN. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97: 13655-13660.

Nickel JC, Downey J, Young I, Boag S. Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. *BJU international* 1999;84: 976-981.

Palomero T, Dominguez M, Ferrando AA. The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia. *Cell Cycle* 2008;7: 965-970.

Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, Caparros E, Buteau J, Brown K, Perkins SL et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nature medicine* 2007;13: 1203-1210.

Park S, Shinohara K, Grossfeld GD, Carroll PR. Prostate cancer detection in men with prior high grade prostatic intraepithelial neoplasia or atypical prostate biopsy. *The Journal of urology* 2001;165: 1409-1414.

Pennefather JN, Lau WA, Mitchelson F, Ventura S. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. *Journal of autonomic pharmacology* 2000;20: 193-206.

Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *The New England journal of medicine* 2004;351: 1513-1520.

Pham S, Deb S, Ming DS, Adomat H, Hosseini-Beheshti E, Zoubeidi A, Gleave M, Guns ES. Next-generation steroidogenesis inhibitors, dutasteride and abiraterone, attenuate but still do not eliminate androgen biosynthesis in 22RV1 cells in vitro. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2014;144 Pt B: 436-444.

Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12: 1665-1671.

Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer research* 2007;67: 6130-6135.

Potter GA, Barrie SE, Jarman M, Rowlands MG. Novel steroidal inhibitors of human cytochrome P45017 alpha (17 alpha-hydroxylase-C17,20-lyase): potential agents for the treatment of prostatic cancer. *Journal of medicinal chemistry* 1995;38: 2463-2471.

Prajapati A, Gupta S, Mistry B. Prostate stem cells in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer: emerging role and concepts. *BioMed research international* 2013;2013: 107954.

Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nature reviews Cancer* 2003;3: 756-767.

Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *The EMBO journal* 2001;20: 3427-3436.

Rathkopf D, Scher HI. Androgen receptor antagonists in castration-resistant prostate cancer. *Cancer J* 2013;19: 43-49.

Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Current opinion in oncology* 1995;7: 541-546.

Revandkar A, Perciato ML, Toso A, Alajati A, Chen J, Gerber H, Dimitrov M, Rinaldi A, Delaleu N, Pasquini E et al. Inhibition of Notch pathway arrests PTEN-deficient advanced prostate cancer by triggering p27-driven cellular senescence. *Nature communications* 2016;7: 13719.

Richards J, Lim AC, Hay CW, Taylor AE, Wingate A, Nowakowska K, Pezaro C, Carreira S, Goodall J, Arlt W et al. Interactions of abiraterone, eplerenone, and prednisolone with

wild-type and mutant androgen receptor: a rationale for increasing abiraterone exposure or combining with MDV3100. *Cancer research* 2012;72: 2176-2182.

Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *Journal of the National Cancer Institute* 1991;83: 288-291.

Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B, Miele L. Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene* 2008;27: 5124-5131.

Rowlands MG, Barrie SE, Chan F, Houghton J, Jarman M, McCague R, Potter GA. Esters of 3-pyridylacetic acid that combine potent inhibition of 17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase (cytochrome P45017 alpha) with resistance to esterase hydrolysis. *Journal of medicinal chemistry* 1995;38: 4191-4197.

Roy M, Pear WS, Aster JC. The multifaceted role of Notch in cancer. *Current opinion in genetics & development* 2007;17: 52-59.

Royer I, Monsarrat B, Sonnier M, Wright M, Cresteil T. Metabolism of docetaxel by human cytochromes P450: interactions with paclitaxel and other antineoplastic drugs. *Cancer research* 1996;56: 58-65.

Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105: 6392-6397.

Salander H, Johansson D, Tisell LE. The histology of the dorsal, lateral, and medial prostatic lobes in man. *Investigative urology* 1981;18: 479-483.

Salvati M, Frati A, Russo N, Brogna C, Piccirilli M, D'Andrea G, Occhiogrosso G, Pichierri A, Caroli E. Brain metastasis from prostate cancer. Report of 13 cases and critical analysis of the literature. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2005;24: 203-207.

Santagata S, Demichelis F, Riva A, Varambally S, Hofer MD, Kutok JL, Kim R, Tang J, Montie JE, Chinnaiyan AM et al. JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer research* 2004;64: 6854-6857.

Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes & development* 1992;6: 2620-2634.

Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979;277: 665-667.

Scorey N, Fraser SP, Patel P, Pridgeon C, Dallman MJ, Djamgoz MB. Notch signalling and voltage-gated Na⁺ channel activity in human prostate cancer cells: independent modulation of in vitro motility. *Prostate cancer and prostatic diseases* 2006;9: 399-406.

Sethi S, Macoska J, Chen W, Sarkar FH. Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis. *American journal of translational research* 2010;3: 90-99.

Shawber C, Nofziger D, Hsieh JJ, Lindsell C, Bogler O, Hayward D, Weinmaster G. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* 1996;122: 3765-3773.

Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development* 2010;24: 1967-2000.

Shou J, Ross S, Koeppen H, de Sauvage FJ, Gao WQ. Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. *Cancer research* 2001;61: 7291-7297.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. *Cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians* 2014;64: 9-29.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2016. CA: a cancer journal for clinicians* 2016;66: 7-30.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA: a cancer journal for clinicians 2017;67: 7-30.

Sinibaldi VJ. Docetaxel treatment in the elderly patient with hormone refractory prostate cancer. Clinical interventions in aging 2007;2: 555-560.

Soylu H, Acar N, Ozbey O, Unal B, Koksall IT, Bassorgun I, Ciftcioglu A, Ustunel I. Characterization of Notch Signalling Pathway Members in Normal Prostate, Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) and Prostatic Adenocarcinoma. Pathology oncology research : POR 2015.

Su Q, Zhang B, Zhang L, Dang T, Rowley D, Ittmann M, Xin L. Jagged1 upregulation in prostate epithelial cells promotes formation of reactive stroma in the Pten null mouse model for prostate cancer. Oncogene 2017;36: 618-627.

Su Y, Yu L, Liu N, Guo Z, Wang G, Zheng J, Wei M, Wang H, Yang AG, Qin W et al. PSMA specific single chain antibody-mediated targeted knockdown of Notch1 inhibits human prostate cancer cell proliferation and tumor growth. Cancer letters 2013;338: 282-291.

Swanson GP, Thompson IM, Basler J. Current status of lymph node-positive prostate cancer: Incidence and predictors of outcome. Cancer 2006;107: 439-450.

Takao T, Tsujimura A. Prostate stem cells: the niche and cell markers. International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association 2008;15: 289-294.

Timms BG. Prostate development: a historical perspective. Differentiation; research in biological diversity 2008;76: 565-577.

Ting HJ, Hsu J, Bao BY, Lee YF. Docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in androgen independent prostate cancer cells are enhanced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. Cancer letters 2007;247: 122-129.

van Soest RJ, van Royen ME, de Morree ES, Moll JM, Teubel W, Wiemer EA, Mathijssen RH, de Wit R, van Weerden WM. Cross-resistance between taxanes and new hormonal agents abiraterone and enzalutamide may affect drug sequence choices in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur J Cancer* 2013;49: 3821-3830.

Verhagen AP, Ramaekers FC, Aalders TW, Schaafsma HE, Debruyne FM, Schalken JA. Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer. *Cancer research* 1992;52: 6182-6187.

Verweij J, Clavel M, Chevalier B. Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): not simply two of a kind. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 1994;5: 495-505.

Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews Genetics* 2012;13: 227-232.

Wang SC, Lin XL, Wang HY, Qin YJ, Chen L, Li J, Jia JS, Shen HF, Yang S, Xie RY et al. Hes1 triggers epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like cellular marker alterations and promotes invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma by activating the PTEN/AKT pathway. *Oncotarget* 2015;6: 36713-36730.

Wang XD, Leow CC, Zha J, Tang Z, Modrusan Z, Radtke F, Aguet M, de Sauvage FJ, Gao WQ. Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Developmental biology* 2006;290: 66-80.

Wang Z, Banerjee S, Li Y, Rahman KM, Zhang Y, Sarkar FH. Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells. *Cancer research* 2006;66: 2778-2784.

Wang Z, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Kong D, Wojewoda C, Miele L, Sarkar FH. Down-regulation of Notch-1 is associated with Akt and FoxM1 in inducing cell growth inhibition and apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* 2011;112: 78-88.

Wang Z, Li Y, Banerjee S, Kong D, Ahmad A, Nogueira V, Hay N, Sarkar FH. Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-kappaB signaling pathways. *Journal of cellular biochemistry* 2010;109: 726-736.

Wang Z, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. Exploitation of the Notch signaling pathway as a novel target for cancer therapy. *Anticancer research* 2008;28: 3621-3630.

Wang Z, Zhang Y, Li Y, Banerjee S, Liao J, Sarkar FH. Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 2006;5: 483-493.

Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G. A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* 1991;113: 199-205.

Weiss M, Ahrend H, Grossebrummel H, Ziegler P, Brandenburg LO, Walther R, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB. Cytochrome P450 17A1 Inhibitor Abiraterone Acetate Counteracts the Heat Shock Protein 27's Cell Survival Properties in Prostate Cancer Cells. *Urologia internationalis* 2016;97: 112-117.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306: 269-271.

Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 1985;43: 567-581.

Whelan JT, Kellogg A, Shewchuk BM, Hewan-Lowe K, Bertrand FE. Notch-1 signaling is lost in prostate adenocarcinoma and promotes PTEN gene expression. *Journal of cellular biochemistry* 2009;107: 992-1001.

Wong GW, Knowles GC, Mak TW, Ferrando AA, Zuniga-Pflucker JC. HES1 opposes a PTEN-dependent check on survival, differentiation, and proliferation of TCRbeta-selected mouse thymocytes. *Blood* 2012;120: 1439-1448.

Yin L, Hu Q. CYP17 inhibitors--abiraterone, C17,20-lyase inhibitors and multi-targeting agents. *Nature reviews Urology* 2014;11: 32-42.

Yochem J, Weston K, Greenwald I. The *Caenorhabditis elegans* lin-12 gene encodes a transmembrane protein with overall similarity to *Drosophila* Notch. *Nature* 1988;335: 547-550.

Yong T, Sun A, Henry MD, Meyers S, Davis JN. Down regulation of CSL activity inhibits cell proliferation in prostate and breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* 2011;112: 2340-2351.

Yu Y, Zhang Y, Guan W, Huang T, Kang J, Sheng X, Qi J. Androgen receptor promotes the oncogenic function of overexpressed Jagged1 in prostate cancer by enhancing cyclin B1 expression via Akt phosphorylation. *Molecular cancer research : MCR* 2014;12: 830-842.

Zayzafoon M, Abdulkadir SA, McDonald JM. Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines. *The Journal of biological chemistry* 2004;279: 3662-3670.

Zhang G, Liu X, Li J, Ledet E, Alvarez X, Qi Y, Fu X, Sartor O, Dong Y, Zhang H. Androgen receptor splice variants circumvent AR blockade by microtubule-targeting agents. *Oncotarget* 2015;6: 23358-23371.

Zhang L, Sha J, Yang G, Huang X, Bo J, Huang Y. Activation of Notch pathway is linked with epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells. *Cell Cycle* 2017;16: 999-1007.

Zhang Y, Wang Z, Ahmed F, Banerjee S, Li Y, Sarkar FH. Down-regulation of Jagged-1 induces cell growth inhibition and S phase arrest in prostate cancer cells. *International journal of cancer* 2006;119: 2071-2077.

Zhu H, Zhou X, Redfield S, Lewin J, Miele L. Elevated Jagged-1 and Notch-1 expression in high grade and metastatic prostate cancers. *American journal of translational research* 2013;5: 368-378.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hakan	Uyruğu	TC
Soyadı	SOYLU	Tel no	0535 445 3696
Doğum tarihi	15.09.1985	e-posta	hknsyl85@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Bucak Süper Lisesi	2003
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Burdur Veteriner Fakültesi	2010
Yüksek Lisans		
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2017

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	2011-2013
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2013-Halen devam ediyor

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	75.0

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Sjögren sendrom tanılı hastalarda periferallenfositlerde ve tükürük bezinde Notch sinyalizasyonunun değerlendirilmesi.	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu destekli, Proje no: 2011.01.0103.022	2011 - 2013

Akut Asit Hasarı ile Oluşturulan Sistit Modelinde İntravesikal Hyaluronik Asit Uygulanmasının İnflamatuar Hücreler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu destekli tıpta uzmanlık tezi, Proje No: 2014.04.0103.002	2014-2017
Farelerde erken gebelik boyunca bazı Notch sinyal yolağı üyelerinin ekspresyonuna östrojenin etkisi.	TÜBİTAK 3001 projesi, Proje no: 213S032	2014 - 2016
İnsan Serviks Dokusunda Misoprostol İndüksiyonunun Notch Sinyal Yolağı Reseptör ve Ligand Ekspresyonları Üzerine Etkisinin Araştırılması	TÜBİTAK 3001 projesi, Proje no: 215S942	2016 - 2017
Candida Albicans'a bağlı kateter enfeksiyonunda lipozomal amfoterisin B, kaspofungin, flukonazol, prostoglandin E2 ve prostoglandin E2 antagonisti kullanımının oluşan biyofilm ve Notch proteinlerinin ekspresyonu üzerine etkisi	GLEAD SCIENCES İLAÇ TİÇ. LTD. ŞİRKETİ	2016 - DEVAM EDİYER

İn Vitro Koşullarda Dosetaksel ve Abirateron Asetat Uygulamasının İnsan Prostat Kanseri Hücrelerindeki Notch1 Jagged1 ve Hes1 Ekspresyonlarına Etkisinin İncelenmesi	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu destekli doktora tezi, Proje No: TDK-2016-1395	2016 -2017
---	---	------------

Burslar-Ödüller:

Yayımlar:

Çakır T., Aslaner A., Tekeli S., Avcı S., Doğan U., Tekeli F., **Soylu H.**, Akyüz C., Koç S., Üstünel İ., "Effect of ozone on colon anastomoses in rat peritonitis model.", ACTA CIRURGICA BRASILEIRA, vol.31, pp.111-118, 2016

Aslaner A., Cakir T., Tekeli S.O., Avcı S., Dogan U., Tekeli F., **Soylu H.**, Akyüz C., Koç S., Üstünel İ., "Medical ozone treatment ameliorates the acute distal colitis in rats", ACTA CIRURGICA BRASILEIRA, vol.31, pp.256-263, 2016

Soylu H., Acar N., Özbey Ünlü Ö., Ünal B., Köksal İ.T., Başsorgun C.İ., et al., "Characterization of Notch Signalling Pathway Members in Normal Prostate, Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) and Prostatic Adenocarcinoma", PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH, vol.22, pp.87-94, 2015

Üstünel İ., Acar N., Gemici B., Özbey Ö., Edizer I., **Soylu H.**, et al., "The effects of water immersion and restraint stress on the expressions of apelin, apelin receptor (APJR) and apoptosis rate in the rat heart", ACTA HISTOCHEMICA, vol.116, pp.675-681, 2014

Acar N., **Soylu H.**, Edizer İ., Özbey Ünlü Ö., Er H., Akkoyunlu G., et al., "Expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and peroxiredoxin 6 (Prdx6) proteins in healthy and pathologic placentas of human and rat", ACTA HISTOCHEMICA, vol.116, pp.1289-1300, 2014

Bildiriler:

Acar Aydemir N., **Soylu H.**, Avcı S. , Üstünel İ., "Expression of HEY2 on mice uterus and implantation sites during different pregnancy days.", 7th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2017), Kuala Lumpur, MALEZYA, 30 Mart - 2 Nisan 2017, pp.52-52

Acar N., **Soylu H.**, Avcı S., Üstünel İ., "Fbxw7 Expression During Mice Pregnancy-A Marker For Receptivity? ", The 3rd Biomarker Meeting in Personalized Reproductive Medicine, Valencia, İSPANYA, 7-9 Nisan 2016, pp.1-1

Acar N., Üstünel İ., **Soylu H.**, Özbey Ö., Edizer İ., "The Expressions Of Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 (Nrf2) And Peroxiredoxin 6 (Prdx6) Proteins In Normal And Pathologic Rat And Human Placentas", International-Federation-of-Placenta-Associations (IFPA)/EPG Meeting, PARİS, FRANSA, 9-12 Eylül 2014, vol.35, no.9, pp.A43-A43

Hakan Soylu, Mustafa Kırça, Sema Avcı, Leyla Kılınç, Özlem Özbey Ünlü, Nuray Acar, Akın Yeşilkaya, İsmail Üstünel, Effects of Abirateron Acetate and Docetaxel Therapy on Notch1, Jagged1 and Hes1 Expressions in Human Prostate Cancer Cell Lines, 15 th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Lara, ANTALYA, 18-21 Mayıs 2017, 10.5505/2017ichc.PP-134

İlker Fatih Şahiner, **Hakan Soylu**, Sema Avcı, Leyla Kılınç, Ahmet Danışman, Özlem Özbey, Nuray Acar, İsmail Üstünel, The effect of intravesicale hyaluronic acid application on distribution of CD3, CD4, CD19, CD56 and IL-6 immunopositive cells in the experimental model of interstitial cystitis in mouse bladder, 15 th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Lara, ANTALYA, 18-21 Mayıs 2017, 10.5505/2017ichc.PP-267

Leyla Kılınç, Sema Avcı, **Hakan Soylu**, Tuğrul Çakır, Arif Aslaner, İsmail Üstünel, Effect of ozone on apelin and APJ expressions in rats peritonitis-constituted with colon anastomosis, 15 th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Lara, ANTALYA, 18-21 Mayıs 2017, 10.5505/2017ichc.PP-257

Sema Avcı, İlknur Birsen, Ayşe Özkan, Hande Parlak, **Hakan Soylu**, Leyla Kılınc, Aysel Açar, V. Nimet İzgut Uysal, İsmail Üstünel, The Effect of Docosahexaenoic Acid on TNF- α Level and Mast Cell Number in the Stomach of Mice in 1-Methyl-4-Phenyl-1.2.3.6.-Tetrahydropyridine-induced Parkinson's Disease, 15 th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Lara, ANTALYA, 18-21 Mayıs 2017, 10.5505/2017ichc.PP-212

Uysal V.N., Acar N., Birsen İ. , Özcan F., Özbey Ünlü Ö., **Soylu H.**, et al., "The Effect of Apelin on the Expression of Atrial Natriuretic Peptide in Cardiac Tissue", 42. Ulusal Fizioloji Kongresi, DÜZCE, TÜRKİYE, 5-8 Eylül 2016, ss.26-26 (Link)

Acar N., **Soylu H.**, Avcı S., Üstünel İ., "Gebeliğin farklı günleri boyunca fare uterus ve implantasyon bölgelerinde Hey2 ve Fbw7 ekspresyonları. ", Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 30 Nisan - 3 Mayıs 2016, ss.281-282

Soylu H., Avcı S., Acar N., Özbey Ünlü Ö., Köksal, İ.T. , Ünal B., et al., "Normal, Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PİN) ve Malignant Prostat Dokularında Notch Sinyal Yolağı Üyelerinin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonlarının Belirlenmesi.", Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 30 Nisan - 3 Mayıs 2016, ss.508-510

Avcı S., Avcı A., **Soylu H.**, Acar N., Özbey Ünlü Ö., Kahraman M., "Sjögren Sendromu Tanılı Hastalarda, Tükrük Bezinde Mast Hücreleri ve Notch Sinyalizasyonu İlişkinin Araştırılması", Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 30 Nisan - 3 Mayıs 2016, ss.128-129

Edizer I., Avcı S., **Soylu H.**, Acar N., Özbey Ünlü Ö., Üstünel İ., "Farelerde implantasyon sürecinde NICD1, HEY1 ve HES5 proteinlerinin immünolokalizasyonlarının belirlenmesi", 5. Üreme Tıbbı ve Cerrahisi Derneği Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 28-31 Ekim 2015, ss.188-188

Soylu H., Ünal B., Acar N., Özbey Ünlü Ö., Köksal İ.T., Başsorgun C.İ., et al., "Notch sinyal yolağı elemanlarının normal prostat, prostatik intraepitelyal neoplazi ve prostatik

adenokarsinomda immunlokalizasyon ve ekspresyon analizi", 25. Ulusal Patoloji Kongresi, BURSA, TÜRKİYE, 14-17 Ekim 2015, ss.---

Özbey Ünlü Ö., Acar N., Edizer I., **Soylu H.**, Balkarli H., Söyüncü Y., et al., "Overektomize sıçan eklem kıkırdağında Notch-1, Delta, HES-1 ve HES-5 ekspresyonları üzerine alendronate sodium uygulamasının etkisi.", 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı) , MERSİN, TÜRKİYE, 28-31 Mayıs 2013, ss.145-145

Üstünel İ., Acar N., Gemici B., Özbey Ünlü Ö., Edizer I., **Soylu H.**, et al., "Sıçan kalp dokusunda apelin ekspresyonu, proliferasyon ve apoptoz üzerine suya batırma ve hareketsizlik stresinin etkisi.", 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı) , MERSİN, TÜRKİYE, 28-31 Mayıs 2013, ss.124-124

Soylu H., Gemici B., Özmen A., Edizer I., Ozbey O., Izgut-Uysal V.N., et al., "The expressions of peroxiredoxin 6 (PRDX6) and nuclear factor like 2 (NRF2) proteins in normal and intra-uterin growth restricted (IUGR) rat placentas", 21. ulusal elektron mikroskopi kongresi, MERSİN, TÜRKİYE, 28-31 Mayıs 2013, ss.113-113

Acar N., Gemici B., Ozbey O., Edizer I., **Soylu H.**, Üstünel İ., et al., "The expressions of nuclear factor like 2 (NRF2) and peroxiredoxin 6 (PRDX6) in normal, intra-uterin growth restricted (IUGR) and preeclamptic human term placentas", 21. ulusal elektron mikroskopi kongresi, MERSİN, TÜRKİYE, 28-31 Mayıs 2013, ss.141-141

Edizer I., Acar N., Gemici B., Özbey Ünlü Ö., **Soylu H.**, Bülbül M., et al., "Sıçan testisinde hareketsizlik stresi apelin ekspresyonunu, proliferasyonunu ve apoptozu etkiler mi? ", 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı), MERSİN, TÜRKİYE, 28-31 Mayıs 2013, ss.122-122