



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



SODYUM BÜTİRAT VE CELASTROL KOMBİNASYONUNUN GLİOBLASTOMADAKİ TERAPÖTİK ETKİSİ

Bahar KARTAL

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR

VAN-2021

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SODYUM BÜTİRAT VE CELASTROL KOMBİNASYONUNUN
GLİOBLASTOMADAKİ TERAPÖTİK ETKİSİ**

Bahar KARTAL
TIBBİ BİYOLJİ ANABİLİM DALI
(TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR

VAN-2021

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2019-8139 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Bahar KARTAL tarafından hazırlanan “*Sodyum Bütirat ve Celastrol Kombinasyonunun Glioblastomadaki Terapötik Etkisi*” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: .../.../.....

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Üyesi

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Sodyum Bütirat ve Celestrol Kombinasyonunun Glioblastomadaki Terapötik Etkisi*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Bahar KARTAL

Tarih:.././2019

İmza:

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince ve tez çalışmamda yardımlarıyla, desteğiyle ve problemlerin çözümünde yol göstericiliğiyle her zaman yanımda olan tez danışmanım Doç.Dr. Mehmet TAŞPINAR'a, akım sitometri analizlerini yapan Öğr. Gör. Dr. Hande CANPINAR'a, tezin istatistiksel analizlerini yapan Dr. Öğr. Üyesi Can ATEŐ'e, MTT deneylerinde benden desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK'e ve Dr. Öğr. Üyesi Sedat ÇETİN'e Dr. Öğr. Üyesi Ayőe USTA'ya, tez süresince destekleriyle her zaman yanımda olan Doç.Dr. Nurettin MENGEŐ'e, Ar. Gör. Filiz TAŞPINAR'a, Farika Nur DENİZLER EBİRİ'ye Mustafa GÜVEN'e ve Recep ASLAN'a en içten duygularımla teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Eğitimimin her aşamasında sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla bana destek olan sevgili aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

KARTAL B, Sodyum Bütirat ve Celestrol Kombinasyonunun Glioblastomadaki Terapötik Etkisi, Glioblastoma (GB) merkezi sinir sistemi tümörleri arasında en ölümcül ve en invaziv beyin tümörüdür. GB'nin küratif bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Histon deasetilaz inhibitörlerinin kanser tedavi protokollerinde kullanılabilirliğine ilişkin çalışmalar, bu inhibitörlerin hücre proliferasyon inhibisyonu ve apoptoz gibi antikanser etkileri nedeniyle konu ile ilgili çalışmalar artmaktadır. Hüresel proteozomal inhibisyon, antianjiogenez, antimetastaz, antienflamatuar gibi kanserin yaşam dinamiklerini hedef alan önemli bir mekanizmadır ve GB'de yeni tedavi yaklaşımlarından biri olma potansiyeline sahiptir. Kanser tedavilerinde ve özellikle GB'de alkilasyon ajanlarına karşı gelişen kemoterapötik dirençte apoptozis, otofaji ve DNA tamir enzimlerinin rolü büyüktür. Bu nedenle, bu tez çalışmasında histon deasetilaz inhibitörü Sodyum Bütirat (SB) ile bir proteazom inhibitörü olan Celestrol'un GB hücrelerinde ki terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. SB ve Celestrol'un GB hücreleri LN-405 ve T98G'deki sitotoksiteleri MTT ile belirlenmiştir. Apoptozis, otofaji ve DNA tamir genlerinin (MGMT, MLH1, MSH2 ve MSH6) ekspresyonları RT-PZR ile saptanmıştır. SB ve Celestrol'un hücre döngüsüne etkisi akım sitometri ile belirlenmiştir. SB ve Celestrol'un GB hücreleri üzerindeki etkisi birbirinden farklılık göstermektedir. SB, Celestrol ve SB ile Celestrol'un birlikte kullanımının LN-405'te Kaspaz 9 üzerinden hücreleri apoptoza sürüklemiştir. Ancak T98G'de belirgin bir apoptoz saptanmamıştır. Her iki hücrede Atg6 ekspresyon değişimi anlamlı değildir ($p>0.05$). Her iki molekülde SubG1'deki hücre birikimi açısından LN-405'te ve T98G'de anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.002$; $p<0.001$, sırasıyla). SB ve Celestrol tamir genlerinin ekspresyonlarını hücrelerde farklı düzeylerde azaltmıştır. Sonuçlarımız, SB ve Celestrol'un hücre tipine göre farklı etki gösterebileceğini ve tamir genlerinin ekspresyonlarını azaltıp hücreleri apoptozun indüklenmesini sağlayabileceğini göstermiştir. Bu çalışma, GB'deki alkilasyon ajanlarına karşı gelişen kemoterapötik dirençte SB ve Celestrol'un terapötik etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma, Sodyum Bütirat, Celestrol

ABSTRACT

KARTAL B, The Therapeutic Effect of Sodium Butyrate and Celastrol Combination in Glioblastoma, University of Van Yuzuncu Yil, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, M.Sc. Thesis, Van, 2019. Glioblastoma (GB) is the deadliest and most invasive brain tumor among central nervous system tumors. GB does not have a curative treatment protocol. Studies on the use of histone deacetylase inhibitors in cancer treatment protocols are increasing due to their anticancer effects such as cell proliferation inhibition and apoptosis. Proteasomal inhibition in the cell is an important mechanism targeting the life dynamics of cancer such as antiangiogenesis, antimetastasis, and anti-inflammatory and has the potential to be one of the new treatment approaches in GB. In cancer therapies and specifically developing chemotherapeutic resistance against alkylating agents in GB, apoptosis, autophagy, and DNA repair enzymes play an important role. Therefore, it was aimed to investigate the therapeutic effect of histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate (SB) and a proteasome inhibitor, Celastrol, on GB cells in this thesis study. Cytotoxicity of SB and Celastrol in GB cells LN-405 and T98G was determined by MTT. Expressions of apoptosis, autophagy and DNA repair genes (MGMT, MLH1, MSH2 and MSH6) were determined by RT-PCR. The effect of SB and Celastrol on the cell cycle was determined by flow cytometry. The cellular effects of SB and Celastrol on GB cells differ from each other. SB, Celastrol, and their combination induced apoptosis in LN-405 via caspase 9. However, no prominent apoptosis was detected in T98G. The changing level of Atg6 expression in both cells was not significant ($p > 0.05$). A significant difference was found in LN-405 and T98G in terms of cell accumulation in Sub G1 in both molecules ($p = 0.002$; $p < 0.001$, respectively). SB and Celastrol decreased the expression of repair genes at different levels in cells. Our results have shown that SB and Celastrol can show different effects according to cell type and reduce the expression of repair genes and induce apoptosis in cells. This study is the first study investigating the therapeutic effect of SB and Celastrol on chemotherapeutic resistance against alkylation agents in GB.

Keywords: Glioblastoma, Sodium butyrate, Celastrol

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
TABLOLAR LİSTESİ.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sinir Sistemi ve Hücreleri	3
2.1.1. Periferik sinir sistemi	4
2.1.2. Merkezi sinir sistemi	4
2.2. Sinir Sistemi Tümörleri.....	5
2.3. Glioblastoma	8
2.3.1. Glioblastoma genetiği	9
2.3.2. Glioblastoma epigenetiği	10
2.4. Histon Deasetilaz Enzim Ailesi.....	12
2.5. Histon Deasetilaz İnhibitörleri	13
2.5.1. Sodyum bütirat	16
2.6. Celastrol	17

3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Gereç	20
3.1.1. Kullanılan hücre serileri	20
3.1.2. Hücre kültürü	21
3.1.3. 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid sitotoksisite testi.....	22
3.1.4. Total RNA izolasyonu.....	23
3.1.5. cDNA sentezi	23
3.1.6. Agaroz jel elektroforezi.....	24
3.1.7. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR).....	25
3.1.8. Akım (Flow) sitometri.....	25
3.1.9. Çalışmada kullanılan alet/makineler	26
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Hücre kültürü	28
3.2.2. Sitotoksisite testi	28
3.2.3. RNA izolasyonu	30
3.2.4. cDNA (Complementer DNA) sentezi	32
3.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-PZR; RT-PZR).....	33
3.2.6. Agaroz jel elektroforezi	34
3.2.7. Akım (Flow) sitometri.....	35
3.2.8. İstatistiksel analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. SB ve Celastrol'un GB Hücreleri Üzerindeki Sitotoksisitesi.....	37

4.2. Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR) ile Gen Ekspresyon Analizi	39
4.2.1. Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyonu	40
4.2.2. Atg6 gen ekspresyonu	41
4.2.3. MGMT Gen ekspresyon değişimi	42
4.2.4. MLH1, MSH2 ve MSH6 genlerinin ekspresyon değişimi	43
4.3. Akım Sitometri Analizi	45
5. TARTIşMA VE SONUÇ	49
5.1. SB ve Celastrol Sitotoksitesisi	49
5.2. SB ve Celastrol'ün Apoptoz, Otofaji ve Hücre Döngüsüne Etkisi	52
5.3. SB ve Celastrol'ün DNA Tamir Genlerinin Ekspresyonuna Etkisi	55
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİş	67
EKLER	68
EK1. Çalışma Onay Belgesi	68
EK2. Tez Orjinallik Raporu	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATPaz	: Adenozin 3'-Trifosfat Enzimi
ATRX	: ATP'ye Bağlı Helikaz
Bax	: Tümör Baskılayıcı Protein
CBTRUS	: Amerika Birleşik Devletleri Merkezi Beyin Tümörü Kaydı
CHR	: Kromozom
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
CpG	: Sitozin Fosfat Guanin
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FDA	: Amerikan Gıda Ve İlaç Dairesi
GB	: Glioblastoma
GCIMP	: Glioma CpG Ada Metilatör Fenotipi
HAT	: Histon Asetil Transferazlar
HDAC	: Histon Deasetilaz Enzim
HDACi	: Histon Deasetilaz Enzim İnhibitörü
HIF-1α	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör
HSP90	: Isı Şoku Proteini 90
H3	: Histon 3
IDH	: İzositrat Dehidrogenaz
IKK	: İKB kinaz
IL-6	: İnterlökin 6

MGMT	: O6-Metilguanin-DNA Metil Transferaz
MPSST	: Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri
Nf-Kb	: Nükleer faktör-kappa B
PD-L1	: Programlanmış Ölüm Ligand 1
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SB	: Sodyum Bütirat
TERT	: Telomeraz Ters Transkriptaz
TMZ	: Temozolomid
TP53	: Tümör Baskılayıcı Gen 53
Tertp	: Telomeraz Ters Transkriptaz Promotor
Ub	: Ubikuitin
UPR	: Katlanmamış Protein Yanıtı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Sinir sistemi sınıflandırılması	3
Şekil 2. Sodyum bütiratın kimyasal yapısı.....	16
Şekil 3. Celastrol'ün moleküler yapısı	18
Şekil 4. Celastrol'ün etkilediği hücre içi yollar.....	19
Şekil 5. Elde edilen total RNA'nın %1'lik agaroz jel görüntüsü.	32
Şekil 6. Sodyum Bütiratın LN-405 ve T98G hücre serileri üzerindeki sitotoksitesi	38
Şekil 7. Celastrol'ün LN-405 ve T98G hücre serileri üzerindeki sitotoksitesi	39
Şekil 8. LN-405 hücre serisinde Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişimleri	40
Şekil 9. T98G hücre serisinde Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişimleri	41
Şekil 10. LN405 ve T98G hücre serilerinde Atg6 gen ekspresyon değişimleri.....	42
Şekil 11. LN405 ve T98G hücre serilerinde MGMT gen ekspresyon değişimleri .	43
Şekil 12. LN405 ve T98G hücre serilerinde MLH1, MSH2 ve MSH6 gen ekspresyon değişimleri	44
Şekil 13. LN-405 hücre serisine ait akım sitometri histogramı.....	46
Şekil 14. T98G hücre serisine ait akım sitometri histogramı.....	47
Şekil 15. SB ve Celastrol'ün hücre döngüsü etkilerinin yüzde gösterimi.....	48

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Merkezi sinir sisitemi sınıflandırması	6
Tablo 2. Glioma sınıflandırması	7
Tablo 3. Gliomanın majör genetik ve epigenetik alt grupları.....	11
Tablo 4. Histon deasetilaz enzim inhibitörleri.....	14
Tablo 5. HDAC inhibitörlerinin temel etkileri.. ..	15
Tablo 6. Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre serileri.	20
Tablo 7. Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler.	21
Tablo 8. MTT testinde kullanılan gereçler.....	22
Tablo 9. Total RNA izolasyonunda kullanılan malzemeler	23
Tablo 10. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler	24
Tablo 11. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler	24
Tablo 12. RT-PZR’da kullanılan malzemeler.....	25
Tablo 13. Akım sitometri deneyinde kullanılan malzemeler.....	26
Tablo 14. Tez kapsamında kullanılan genel alet/makineler.	27
Tablo 15. cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri.	33
Tablo 16. RT-PZR için reaksiyon içeriği.....	34
Tablo 17. RT-PZR ile ekspresyon seviyeleri belirlenen genlerin primer dizileri... 34	
Tablo 18. SB ve Celastrol’ün GB hücre serilerindeki IC ₅₀ değerleri (72.saat).....	37
Tablo 19. LN-405 ve T98G hücrelerinde SB’nin ve Celastrol’ün hücre döngüsüne etkisi	48

1. GİRİŞ

Glioblastoma (GB), merkezi sinir sistemi tümörlerinden astrositik kökenli en ölümcül beyin tümörü olarak bilinmektedir (Taal ve ark., 2015). GB tanısı alan hastalarda kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi rezeksiyon (Clarke ve ark., 2010) ile birlikte hayatta kalma süresinin 14.6 ay olduğu bilinmektedir (Stupp ve ark., 2005). GB'nin genetik ve epigenetik alt yapısının anlaşılmasının karsinogenez sürecinin aydınlatılması ve tümör tiplerinin tanımlanıp yeni tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde büyük önem taşıdığı düşünülmektedir. Ancak GB tiplerinin oluşum mekanizmalarındaki farklılık (Li ve ark., 2016) ve GB'nin genetik heterojenitesinin yüksek oluşu GB için standart bir tedavi yaklaşımının belirlenmesini güçleştirmektedir. Ayrıca GB'de genetik faktörlerin yanı sıra epigenetik faktörler tanıdan tedaviye önemli rol oynamaktadır (Gusyatiner ve Hegi., 2018).

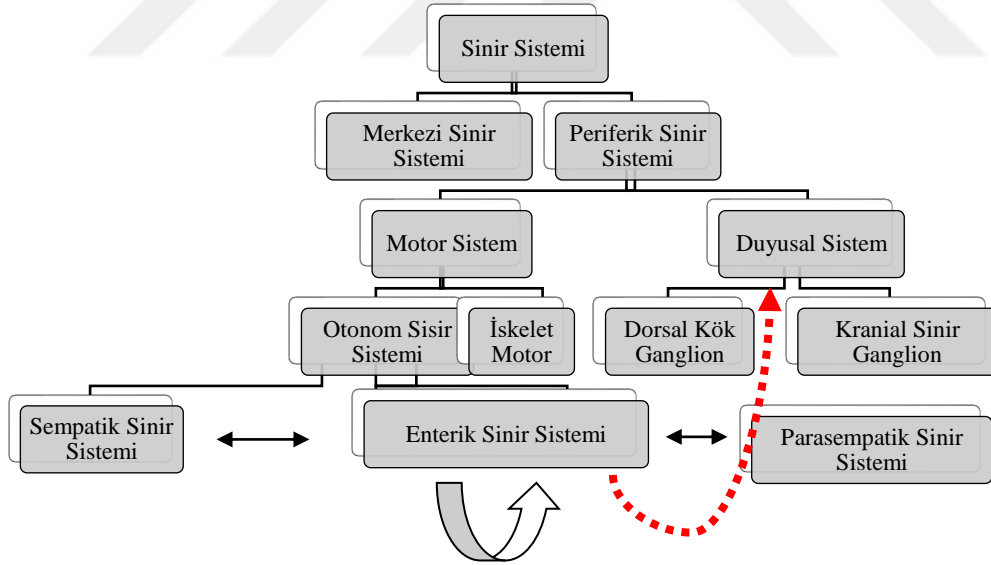
Epigenetik modifikasyonlar spesifik enzim kompleksleri tarafından katalize edildiği için terapötik olarak değerlendirilme potansiyelleri vardır (Williams ve ark., 2017). Epigenetik modifikasyonlardan histon deasetilasyonu, hücre genomunun kromatin yapısının yeniden düzenlenmesinde, hücre için hayati genlerin ekspresyonunda ve tümör formasyonu dinamiğinin korunmasında önemlidir. Histon deasetilasyonunun inhibisyonu geliştirilmeye çalışılan kanser tedavi protokollerinden biridir. Bu amaçla geliştirilen histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) kanser tedavi çalışmalarında kullanılmaktadır. Sodyum Bütirat (SB) bu HDACi moleküllerinden biridir. SB'nin DNA'yı modifiye eden histon deasetilazlardan sınıf 1 ve 2 yi inhibe ettiği ve kan beyin bariyerini geçtiği rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2015). SB'nin kan beyin bariyerini geçebilmesi GB tedavisinde kullanımı adına büyük önem taşımaktadır. Çünkü çoğu HDACi'ler kan beyin bariyerini geçemediği için GB tedavisinde kullanılamamaktadır. SB ile tümör baskılayıcı genler üzerinden ölüm yollarının aktivasyonu önemli ve sürdürülebilir tedavi potansiyellerinden biridir.

Kanser hücrelerinde diğerk bir tedavi yaklaşımı protezomal stabiliteyi hedef alan moleküllerin geliştirilmesidir. Proteozom aktivitesi hücrede apoptoz ve onkojenik transformasyon gibi birçok işlemlerin kontrol edilmesinde rol aldığı bilinmektedir (Dou ve Li, 1999). Celastrol, *Tripterygium Wilfordii* bitkisinden elde edilen bir proteozom inhibitörüdür. Celastrol'ün diğerk antikanser ilaçlarla birlikte kullanıldığında radyoterapinin etkilerini güçlendirdiğı gösterilmiştir (Dai ve ark., 2009). Bu aktivitelere dahil olan ve Celastrol'den etkilenen ana hücreyel süreçler; hücreyel proliferasyonun inhibisyonu, apoptozun indüklenmesi, malign doku istilasının önlenmesi ve anjiyogenez blokajı olduğı rapor edilmiştir (Gubta ve ark., 2010; Kannaiyan ve ark., 2011; Li-Weber, 2013). Celastrol'ün birçok araştırmada invazyon ve anjiogenez inhibisyonu gibi mekanizmalar üzerinden antikanser etkilere sahip olduğı rapor edilmiştir. Ancak literatürde kanser hücreleri üzerinde SB ile Celastrol'ün birlikte kullanımına ilişkin herhangi bir veri bulunmamaktadır. HDACi olarak Sodyum Bütirat ve protezomal inhibitör olarak Celastrol'ün birlikte kullanımı kanser tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemli bir model olabilir. Çünkü, SB ile tümör basklayıcı genlerin olası aktivasyonu, Celastrol ile de protezomal inhibisyon ile ubikutinlenmiş proteinlerin birikmesi ve hücrenin strese sürüklenmesi GB'de yeni bir tedavi modalitesi olma potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında GB hücreleri üzerinde SB ile Celastrol'ün birlikte kullanımının olası terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi ve Hücreleri

Sinir sistemi merkezi sinir sistemi [Central Nervous System, (MSS)], ve periferik sinir sisteminden [Peripheral Nervous System, (PSS)] oluşmaktadır (Rao ve Gershon, 2016). Sinir sisteminde yer alan hücreler norön (~%10) ve glia (~%90) hücreleridir. Glia hücreleri merkezi sinir sisteminde ve periferik sinir sisteminde bulunmaktadır. Periferik sinir sisteminde bulunan glial hücreler schwann hücreleri olarak isimlendirilmektedir. Merkezi sinir sisteminde bulunan glial hücreler farklı köken ve fonksiyon içeren makroglia (~%85-90) ve mikroglia (~%10-15) hücreleri olarak ayrılmaktadır. Makroglia hücreleri de farklı morfolji ve fonksiyonlarına göre astrositler (~%80), oligodentrositler (~%10) ve ependimal hücreler (~%5) olarak sınıflandırılmaktadır (Verkhatsky ve Butt, 2007).



Şekil 1. Sinir sistemi sınıflandırılması (Rao ve Gershon, 2016).

2.1.1. Periferik sinir sistemi

Memeli PSS vücutta yüksek hızda elektrik sinyalleri (aksiyon potansiyelleri) ileten elektrik kablolarına benzetilebilir. PSS birbirine bağımlı iki hücre tipinden oluşur: Bu hücreler nöron ve glia olarak bilinmektedir. PSS'deki glia hücreleri Schwann hücreleri olarak bilinmektedir (Grigoryan ve Birchmeier, 2015).

PSS'deki nöron ve schwann hücreleri arasındaki iletişimin sağlıklı olması homeostazi için kritik öneme sahiptir (Grigoryan ve Birchmeier, 2015). PSS'deki nöronların schwann hücre fonksiyonlarını kontrol etmek için gerekli sinyalleri sağladığı bilinmektedir (Grigoryan ve Birchmeier, 2015). PSS'de bulunan schwann hücrelerinin miyelin oluşturmak, nöronal sağkalımı arttırmak ve aksiyon potansiyellerinin verimli bir şekilde aktarılmasını sağlamak gibi görevleri olduğu bilinmektedir (Grigoryan ve Birchmeier, 2015).

2.1.2. Merkezi sinir sistemi

Beyin ve omurilikten oluşan MSS çeşitli tiplerde hücreleri içermektedir. Bu hücre tipleri; nöronlar, glial hücreler (astroitler, oligodendrositler, ependimal hücreler ve mikroglia), koroid pleksus hücreler ve kan damarları ile ilgili hücreler olarak bilinmektedir (Kovacs, 2017).

Oligodendrositler, miyelin üretimi yaparak aksonların mielinle kaplanmasından sorumludur (Hornig ve ark. 2013).

MSS'nin makrofajı olarak bilinen mikroglia hücreleri MSS hücrelerinin %5-10'nunu oluşturmaktadır (Frost, Schafer, 2016). Mikroglialar, mezodermal mezenkimal çevreden göç eden pregenitörlerden köken almaktadırlar (Kettenmann ve ark., 2011). Mikroglialar direkt olarak nöronlar, astroitler ve kan damarlarıyla iletişim kurarak enflamatuar fonksiyonlar gerçekleştirip hücrede ki hasara veya enfeksiyona hücrenin hızlı

bir şekilde tepki vermesini sağlamaktadır. Mikroglia hücreler, parankimal yaralanma, dejenerasyon veya enfeksiyonlar sonucu oluşan spesifik faktörlere genetik programlama üzerinden hızlıca cevap verir ve MSS hasarını tamir etmek için morfolojik değişimlere uğrar (Nayak ve ark., 2014).

MSS'deki nöronlar hücreler arası ve hücre içi bilgi taşıyan hücre tipidir (Kovacs 2017). Bilgi taşınmasına yardımcı olan yapılar akson, dentrit ve sinapslardır (Kovacs 2017). Nöronlar uzun mesafelerde sinyalleri aksonlar üzerinden iletir (Kovacs 2017).

MSS'deki glial hücreler, sinir sisteminin gelişiminde, fonksiyonunda ve plastisitesinde kritik rol oynarlar (Rao ve ark., 2015). Glial hücrelerin sinaps oluşumunu, fonksiyonunu ve kan akışını kontrol ettiği rapor edilmiştir (Barres ve ark., 2008). MSS'deki glial hücrelerin farklı morfolojilerde farklı fonksiyonları yerine getirmek amacıyla çeşitli tipleri olduğu bilinmektedir (Kovacs, 2017). Glial hücre türleri astrositler, oligodentrositler ve mikroglialar olarak isimlendirilir (Domingues ve ark., 2004). Astrositlerin sinaptik transmisyonda rol aldığı da bilinmektedir (Croft ve ark., 2015).

2.2. Sinir Sistemi Tümörleri

Malign periferik sinir kılıfı tümörleri [Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor, (MPSSST)], ektomezankimal kaynaklı yumuşak doku sarkomlarının nadir görülen bir çeşididir (Farid ve ark., 2014). MPSSST schwann hücrelerinden veya sinir kreti kaynaklı pluripotent hücrelerinden türetilir (Baehring ve ark., 2003). Dünya Sağlık Örgütü [World Health Organization, (DSÖ)] 2016'da merkezi sinir sistemi tümörlerini genel olarak alt başlıkları olan toplamda 17 temel başlıklı isimlendirmeye Tablo 1'deki gibi sınıflandırmıştır. (Louis ve ark., 2016).

Tablo 1. Merkezi sinir sistemi sınıflandırması (Louis ve ark., 2016).

Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri
Yaygın Astrositik Ve Oligodendroglial Tümörler
Diğer Astrositik Tümörler
Ependimal Tümörler
Diğer Gliomalar
Koroid Pleksus Tümörleri
Nöronal ve Karışık Nöronal-Glial Tümörler
Pineal Bölge Tümörleri
Embriyonel Tümörler
Kranial ve Paraspinal Sinirlerin Tümörleri
Menenjiomalar
Mezenkimal, Meningeal Dışı Tümörler
Melanositik Tümörler
Lenfomalar
Histiyositik Tümörler
Germ Hücreli Tümörler
Sellar Bölge Tümörleri
Metastatik Tümörler

Beyinde ve MSS’de ortaya çıkan tüm beyin tümörlerinin en yüksek yüzdesi , beyin korteksini çevreleyen üç koruyucu doku katmanından oluşan bir yapı olan menenjieller (Ostrom ve ark., 2017)’de meydana gelen iyi huylu büyümeler olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, çoğu malign primer beyin tümörü, beyin korteksinde görülmektedir (Ostrom ve ark., 2017).

Primer beyin tümörleri, MSS içindeki hücrelerden kaynaklanan heterojen bir tümör grubuna karşılık gelir. Primer beyin tümörü olan Gliomalar, glial veya prekürsör hücrelerden kaynaklanan nöroektodermal kökenli tümörlerdir (Ostrom ve ark., 2017).

Beyindeki bir glial hücreden veya glial-progenitör hücreden türetilen tümör, glioma tümör olarak adlandırılmaktadır (Baker ve McKinnon, 2004).

Gliomalar, tüm birincil beyin tümörlerinin % 30'unu oluşturur (Villa ve ark., 2018). DSÖ sınıflandırmasına göre gliomalar üç ana alt gruba ayrılır. Gliomaların alt grupları astrositomlar, oligodendrogliomalar ve karışık oligoastrositomalar olarak gösterilmiştir (Klink ve ark., 2011). Glioma insidansı Amerika Birleşik Devletleri'nde 100.000 kişide 3.19 olarak bildirilmektedir (Sancar, 2019).

Astım, egzama ve saman nezlesi gibi alerjik bozukluklar glioma riskinin azalması ile ilişkilendirilmiştir (Linos ve ark., 2007)

Tablo 2. Glioma sınıflandırması (Taal ve ark., 2015)

EVRE TİP	EVRE	EVRE II	EVRE III	EVRE IV
	SINIRLI	DAĞINIK		
		DÜŞÜK EVRE	YÜKSEK EVRE	
Astrositoma	Pilositik astrositoma	Düşük dereceli astrositoma	Anaplastik astrositoma	Glioblastoma
Oligodendroglioma		Düşük dereceli oligodendroglioma	Anaplastik oligodendroglioma	
Astro-oligodendroglioma		Düşük dereceli oligo-astrositoma	Anaplastik oligo-astrositoma	

Gliomalar malign beyin tümörlerinin % 75'ini oluşturur ve malign beyin tümörlerinin yarısından fazlasını GB oluşturmaktadır (Ostrom ve ark., 2017). Glioma

tümörleri sınıflandırmasında astrositik kökenli tümörleri arasında (Taal ve ark., 2015) en kötü huylu tümörü olan glioblastoma bu tez çalışmasının konusunu oluşturmaktadır.

2.3. Glioblastoma

GB, DSÖ tarafından evre IV astrositom olarak sınıflandırılmıştır. Klinik olarak bu tümörlerin terapötik direnç, anjiyogenezin teşviki, immün modülasyon ve normal beyin dokusunu istila etme eğilimi gibi özellikler gösterdiği rapor edilmiştir (Dixit ve ark., 2017).

Amerika Birleşik Devletleri'nde gliomaların % 54'ünü ve primer beyin tümörlerinin %16'sını oluşturan (Sancar, 2019) Glioblastoma, Amerika Birleşik Devletleri Merkezi Beyin Tümörü Kaydı [Central Brain Tumor Registry of the United States, (CBTRUS)] raporuna göre 2007-2011 yılları arasında amerikadaki tüm primer beyin tümörlerinin % 15.4'ünü ve primer malign beyin tümörlerinin % 45.6'sını oluşturduğu rapor edilmiştir (Ostrom ve ark., 2014).

GB'nin görülme oranının Asyalılar, Latinler ve Beyazlar dahil diğer etnik gruplarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Iacob ve Dinca, 2009).

GB görülme yaşı ortalama yaş 64'tür (Bush ve ark., 2017). GB'de sağkalım oranı yaklaşık 14.6 aydır (Bayin ve ark., 2014).

GB gelişimine neden olan çevresel faktörler arasında vinil klorür, pestisitler, sigara içimi, petrol rafinerisi ve sentetik kauçuk üretimindeki diğer çevresel etkenlere maruz kalma, gliomaların gelişimi ile dolaylı olarak ilişkilendirilmiştir (Davis, 2016). Cep telefonlarından elektromanyetik alanların, formaldehitin ve iyonlaştırıcı radyasyonun GB'ye yol açtığı kanıtlanmamıştır (Alifieris ve ark., 2015).

GB, multidisipliner bir ekip yaklaşımı ile tedavi edilir (Bush ve ark., 2017). Glioblastomada güncel tedavi yöntemi cerrahi rezeksiyonu sonrası radyoterapi ve kemoterapi uygulamasıdır (Clarke ve ark., 2010).

Tek başına cerrahi rezeksiyon, yaklaşık 6 aylık sağkalımla sonuçlanır. Cerrahi rezeksiyon ile radyoterapinin kombine tedavisinin hastalarda ortalama sağkalımı 12.1 aya kadar uzattığı bilinmektedir. Bu tedavi kombinasyonuna Temozolomid (TMZ)'nin eklenmesi ile sağkalımın 14.6 aya kadar uzadığı gösterilmiştir (Stupp ve ark., 2005).

GB'yı diğer kanserlerden ayıran; Hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu, yaygın sızma, nekroz eğilimi, anjiyogenez, apoptoza karşı yoğun direnç göstermesi ve yaygın genomik kararsızlık gibi özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Furnari ve ark., 2007).

Yukarıda belirtilen genetik ve davranışsal özelliklerden dolayı GB tedavisinde genel olarak tedaviye direnç gelişmektedir. Bu nedenle güncel ve etkin tedavi uygulamalarına ihtiyaç vardır.

2.1.3. Glioblastoma genetiği

Glioblastoma; primer (de novo) GB ve sekonder GB olarak iki gruba ayrılır (Jesionek-Kupnicka ve ark., 2014).

Primer GB'ler glial öncü hücrelerden direkt gelişen ve ilk histopatolojik incelemede glioblastoma tanısı konulan tümörlerdir. Sekonder GB'lerin düşük dereceli yaygın astrositom veya anaplastik astrositomlardan geliştiği rapor edilmiştir (Ohgaki ve Kleihues, 2013).

Gliomalar, İzositrat dehidrogenaz (IDH) 1 ve IDH II genleri ve 1p/19q kromozom delesyonunun varlığına göre iki farklı şekilde sınıflandırılır (Villa ve ark., 2018).

İzositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) geni mutasyonlarının sekonder GB tanısında klinik ve patolojik kriterler üzerine güvenilir, objektif bir moleküler marker olduğu düşünülmektedir (Nobusawa ve ark., 2009).

Ek olarak primer glioblastomalarda gen ekspresyon profili ve genetik değişikliklere göre subtipler tanımlanmıştır (Sasmita ve ark., 2018). Bu subtipler ‘pronöral’, ‘nöral’, ‘klasik’ ve ‘mezenkimal’ olarak isimlendirilmişlerdir (Sasmita ve ark., 2018).

2.1.4. Glioblastoma epigenetiği

GB’de genetik faktörler dışında epigenetik faktörlerde GB’nin moleküler ve klinik yapısını doğrudan etkileyebilmektedir. Histon modifikasyonları, deoksiribonükleik asit (DNA) metilasyonu (Esteller, 2008) ve kodlanmayan ribonükleik asit (RNA)’lar (Mattick ve Makunin, 2006) dahil olmak üzere birçok epigenetik mekanizma bildirilmiştir. DNA metilasyonu omurgalılarda histon modifikasyonları; neredeyse sadece CpG dinükleotitlerinde, amino-terminal histon kuyrukları içindeki spesifik pozisyonlarda ortaya çıkar. (Bernstein ve ark., 2007).

Histon modifikasyonları, esas olarak asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon ve sumolasyon dahil olmak üzere çekirdek histonun N-terminal kuyrukları boyunca meydana gelen translasyon sonrası modifikasyonlardır (Kanwal ve Gupta, 2012). Histon kuyruklarında yapılan translasyon sonrası değişiklikler, kromatinin yapısal durumunu ve genlerin transkripsiyonel durumunu yönetir. Bu modifikasyonlar geri dönüşümlüdür.

Histon asetil transferazlar (HAT’ler) ve histon deasetilazlar (HDAC’ler), sırasıyla N-terminal lizin kalıntılarında histon asetilasyonu ve deasetilasyonu ile epigenetik modifikasyondan sorumludur. Hem HAT’lar hem de HDAC’lar, gen ekspresyonu ile ilgili kromatin yapılarının düzenlenmesinde önemli rol oynar; yani, HDAC’lar ve HAT’lar, histonun DNA bağlanma kabiliyetini artırır ve azaltır. HAT ve HDAC’lar sırasıyla genin aktifleşmemesi ve aktivasyonu için DNA yoğunlaşmasına ve dekonduksiyonuna yol açar (Vahid ve ark., 2015).

Tablo 3. Gliomanın majör genetik ve epigenetik alt grupları. Karakteristik epigenetik değişiklikler kalın yazılmıştır (Gusyatiner ve Hegi., 2018).

				Astrocitoma IDH mutasyonu DSÖ Sınıf II	Oligodendroglioma IDH mutasyonu 1p/1q delesyonu DSÖ Sınıf II
				Astrocitoma IDH Mutasyonu DSÖ Sınıf III	Oligodendroglioma IDH mutasyonu 1p/1q delesyonu DSÖ Sınıf III
	Glioblastoma H3K27M DSÖ Sınıf IV	Glioblastoma H3G34R/V DSÖ Sınıf IV	Glioblastoma IDH wt DSÖ Sınıf IV	Glioblastoma IDH mutasyonu DSÖ Sınıf IV	
MGMT Metilasyonu	<5%	~65%	~35-50%	~90%	~100%
Yaş grubu	çocuk	Çocuk/genç yetişkin	Daha yaşlı yetişkin	Genç yetişkin	
Karakteristik değişiklikler	H3 Lizin trimetilasyon kaybı	DNA Hipmetilasyonu	CHR7 Kazanımı CHR10 Kaybı TERTp Mutasyonu EGFR Amplifikasyonu	G-CIMP ATRX Mutasyonu TP53 Mutasyonu	G-CIMP TERTp Mutasyonu

CHR: kromozom; H3: histon 3; GCIMP: Glioma CpG ada metilatör fenotipi; MGMT: O6-Metilguanin-DNA Metil Transferaz; ATRX: ATP'ye bağlı helikaz; TERTp: Telomeraz Ters Transkriptaz promotör; IDH: İzositrat dehidrogenaz DSÖ: Dünya sağlık örgütü 1p1q:1p ve 1q delesyon

MGMT (O6-metilguanin metiltransferaz) geninde saptanan metilasyon glioblastoma için önemli bir biyomarkerdir (Kessler ve ark., 2018). MGMT, DNA tamir proteinidir (Esteller ve ark., 2000). Bu gen promotördeki metilasyon ile susturulabilir, MGMT genlerinin promotör bölgelerindeki hipermetilasyonun glioblastomada daha uzun sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hegi ve ark.,2005). O6 pozisyonunda bir alkil grubuna sahip olan DNA, bir iplik kopması ya da bir G → A geçişi mutasyonu yoluyla guanin bazı ile timin bazının yanlış eşleşmesine yol açabilecek potansiyel bir mutajenik lezyona sahiptir (Gerson, 2004). DNA onarım olmadan apoptozu aktive ederek hücre ölümüne yol açabilir. MGMT, DNA hasarını önlemek için O6 alkil grubunu çıkarmaya çalışır (Braun ve Ahluwalia, 2017). Alkil grubunun çıkarılmasından sonra, yeni alkillenmiş MGMT proteini geri dönüşümsüz olarak inaktive olacak ve bozulacaktır (Braun ve Ahluwalia, 2017). MGMT geni, promotör bölgesi metillendiğinde susturulur. Bu susturma GB tümörlerinin moleküler profilinde, kemoterapiye daha iyi yanıt öngören özelliğe sahip olmasına neden olur (Weller ve ark., 2010).

2.4. Histon Deasetilaz Enzim Ailesi

Proteinojenik lizin kalıntılarının ε-amino grubunda geri dönüşümlü lizin asetilasyon işlemi HAT tarafından katalize edildiği bilinmektedir. Asetil grupları, HAT'ın fonksiyonel antagonistleri, HDAC'lar ile uzaklaştırılır (Kuo ve Allis, 1998)

HDAC enzimleri maya proteinleri ile dizi benzerliği ve homolojisine göre tanımlanmaktadır. Filogenetik analizlerde insan genomunun dört sınıfa ayrılan ve toplamda 18 tane HDAC içerdiği bilinmektedir (Barneda-Zahonero ve parra, 2012).

HDAC enzimlerinin, doğrudan veya dolaylı olarak gen ekspresyonunun kontrolü, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücrenin göç etmesi ve hücre ölümünün düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir (Zhang ve Zhong, 2014).

GB hücrelerinde ve primer GB dokularında, hem mRNA hem de protein seviyelerinde neoplastik olmayan beyin dokularına kıyasla artmış HDAC1, 3 ve 6 ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir (Staberg ve ark., 2017). Özellikle, HDAC1 ve 3 ekspresyon seviyeleri, GB hücrelerinde meydana gelen en yüksek ekspresyon seviyeleri DSÖ tümör dereceleri ile ilişkilidir. HDAC2, sınıf I HDAC ailesinin bir üyesidir. HDAC9'un prognozu kötü olan GB hastalarında aşırı eksprese edildiği rapor edilmiştir (Yang ve ark., 2015). GB hücrelerinde yüksek HDAC2 ekspresyonu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2016).

HDAC6'nın aşırı ekspresyonu GB hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2016).

Epigenetik modifikasyonlar oldukça spesifik enzim kompleksleri tarafından katalize edildiğinden yeni terapötik ilaç hedefleme potansiyeli vardır (Williams ve ark., 2017). Yukarıda HDAC'ların GB'deki rollerine ilişkin verilen bilgiler, HDAC'ları hedef alan inhibitörlerin kullanılması GB'de yeni bir tedavi yaklaşımının gelişmesini katkı sunabilir. Bu tez çalışmasında da HDAC inhibitörlerinden Sodyum Bütirat (SB)'ın etkisi araştırılmıştır.

2.5. Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) HDAC'ları inhibe eden, aktivitelerini ve fonksiyonlarını değiştirebilen, proteinler içindeki lizin kalıntılarının posttranslasyonel asetilasyonunu teşvik eden heterojen bir ajan grubudur (Jaworska ve ark., 2017).

HDACi'ler kimyasal yapılarına göre hidroksamik asitler, kısa zincirli yağ asitleri, benzamidler, siklik peptitler ve sirtuins inhibitörleri olarak adlandırılmaktadır (Eckschlager ve ark., 2017).

Tablo 4.Histon deasetilaz enzim inhibitörleri (Lee ve ark., 2015).

Hdac İnhibitör Sınıf	İlaç	Histon Deasetilaz Spesifikliği	Kan Beyin Bariyeri Penetrasyonu	Glioblastoma Uygulamaları İçin Gelişim Evresi	Diğer Onaylanan Kullanımlar
Kısa Zincirli yağ asitleri	Pivaloiloksimel bütirat (Pivanex, AN-9)	Sınıf I / Sınıf II	evet	Ön klinik	Küçük hücreli olmayan kanseri faz II (stopped)
	Sodyum Bütirat	Sınıf I/ Sınıf II	evet	Ön klinik	Bağırsakta endojen antibiyotik faz II
	Buphenil (Sodyum FenilBütirat)	Sınıf I/ Sınıf II	evet	Aşama II	Üre döngüsü bozuklukları tedavisi
	valproat	Sınıf I/ Sınıf II	iyi	Aşama II	Epilepsi tedavisi, aoreksi nevroza, panik atak, anksiyete bozuklukları
Benzamidler	entinostat (MS-275)	HDAC 1, 2, 3	Düşük	Ön klinik	Meme kanseri faz III
Siklik peptitler	Romidepsin	HDAC 1, 2, 3, 8 (Istodax, FK228, FR901228)	Düşük	Faz I/ II	Deri T-hücrelerinin tedavisi
Hidroksamat türevleri	Azelaik bishidroksamik asit (ABHA)	HDAC 3	Veri yok	Ön klinik	Yok
	m-karboksisinamik bishidroksamik asit (CBHA)	HDAC 3	Geçer	Ön klinik	Yok
	Dacinostat (LAQ824)	Sınıf I/II	iyi	Ön klinik	Yok
	AR-42 (OSU-HDAC-42)	Pan-HDAC	Geçer	Ön klinik	Akut miyeloid lösemi için Faz I
	Panobinostat (LBH-589)	HDAC 1, 2, 3, 6	iyi	Faz II	Birkaç kanser için Faz III
	Quisinostat	Sınıf I ve II	Veri yok	Ön klinik	Faz II T hücreli lenfoma
	Suberik bishidroksamik asit (SBHA) Scriptaid	HDAC 1, 3, 8	Veri yok	Ön klinik	yok
	Trichostatin A	HDAC 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10	Yok	Ön klinik	yok
	Vorinostat (SAHA)	HDAC 1, 2, 3, 6	Düşük	Faz III	kütanöz T hücreli lenfoma ve diğer birçok kanser için faz denemelerimde
	Çeşitli-trisülfit	Diallyl Trisulfid(DATS)	Bilinmiyor	Veri yok	Ön klinik

HDAC inhibitörleri, hücrel farklılaşma, apoptoz, yaşlanma, hücre döngüsü düzenlenmesi, otofaji, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, anjiyogenez ve metastazın engellenmesi gibi birçok mekanizmada rol alan antikanser ajanlar olarak bilinir (Marks ve Xu, 2009; Falkenberg, Johnstone, 2014).

Tablo 5. HDACa inhibitörlerinin temel etkileri. (Lee ve ark., 2017).

Tümör hücreleri üzerindeki doğrudan etkiler	
<i>Biyolojik etkiler</i>	<i>HDAC inhibitörlerinin temel etkileri</i>
Hücre ölümü	Apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları yoluyla uyarılması ROS üretimi artırılmış ve serbest radikal temizleyicileri üretimi azaltılmış İmmünojenik hücre ölümü
DNA Hasarı ve Onarımı	DNA tamir proteinlerinin azalmış veya bozulmuş fonksiyonu ile DNA hasarının birikmesi
Hücre Döngüsü Durdurma	Hücre döngüsü inhibisyonunun indüklenmesi
Senesens	Senesensin indüklenmesi
Otofaji	Otofaji indüksiyonu
Farklılaşma	Farklılaşma indüksiyonu
Tümör İmmünojenitesi	Artmış immünojeniklik Tümör hücrelerinin artmış antijenitesi
Tümör Hücreleri Üzerindeki Dolaylı Etkiler	
<i>Biyolojik etkiler</i>	<i>HDAC inhibitörlerinin temel etkileri</i>
İmmünomodülasyon	Dendritik hücre farklılaşması ve fonksiyonunun inhibisyonu Makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillere olan sitotoksosite B hücrelerinde apoptozun indüksiyonu NK ve sitotoksik T hücrelerince tümör ölümü CD8 ⁺ farklılaşma ve fonksiyonunun artması Düzenleyici T hücrelerinin immünbaskılayıcılığının inhibisyonu İnflamatuar sitokin üretiminin baskılanması PD-L1 ekspresyonunda artış
Anjiyogenezin İnhibisyonu	Pro-anjiyojenik genlerin ekspresyonunun baskılanması
Metastazın İnhibisyonu	Pro-metastatik genlerin ekspresyonunun baskılanması Anti-metastatik genlerin artmış ekspresyonu
Glikoz Metabolizması	Glikoz kullanımının engellenmesi

ROS: Reaktif oksijen türleri, NK: doğal öldürücü CD8⁺: Sitotoksik T hücreleri PD-L1:

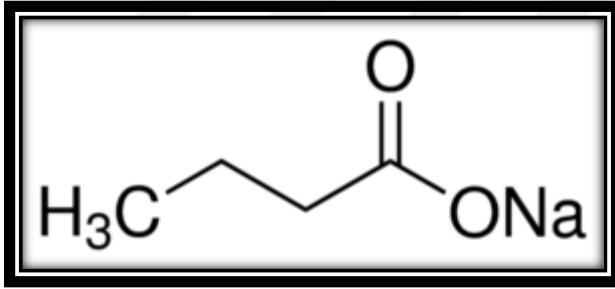
Programlanmış ölüm ligand 1

HDACi'ler hücrenin büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi yollarda etkili epigenetik modifikasyonları etkileyen önemli molekül gruplarından biridir. Bütün HDACi'lerin in vitro kanser modellerinde ekstrinsik yada intrinsik veya her iki şekilde de apoptozisi aktive ettiği bildirilmektedir (Carew ve ark., 2008).

Şu ana kadar tanımlanmış pek çok HDACi bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında kan beyin bariyerini geçen HDACi'lerden SB çalışılmıştır.

2.1.5. Sodyum bütirat

Bütirat, insan ve hayvanların kalın bağırsağında mikrobiyal fermantasyon ile üretilir. SB, bütirik asidin sodyum tuzudur (Bedford ve Gong, 2018). SB, sınıf I ve sınıf II histon deasetilazları inhibe etmektedir (Lee ve ark., 2015).



Şekil 2. Sodyum bütiratın kimyasal yapısı

Kan beyin bariyerini geçtiği (Lee ve ark., 2015) için beyin tümörlerinde terapötik potansiyeli olabileceği düşünülen (Marks ve Xu, 2009) SB'nin yalnız başına veya diğer kematerapötik potansiyeli olacak adaylarla kombine kullanımı yeni bir tedavi yaklaşımı olabilir.

Bu yeni tedavi yaklaşımlarından bir tanesi de, proteazom yolağı inhibitörlerinin SB ile birlikte kullanımı olabilir. Proteozom yolağı inhibitörleri, epigenetik modifikasyonlardan biri olan ubikitinasyon yolu üzerinde kullanılır. Bu tez çalışmasında da

yeni bir tedavi yaklaşımının prelinik verilerinin elde edilebilmesi için histon deasetilaz inhibitörü olan SB'nin proteazom yolağı inhibitörlerinden “Celastrol” ile birlikte kullanımının GB’de ki olası terapötik etkisi araştırılmıştır.

2.4. Celastrol

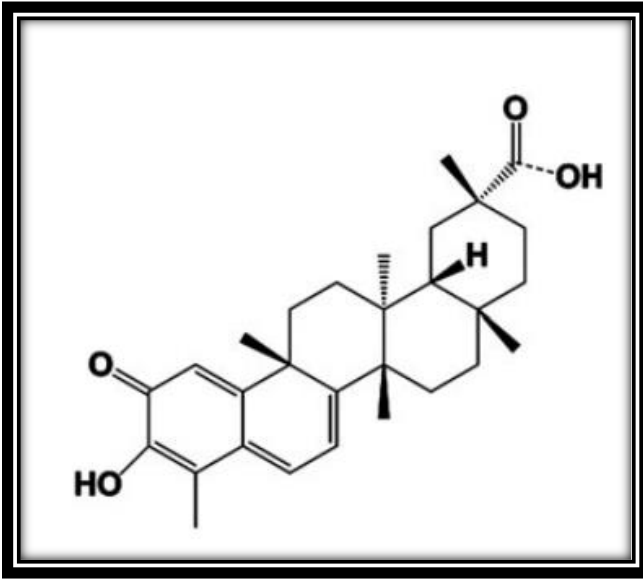
Ubiquitin (Ub) proteini, hücrede yanlış katlanmış ve hasarlı proteinlerin proteozom molekülüne taşınması ve parçalanmasında görev almaktadır (Yewdell, 2001). Proteozom, hücre içi proteinlerin kütlelerini kontrollü bir şekilde parçalayan önemli bir proteazdır (Rock ve ark., 1994). Çeşitli türleri tanımlanan proteozom molekülünün kabul gören ve insanda bulunan formu 26S proteozomdur. 26S proteazom, 20S proteozom ve 2 tane 19S düzenleyici kompleksten oluşan ve yaklaşık 60 alt birimi içeren bir proteozomdur (Lecker ve ark., 2006). Yeni sentezlenen proteinlerin yaklaşık üçte birinin sentezlendiği dakikada proteozomlar tarafından yıkıldığı bilinmektedir (Yewdell ve ark., 2001). Proteozom aktivitesi hücrede apoptoz ve onkojenik transformasyon gibi birçok işlemlerin kontrol edilmesinde rol aldığı bilinmektedir (Dou ve Li, 1999) .

Proteozom inhibitörlerinin antikanser etki gösterdiği bilinmektedir (Almond ve Cohen, 2002). 26S lik proteozomu oluşturan alt kompleksler hedeflenerek inhibitörler geliştirilmiştir. Bu proteozom inhibitörlerinin farklı tümör tiplerinde apoptozu indüklediği ve anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012). Bortezomib, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk proteozom inhibitörüdür. Bortezomib, klinikte multiple myeloma ve mantle hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmaktadır (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012).

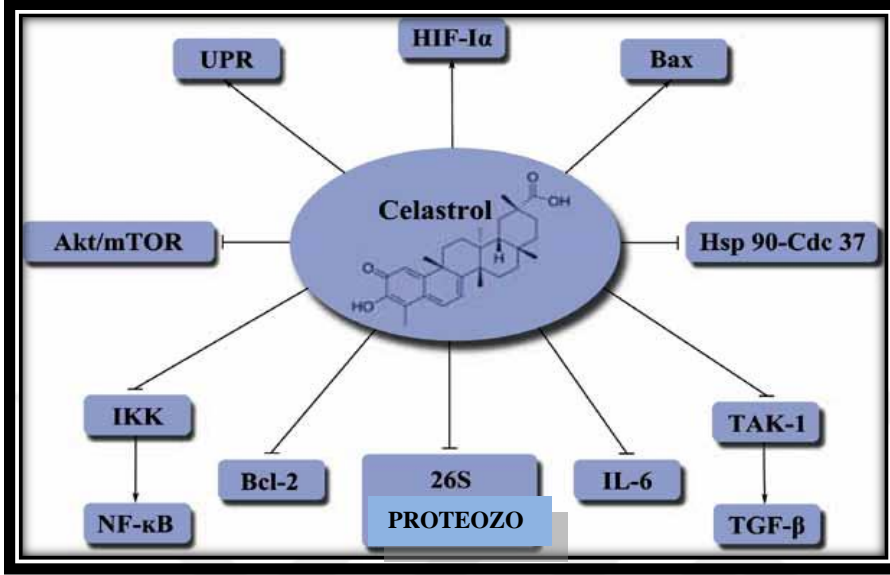
Celastrol, HSP90 (Isı şoku proteinleri 90)'nın Adenozin 3'- trifosfat enzimi (ATPaz) aktivitesini inhibe eden bir proteazom inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Zhang ve ark., 2009). Celastrol, *Tripterygium wilfordii* (gök gürültüsü asma tanrısı), *Celastrus orbiculatus*, (oryantal acı tatlı), *Celastrus aculeatus* (acı tatlı), *Celastrus reglii*, *Celastrus scandens*

(Amerikan acı tatlı) ve Celastrol ailesinin diğer üyeleri dahil birkaç geleneksel şifalı Çin bitkisinin biyoaktif bir bileşenidir (Jin ve ark., 2002). Bu bitkilerin bazılarının kök, ağaç kabuğu ve köklerinin özleri uzun süredir Çin ve diğer Asya ülkelerinde romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus ve alerjiler dahil olmak üzere çok çeşitli kronik enflamatuar bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır (Jin ve ark., 2002). Celastrol ayrıca anti-enflamatuar özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir (Wong ve ark., 2012).

Celastrol, kinon metitler olarak adlandırılan küçük bir organik bileşik sınıfına ait olan bir pentasiklik triterpendir. Tripterin olarak da bilinen celastrol (Venkatesha ve Moudgil, 2016) 450.6 g/mol ağırlığa sahiptir ve moleküler formülü $C_{29}H_{38}O_4$ 'tür. Soluk kahverengi ila turuncu kırmızı kristal tozudur ve erime noktası 219-230°C arasındadır. Celastrol, 253 ve 424 nm'de maksimum UV/görünür absorpsiyon spektrumuna sahiptir. Elektrofilik bir bileşik olan Celastrol suda az miktarda çözünür, ancak dimetilsülfoksit (DMSO) ve etanol gibi polar olmayan çözücülerde kolay çözünür. (Venkatesha ve Moudgil, 2016).



Şekil 3. Celastrol'ün moleküler yapısı (Venkatesha ve Moudgil, 2016).



Şekil 4. Celastrol'ün etkilediği hücre içi yolaklar [(Wu ve ark., 2016), UPR: katlanmamış protein yanıtı, HIF-1a: Hipoksi ile İndüklenen Faktör bax: tümör baskılayıcı protein hsp 90: Isı şoku proteini 90 IL-6: İnterlökin 6 Nf-Kb: Nükleer faktör-kappa B IKK: İKB kinaz]

Celastrol'ün birçok kanser modelinde (prostat, pankreas, lösemi ve melanom vb) antikanser (Hassane ve ark., 2008) ve anti-metastatik aktiviteleri olduğu bilinmektedir (Petronelli ve ark., 2009; Gubta ve ark., 2010; Pang ve ark., 2010). Ayrıca, Celastrol'ün diğer antikanser ilaçlarla birlikte kullanıldığında radyoterapinin faydalı etkilerini güçlendirdiği gösterilmiştir (Dai ve ark., 2009). Bu aktivitelere dahil olan ve celastrolden etkilenen ana hücrel süreçler; hücrel proliferasyonun inhibisyonu, apoptozun indüklenmesi, malign doku istilasının önlenmesi ve anjiyogenez blokajı olduğu rapor edilmiştir (Gubta ve ark., 2010; Kannaiyan ve ark., 2011; Li-Weber, 2013). Han ve ark yapmış olduğu çalışmada Celastrol'ün reaktif oksijen türleri (ROS) aracılı otofaji ve apoptoziyi indükleyebileceği (han ve ark., 2014) rapor edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının deney süreçleri Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yürütülmüştür.

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan hücre serileri

Tez çalışmasında 2 adet GB hücre serisi kullanılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre serileri.

	LN405	T98G
Organizma	İnsan	İnsan
Cinsiyet, yaş	Kadın, 62	Erkek, 61
Doku	Beyin	Beyin
Morfoloji	Fibroblast	Fibroblast
Yüzey tutunumu	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler
Tümörijenik	Hayır	Hayır
Karyotip	Hipertetraploid ve poliplid (%37)	Hiperpentaploid
Besi yeri	DMEM (High glukoz)-%10 FBS	RPMI-1640, %10 FBS
Besi yeri yenileme süresi	Haftada 2 kez	Haftada 2-3 kez
Pasaj metodu	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA
Ayırma oranı	1:2-1:3	1:3- 1:10
Biyogüvenlik düzeyi	1	1

3.1.2. Hücre kültürü

Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Sodyum Bütirat	Sigma	B5887 (1 gr)
Celastrol	Sigma	C0869 (10 mg) (HPLC)
Besi yeri	Capricorn Scientific	DMEM-HA (DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine) Lot No: CP18-2472
Fötal Bovine Serum	Biological Industries	European grade, 0.1µM filtre edilmiş
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific	100X, PS-B, Lot No:CP15-1396
L-Glutamine	Capricorn Scientific	200 mM, GLN-B (100 ml)
Trypsin-EDTA	Capricorn Scientific	DBPS içinde, Lot No: C17-1635 (100 ml)
Flask (25cm ²)	Biologix	Polystrene, 07-8025
Flask (75cm ²)	Biologix	Polystrene, 07-8075
15 ve 50 ml'lik Tüp	Biologix	10-9151 (15 ml), 10-0502 (50 ml)
96 kuyuklu plak	Corning	3361
6 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-6
Dondurma tüpleri	Corning	430659
Transfer pipeti	Biologix	30-135A1 (3ml)
Hücre sayım lamı	Neubauer Haemocytometry	68052-14, 68052-15
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applichem	A3672,0100
Fosfat Tuz Tamponu (PBS)	Sigma	P4417, Tablet, (pH: 7,4) (Ca ⁺⁺ veMg ⁺⁺ içermeyen)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) : Applichem marka, No: 6381-92-6	Vivantis	PC0706
Serolojik Pipet : Greiner bio-one, 5 ve 10 ml'lik Sterilizasyon amaçlı Etil Alkol (%75'lik) Riedel-de Haen, No: 64-17-5:	Greiner Cellstar	P7615 (5 ml) ve P7740 (10 ml)
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml'lik) tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Etil Alkol (%75'lik)	Merck	64-17-5

3.1.3. 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid sitotoksosite testi

MTT sitotoksosite testinin yapılabilmesi için gerekli malzemeler Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. MTT testinde kullanılan gereçler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma	M5655-1g
MTT stok solüsyonu		5 mg toz MTT 1 ml steril PBS içerisinde çözüldü ve filtre edilerek (0,20 µm’lik) kullanıldı
MTT çalışma solüsyonu (96 kuyucuklu plakta bir kuyucuk için)		10 µl MTT solüsyonu (5 mg/1 ml) 90 µl besi yeri karıştırılır ve her bir kuyucuğa eklenir
DMSO	Applichem	A3672,0100
96 kuyucuklu plak	Costar	CLS3599
MTT lizis solüsyonu	Triton-X (Sigma) HCl (0,1 N Fischer Scientific) İsopropanol (Merck)	Her bir kuyucuğa hazırlanan solüsyondan 100 ml eklenir. 100 ml lizis solüsyonu hazırlanması: Triton X (T8787) (1 ml) HCl (AC 12420-0010) 0,1 N (10 ml) İsopropanol (109634) (89 ml)
Filtre	Sartorius Minisart	16532; 0,22 µm’lik
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0.2; 0.5; 1.5; 2 ml’lik), Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.4. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonunda kullanılan malzemeler Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Total RNA izolasyonunda kullanılan malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Trizol	Sigma	T9424-100ml
Kloroform	Merck	366927-2,5L
İsopropanol (=2-Propanol)	Merck	I9516
Etil Alkol	Sigma	64-17-5
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml’lik) tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma	D5758-50 ml %0,1 konsantrasyonda 100 ml steril distile su (dH ₂ O)’ya 0,1 ml DEPC eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildi, ardından otoklanıp (15 dakika, 100°C) soğutulularak kullanıldı
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.5. cDNA sentezi

cDNA sentezinde kullanılan malzemeler Tablo 10’de verilmiştir.

Tablo 10. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
cDNA sentez kiti	GeneAll	HyperScriptFirst Strand Sythesis Kit/601-005
Steril Tüpler	Biologix	0,2ml'lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Steril Su	BioShop	WAT222.100
PZR makinesi	Rotor Gene	Gerçek zamanlı PZR aleti cDNA sentezinde kullanılmıştır.
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.6. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Tris baz	Duchefa Biochemie	T1513
Borik asit	Merck	203667
EDTA	Sigma	798681
10XTBE solüsyon (pH:7,5)		Tris baz (54 gr), borik asit (27,5) ve 20 ml EDTA (0,5 M) steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.
Agaroz	Vivantis	PC 0701
% 1'lik agaroz		1 g agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde eritilerek hazırlandı. Eritildikten sonra içerisine 3 µl Etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi.
Etidyum Bromür	Vivantis	PC 0707 (10 ml)
Brom fenol mavisi	Ambresco	115-39-9
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.7. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR)

RT-PZR’da kullanılan malzemeler Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. RT-PZR’da kullanılan malzemeler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
WizPure™ RT-PCR 2X Master	WizPure	W2401
Steril Tüpler	Biologix	0,2ml’lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.8. Akım (Flow) sitometri

Akım sitometri deneyinde kullanılan malzemeler Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13. Akım sitometri deneyinde kullanılan malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Etil Alkol	Sigma	3221
RNase	Sigma	R6513
Propidium Iodide	Sigma	81845
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

3.1.9. Çalışmada kullanılan alet/makineler

Tez kapsamında yapılan tüm deney süreçlerinde kullanılan alet/makineler Tablo 14’da özetlenmiştir.

Tablo 14. Tez kapsamında kullanılan genel alet/makineler.

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Laminar Kabin	Metisafe	Clas II
CO2'li incubator	Memmert	UNB 200
İnverted Mikroskop	Olympus	CKX31
Soğutmalı Santrifüj	Universal	320R (mikro ve 15ml'lik falkon rotorlarıyla)
Vortex	MRC	SI-100
Hassas Terazi	Dikoman	FGH
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Isıtmalı plak	MRC	HSD-135
Mikrofüj	INOVA	MINO-10K
Translimünatör	MRC	UV-26
Elektroforez Tankı	SCIE-PLAS	SVG-SYS Vari-gel
Güç Kaynağı	Consort	EV231
Mikrodalga Fırın	Arçelik	MD 574
Su banyosu	MRC	WBO-100
Biodrop		
Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
Spektrofotometre		
RT-PZR	Rotor Gene	
Azot tankı	International Cryogenics	35 ve20 lt'lik
Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo	Sanyo
Akım Sitometri	Beckman Coulter	EPICS XL MCL,

3.2. Yöntem

3.2.1.Hücre kültürü

Bu tez çalışmasında LN-405 ve T98G hücre serileri kullanılmıştır. Hücreler 37°C, %5 CO₂ koşulları altında steril ortamda çoğaltılmıştır. Kültür işlemleri aşağıdaki gibidir.

Hücreler en uygun besi yeri kullanılarak 75 cm'lik flasklara ekilmiştir ve çoğaltılmıştır. Hücrelerin yoğunluğu %70-80 oranına ulaştığı zaman, hücreler 2ml PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) ile yıkanmıştır. Daha sonra 0.5 ml Tripsin/EDTA eklenerek hücrelerin birbirlerinden ve flaskın zemininden ayrılmaları sağlanmıştır. Serbest kalan hücreler steril serolojik pipet ile 15 ml'lik falkon tüplerine alınmıştır. Tüpler 1500 rpm (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı)'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve hücrelerin bulunduğu pelet kısmının üstüne yaklaşık 2ml besi yeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Ardından hücreler Thoma lamı aracılığıyla sayılmıştır. Hücrelerin yoğunluğuna göre pasaj yapılmış ve diğer test süreçlerine geçilmiştir. Hücreler deneye tabii tutulmayacağı zaman dilimlerinde dondurma solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve sonrasında uygun dondurma tüplerine (cryovial) aktarılmıştır. Bu tüpler, -20°C'de 1 saat ve -80°C'de 24 saat tutulduktan sonra likit nitrojen tanklarında saklanmıştır.

3.2.2. Sitotoksisite testi

Hücre kültüründe çoğaltılmış olan hücre serileri üzerinde SB'nin ve celastrol'ün olası sitotoksik etkisinin saptanması amacıyla hücrelerin inhibitör dozları (IC₅₀) belirlenmiştir. Bunun için MTT tekniği kullanılmıştır. Her bir madde için 3 kez ve her bir deneyde 4 tekrar yapılmıştır. MTT tekniğinde kullanılan protokol aşağıdaki gibidir;

SB ve celastrol çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmak üzere sırasıyla su ve

DMSO ile çözülerek ana ve ara stoklar hazırlanmıştır.

Hücre kültüründe çoğaltılmış olan hücreler tripsin ile flaskların zemininden kaldırılmış, sayım işlemleri yapıldıktan sonra 96'lık plağın her bir kuyucuğunda 8×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ardından hücreler plağın tabanına yapışmaları ve uyum sağlamaları amacıyla 12 saat boyunca 37°C 'de CO_2 'li etüvde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında plaklardaki hücreler, hücre döngülerinin eşitlenmesi için 8 saat serum açlığına bırakılmıştır. Açlık süresi sonunda, SB için 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 μM ; celastrol için 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 ve 10 μM konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Hazırlanan konsantrasyonlar plağın her bir kuyucuğuna 100 μl besi yeri içerisinde hücrelere verilmiştir. Ardından hücreler 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

72. saatin sonunda MTT süreci başlatılmıştır. Hücrelerin üzerindeki medium atılarak her bir kuyucuğa 100 μl [10 μl MTT (5 mg/ml) +90 μl besi yeri] MTT solüsyonu eklenmiştir ve hücreler 37°C 'de, CO_2 inkübatörde 3 saat inkübe edilmiştir.

Üç saatin sonunda hücrelerin üzerinde bulunan besi yeri atılmış ve her bir kuyucuğa 100 μl lizing solüsyonu eklenmiştir. Böylece yaşayan hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır.

Formazan kristalleri çözüldükten sonra plak okuyucu spektrofotometrede her bir kuyucuğun 570 nm'deki absorbans değerleri tespit edilmiştir.

Absorbans değerlerinden excel ve Graphad Prism programları aracılığıyla hücrelerin IC_{50} değerleri saptanmıştır.

3.2.3. RNA izolasyonu

SB ve Celestrol moleküllerinin IC₅₀ değerleri tek tek ve birlikte, T98G ve LN-405 hücre serilerine uygulanarak 72 saat inkübe edilmiştir. Ardından total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu protokolü aşağıdaki gibidir;

Moleküller belirlenen IC₅₀ değerlerine göre Sodyum Bütirat, Celestrol, Sodyum Bütirat+Celestrol olacak şekilde 3 grup şeklinde uygulanmıştır. Ayrıca her iki hücre serisi için kontrol grupları oluşturulmuştur.

25cm²'lik flasklara ortalama 1X10⁶ yoğunlukta hücre ekilmiş ve 12 saat inkübasyona bırakılarak flask tabanına tutunması sağlanmıştır. Ardından 8 saat serum açlığına bırakılmıştır. 8. saatin sonunda moleküllerin IC₅₀ değerleri tek tek ve birlikte hücrelere verilerek 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

72. saatin sonunda hücreler tripsine edilerek toplanmıştır. Ardından +4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda supernatant kısmı atılmış ve üzerine 2 ml steril soğuk PBS (Ca⁺² ve Mg⁺²içermeyen) eklenerek pipetaj yoluyla karışması sağlanmıştır. Bundan sonraki basamaklarda aksi belirtilmedikçe işlemlere buz üzerinde devam edilmiştir.

15ml'lik falkon tüpleri +4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak peletin üzerine 1000 µl soğuk Trizol eklenmiş ve pipetaj yapılarak 1,5 ml'lik steril tüpe alınmıştır.

Trizol hücre karışımı 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından örnekler +4°C'de, 3500 rpm'de, 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant kısmının 2/3 üst bölümü mikropipet yardımı ile steril 1.5 ml'lik tüplere alınmıştır. Üzerine 200 µl soğuk kloroform eklenmiş ve tüpler 15 saniye boyunca şiddetli bir şekilde vortekslenmiştir.

Vorteks sonrasında tüpler 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 12000 x g'de +4°C'de, 15dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda karışım üç faza ayrılmıştır; alta kloroformlu faz, ortada hafif beyazımsı faz ve en üste RNA'nın bulunduğu şeffaf faz. Üste oluşan şeffaf faz mikropipet yardımıyla yavaşça alınarak steril 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarılmış ve üstüne 500 µl izopropil alkol eklenerek pipetaj yapılmıştır.

Bu karışım 15-30°C'de 10 dk inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda +4°C' de, 12000 g'de, 10 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda süpernatant atılmıştır. Beyazımsı jel benzeri pelet üzerine soğuk 1 ml %75'lik etil alkol eklenerek yavaşça pipetaj yapılmıştır.

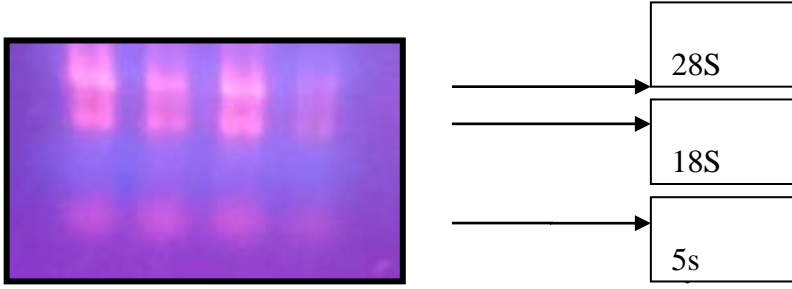
Pelet kalktıktan sonra tüpler +4°C'de, 7500 x g'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda süpernatant atılmıştır. Tüpler hücre kültürü laminer kabinde 12-15 dk tüpün ağzı açık bırakılarak kurumaya bırakılmıştır.

Peletler kuruduktan sonra 30-50 µl DEPC'li su ile çözülmüştür. Total RNA'lar cDNA sentezi yapılmak üzere -80°C'ye kaldırmıştır.

RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi

İzole edilmiş olan Total RNA'ların kalitatif değerlendirilmesi için yaklaşık 3-5 µl RNA %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Yürütme sonunda elde edilen görüntülerde 28S, 18S ve 5S RNA saptanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Elde edilen total RNA'nın %1'lik agaroz jel görüntüsü.

RNA'nın kantitatif değerlendirilmesi

Total RNA'nın kantitatif olarak değerlendirilmesi için BioDrop cihazı kullanılmıştır. Total RNA'nın 260/280 nm'de absorbans değerlerine bakılmıştır. Böylece total RNA'nın miktarı ve saflığı saptanmıştır. 1 optik dansite (OD) RNA için 40 µg/ml olarak bilinmektedir.

3.2.4. cDNA (Complementer DNA) sentezi

SB ve celastrol uygulanan hücrelerden izole edilen total RNA'ların hedeflenen genlerin ekspresyon seviyelerini tespit etmek için cDNA'ya dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu amaçla GeneAll HyperScriptFirst Strand Synthesis Kit (Katalog: 601-005) kullanılmıştır. cDNA sentezinde kullanılan kitin reaksiyon içeriği Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri.

Primer (50 μ M)	1 μ l
dNTP (10 mM)	1 μ l
Total RNA (1 μ g)	---(örneğe göre değişir)
dH ₂ O	14 μ l'ye tamamlanmıştır

Her bir örnek için 0.2 ml steril PZR tüplerinin içerisine belirtilen reaksiyon mixi eklenmiştir. Üzerine; 2 μ l 10x revers transkriptaz (RTaz) buffer, 2 μ l DTT, 1 μ l ters transkriptaz enzimi ve 1 μ l Rnaz eklenerek 3-4 sn mikrosantrifüj edilmiştir. Ardından PZR tüpleri PZR cihazına alınmıştır. Sıcaklık protokolü; 55 ⁰C 60 dakika ve 85⁰C 5 dk şeklinde uygulanmıştır. PZR sonunda örnekler ileride kullanılmak üzere -20⁰C'ye kaldırılmıştır.

3.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-PZR; RT-PZR)

Hücre serilerinden izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan cDNA'lar, bu tez çalışmasında araştırılacak olan genlerin ekspresyon seviyelerinin saptanması için RT-PZR deneyinde kullanılmıştır. RT-PZR'de GeneAll® RealAmp SYBR qPCR Master mix kiti kullanılmıştır (Tablo 16). Hedef genlerin yanında, deneyin çalışıp çalışmadığını anlamak amacıyla kontrol geni GAPDH kullanılmıştır. Ekspresyonu saptanması hedeflenen genlerin primer dizileri Tablo 17 de verilmiştir. Her örnek için 3 bağımsız tekrar yapılmıştır. Ekspresyonlar arasında oluşabilecek rölatif farklılığın belirlenmesi için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülasyonu kullanılmıştır. RT-PZR'ın etkinlik değeri genellikle 0.98-0.99'dur. Reaksiyon içerikleri çalışmada kullanılan tüm genler için aynıdır.

Tablo 16. RT-PZR için reaksiyon içeriği.

Reaksiyon içeriği	Bir örnek için	Reaksiyon Döngüsü
Tampon (2X) SYBR qPCR master miks	10 µl	1-95°C 5' denatürasyon (1 döngü) 2-95°C 15"
Primer (MLH1, MSH2,6, CAS3,8,9, ATG6, MGMT, GAPDH)	Forward : 0.5 µl (10pmol/µl) Reverse : 0,5µl (10pmol/µl)	3-55°C (54-61°C, gene göre değişkendir) 50" 4-72°C 30" 40 döngü (2'den 4'e)
dH2O	7 µl	Meting Curve (erime eğrisi) Analizi
cDNA	2 µl	Ramp: 50-99
Toplam	20 µl	(0.5°C artış, her basamakta 3 saniye) 90 °C 5 saniye

Tablo 17. RT-PZR ile ekspresyon seviyeleri belirlenen genlerin primer dizileri.

Gen	Sense	Antisense
MLH1	F: 5'- TTA TCC AGC GGC CAG CTA ATG	R: 5'- GCC TCC CTC TTT AAC AAT CAC TT
MSH2	F: 5'- GGA GGA GAG ACT GCT GGA GA	R: 5'- TCC CTT TTT GCC TTT CAA CA
MSH6	F: 5'- CAG TGA ACT GGG GCT GGT AT	R: 5'- CTG CAC CAG GGA ATC TGA AT
CAS3	F: 5'- ATG GAA GCG AAT CAA TGG AC	R: 5'- AGT TTC TGA ATG TTT CCC TGA G
CAS8	F: 5'- GAT GTT ATT CCA GAG ACT CCA G	R: 5'- GGT AGG TAA TCA GCA AAT CCA
CAS9	F: 5'- GGC TCT TCC TTT GTT CAT CTC C	R: 5'- TCA CCA AAT CCT CCA GAA CCA
ATG6	F: 5'- CCATGCAGGTGAGCTTCGT	R: 5'- GAATCTGCGAGAGACACCATC
MGMT	F: 5'- GGG TCT GCA CGA AAT AAA GC	R: 5'- CTC CGG ACC TCC GAG AAC
GAPDH	F: 5'- AGG GCT GCT TTT AAC TCT GGT	R: 5'- CCC CAC TTG ATT TTG GAG GGA

3.2.6. Agaroz jel elektroforezi

Bu tez çalışmasında izole edilen tüm total RNA'lar ile elde edilen cDNA'ların kalitatif değerlendirilmesi için %1'lik agaroz jelde elektroforetik yürütme yapılmıştır.

3.2.7. Akım (Flow) sitometri

SB ve celastrol maddelerinin beyin kanseri hücre serileri üzerinde ki hücre döngüsü etkilerinin saptanması için akım sitometri testi kullanılmıştır. Uygulanan protokol aşağıda verilmiştir.

Hücreler 25cm²'lik flasklara konsantrasyonları 1X10⁶ olacak şekilde ekilmiştir. Serum açlığı uygulandıktan sonra Celastrol'un ve Sodyum Bütiratın önceden belirlenen IC₅₀ değerleri tek tek ve birlikte hücrelere verilmiştir. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ inkübasyon ortamında 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. 72 saatin sonunda tripsine edilen hücreler, 15ml'lik falkon tüplerine standart hücre kültürü teknikleri kullanılarak alınmıştır.

Falkon tüpleri 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılmıştır. Hücrelerin bulunduğu pelet kısmına 3 ml steril PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) eklenerek ikinci kez 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılmış ve pelet kısmını oluşturan hücrelerin üzerine önceki aşamada olduğu gibi 3 ml PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) eklenerek pipetaj yapılarak hücreler tekrar 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından falkon tüpünün içindeki süpernatant kısmı atılmış ve peletin üzerine 2 ml steril PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) eklenmiştir.

Hücreleri fiske etmek üzere falkon tüplerine hafif vorteks eşliğinde yaklaşık 2-3 ml soğuk %99'luk alkol hafifçe damlatılarak ilave edilir. Fiksasyon sağlandıktan sonra hücre akım sitometrisi tekniği kullanılabildiği kadar tüpler +4°C'de saklanmıştır.

Akım sitometrisi ölçüm süreci başladığında tüpteki alkolü uzaklaştırmak için 2 ml steril PBS eklenerek 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda süpernatant kısmı atılmış ve peletin üzerine 70 µl RNase

ve 50 µl Propidium Iodide eklenerek pipetaj yapılmıştır. Ardından örnekler 20 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra hücreler 37 µm'lik nylon mesh yardımıyla süzölmüş ve akım sitometri cihazına alınmıştır. Akım sitometri cihazında (EPICS XL MCL, Beckman Coulter) 10000 hücre sayılmış, hücre döngüsü ve DNA analizi yapılmıştır. G0/G1, sentez ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı ile apoptotik hücre oranı iki değişkenli DNA histogramları MCYCLE (Phonex Sys) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.8. İstatistiksel analiz

Tez çalışması sonucunda toplanan verilerin değerlendirilmesi için SPSS 15.0 paket programından yararlanılmıştır. Tanımlayıcı tipte bir araştırma olan çalışmada değişkenlerle ilgili olarak frekanslar ve yüzdeler verilmiştir. Veriler çeşitli grafikler kullanılarak görsel olarak özetlenmiştir. Kategorik değişkenlerin gruplardaki dağılımlarının test edilmesi için ki-kare veya Fisher'in exact testi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar frekans dağılımları ve yüzdelerin tanımlayıcı istatistik olarak kullanıldığı tablolarla ifade edilmiştir. Bu tez çalışmasında istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

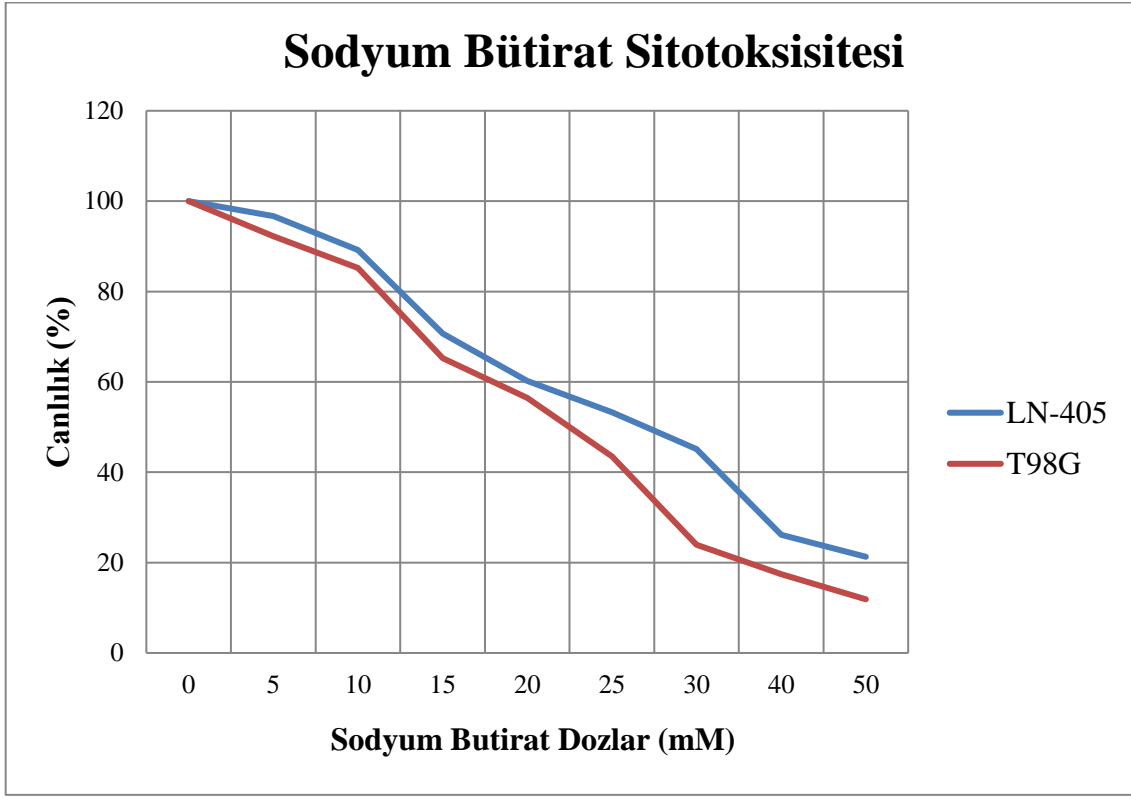
GB hücre serileri üzerindeki olası ölüm, otofaji ve direnç etkileri araştırılan SB ve Celestrol'ün sitotoksi, gen ekspresyon ve akım sitometri sonuçları aşağıda sunulmuştur.

4.1. SB ve Celestrol'ün GB Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitesi

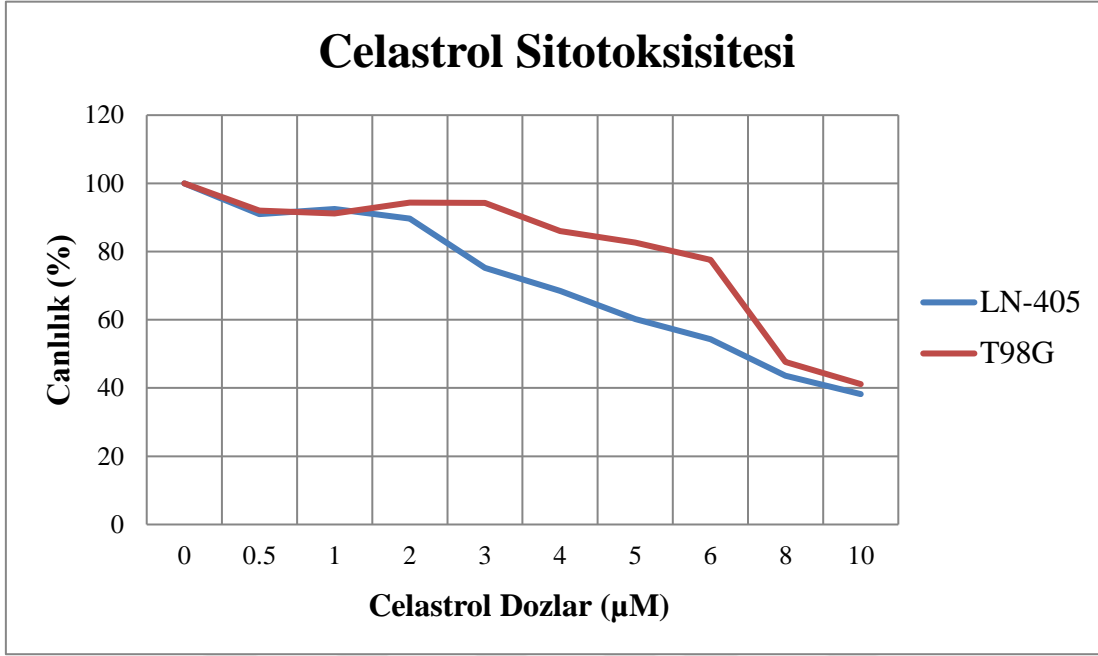
SB ve Celestrol'ün sitotoksik etkisi her 2 hücre serisinde de madde uygulamayı takiben inkübasyonun 72. saatinde saptanmıştır. Bu test her bir hücre serisi için en az 3 defa ve her bir MTT testinde de bir doz için 4 tekrarlı olacak biçimde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen IC₅₀ değerleri ve sitotoksik verilere ait canlılık eğrisi de sırasıyla Tablo 18 ve Şekil 6 ve Şekil 7'de verilmiştir.

Tablo 18. SB ve Celestrol'ün GB hücre serilerindeki IC₅₀ değerleri (72.saat)

Hücre Serisi	SB (mM)	Celestrol (µM)
LN-405	26	6.77
T98G	22.7	9.11



Şekil 6. Sodyum Bütiratın LN-405 ve T98G hücre serileri üzerindeki sitotoksitesi



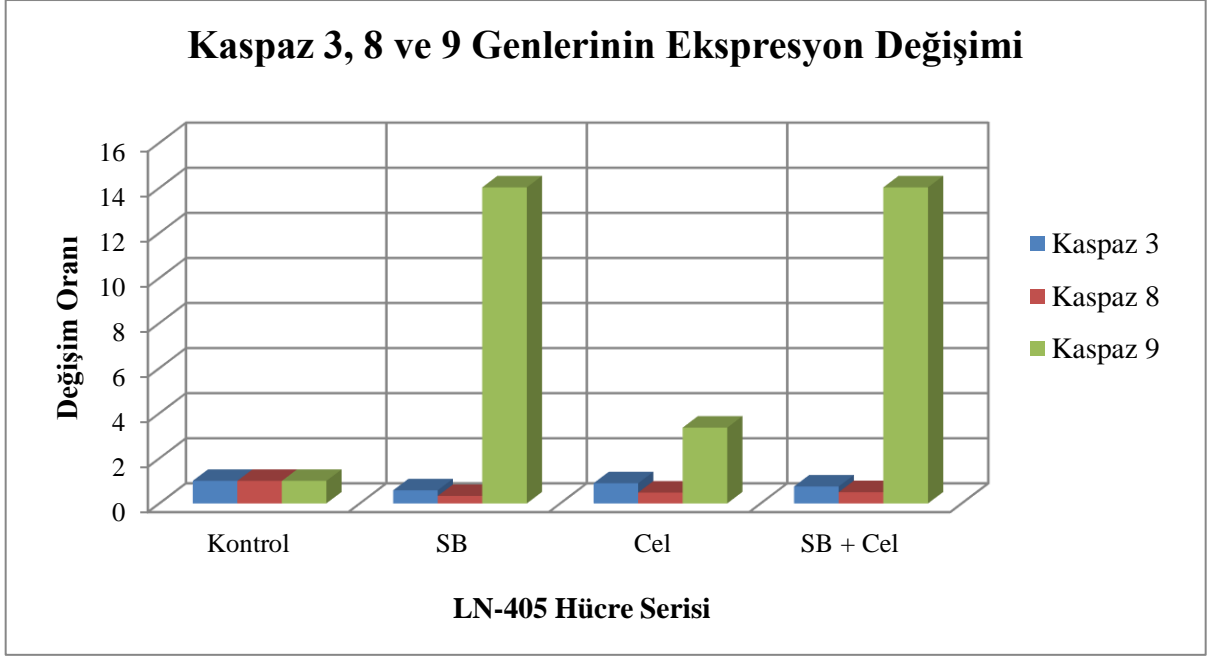
Şekil 7. Celastrol'ün LN-405 ve T98G hücre serileri üzerindeki sitotoksitesi

4.2. Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR) ile Gen Ekspresyon Analizi

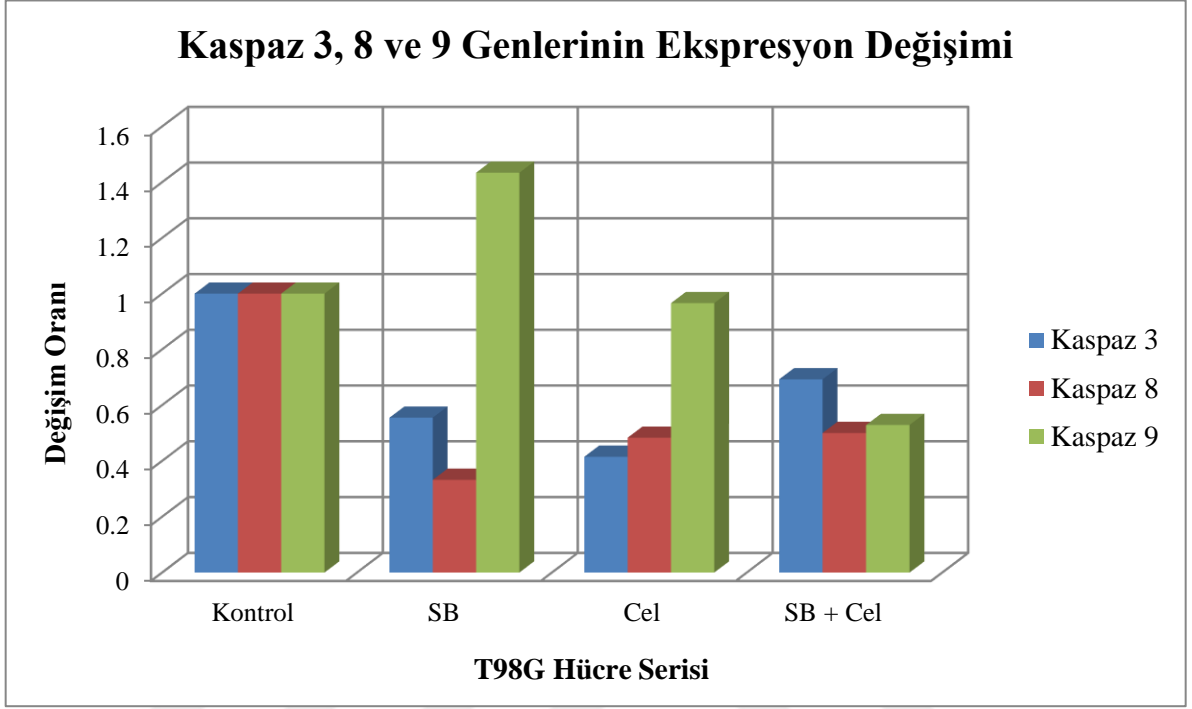
SB ve Celastrol'ün GB hücrelerindeki apoptotik, otofajik ve GB direnç genleri üzerindeki ekspresyon değişikliklerinin saptanması amacıyla 3 tekrarlı RT-PZR yapılmıştır. SB ve Celastrol LN-405 ve T98G hücre serileri ile tek ve birlikte IC_{50} değerlerinde ve IC_{50} değerlerinin saptandığı süre kadar inkübe edildikten sonra gen ekspresyon testleri yapılmıştır. Belirlenen gruplar, LN-405 hücre serisi için "Kontrol, SB (26 mM), Cel (6.77 µM), SB + Cel (26 mM + 6.77 µM), T98G hücre serisi için "Kontrol, SB (22.7 mM), Cel (9.11 µM), SB + Cel (22.7 mM + 9.11 µM) olarak belirlenmiştir.

4.2.1. Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyonu

LN-405 ve T98G GB hücre serilerinde oluşturulan çalışma gruplarında, Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişimleri Şekil 8 ve şekil 9’da verilmiştir.



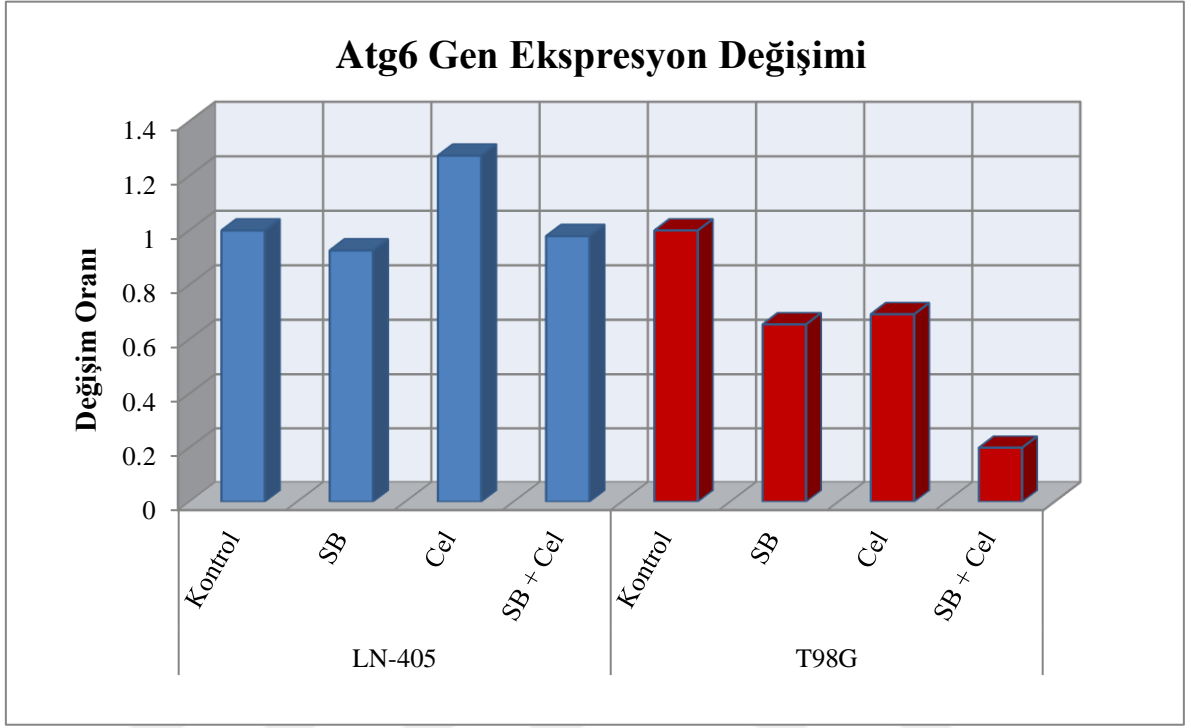
Şekil 8. LN-405 hücre serisinde Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişimleri



Şekil 9. T98G hücre serisinde Kaspaz 3, 8 ve 9 genlerinin ekspresyon değişimleri

4.2.2. Atg6 gen ekspresyonu

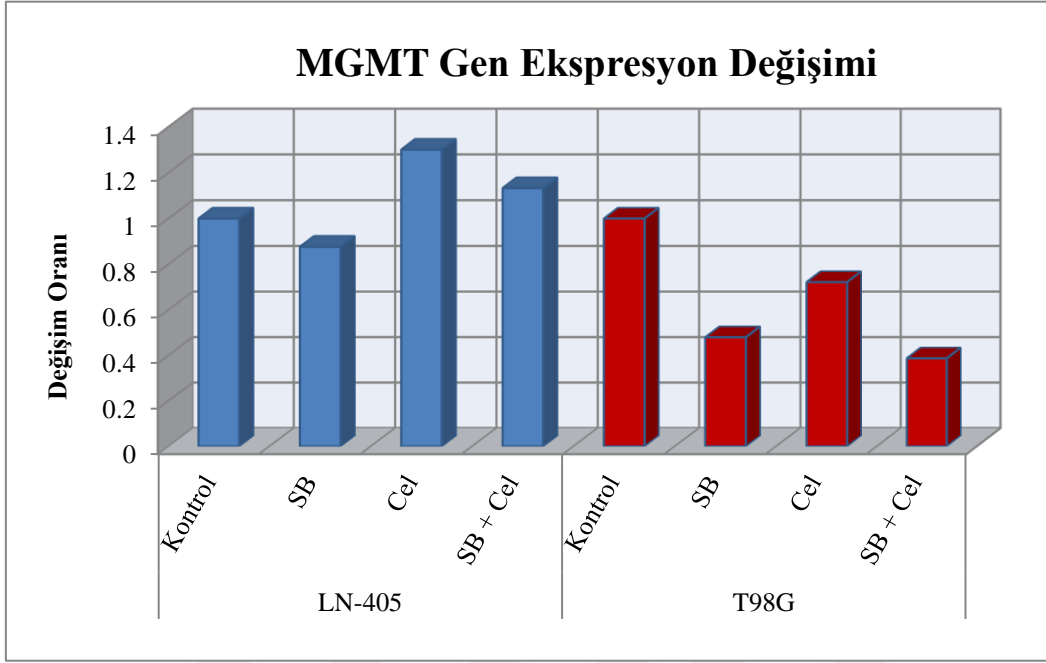
LN-405 ve T98G GB hücre serilerinde oluşturulan çalışma gruplarında, olası otofaji gelişiminin varlığı için Atg6 geninin ekspresyonu araştırılmıştır. Atg6 gen ekspresyon değişimi Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. LN405 ve T98G hücre serilerinde Atg6 gen ekspresyon değişimleri

4.2.3. MGMT Gen ekspresyon değişimi

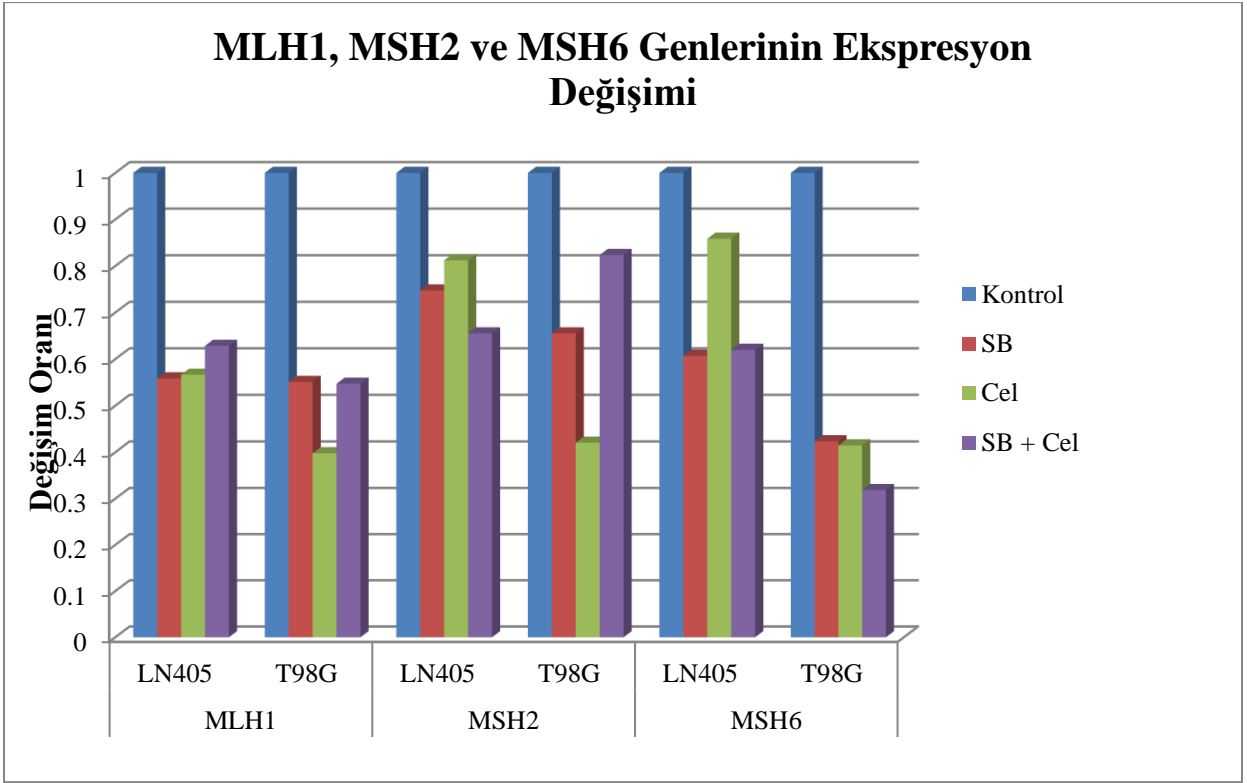
LN-405 ve T98G GB hücre serilerinde oluşturulan çalışma gruplarında, GB kliniğinde genel kemoterapötik dirençten sorumlu gen olan MGMT geninin ekspresyonu araştırılmıştır. MGMT gen ekspresyon değişimi Şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 11. LN405 ve T98G hücre serilerinde MGMT gen ekspresyon değişimleri

4.2.4. MLH1, MSH2 ve MSH6 genlerinin ekspresyon değişimi

LN-405 ve T98G GB hücre serilerinde oluşturulan çalışma gruplarında, GB kliniğinde genel kemoterapötik dirençten sorumlu tamir genlerinden MLH1, MSH2 ve MSH6'nın ekspresyon değişimleri Şekil 12'de verilmiştir.



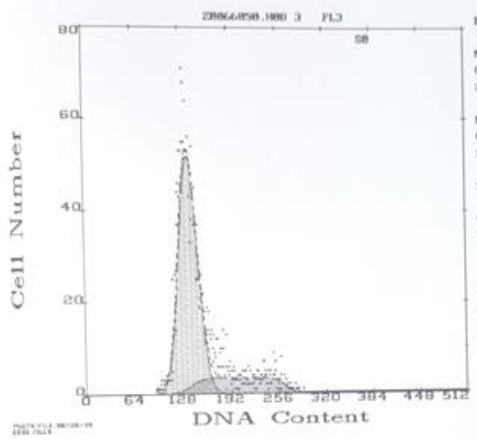
Şekil 12. LN405 ve T98G hücre serilerinde MLH1, MSH2 ve MSH6 gen ekspresyon değişimleri

4.3. Akım Sitometri Analizi

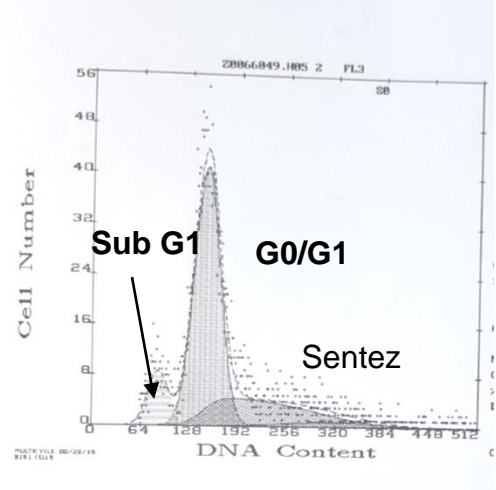
LN-405 ve T98G GB hücre serilerinde oluşturulan çalışma gruplarında, SB ve Celastrol moleküllerinin IC₅₀ değerlerindeki hücre döngüsüne olan etkilerine ait histogramlar Şekil 13’de ve Şekil 14’de verilmiştir. Ayrıca histogramlardan elde edilen veriler Tablo 19 ve Şekil 15’de gösterilmiştir. Moleküllerin hücre döngülerine etkileri açısından hücre serilerinde ki gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmıştır (≤ 0.05). LN-405 hücre serisinde kontrol ile SB, kontrol ile SB + Cel ve SB ile Cel arasında hücre döngüsü açısından anlamlı fark saptanmıştır. T98G hücre serisinde ise kontrol ile Cel ve SB + Cel arasında, SB ile SB + Cel arasında ve Cel ile SB + Cel arasında anlamlı fark saptanmıştır.



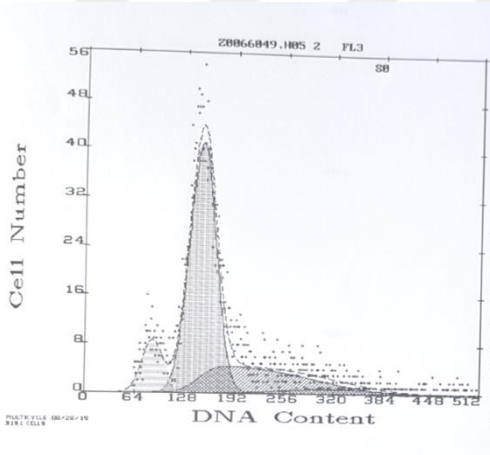
LN-405 Kontrol



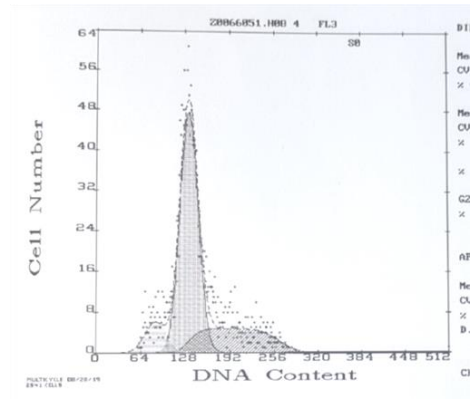
LN-405 Celestrol



LN-405 SB + Celestrol

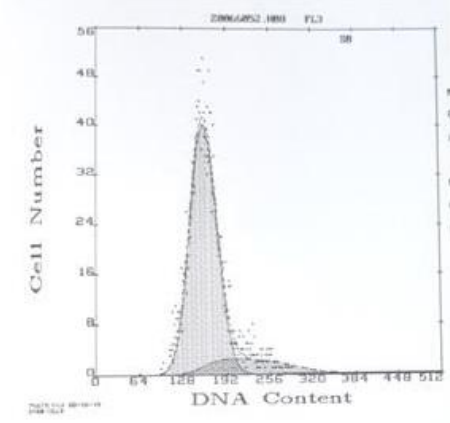


LN-405 SB

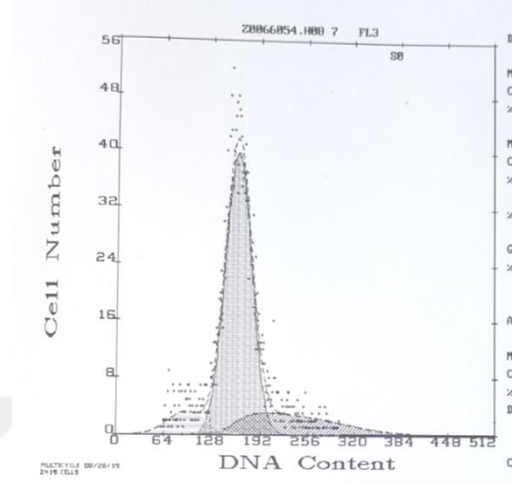


Şekil 13. LN-405 hücre serisine ait akım sitometri histogramı

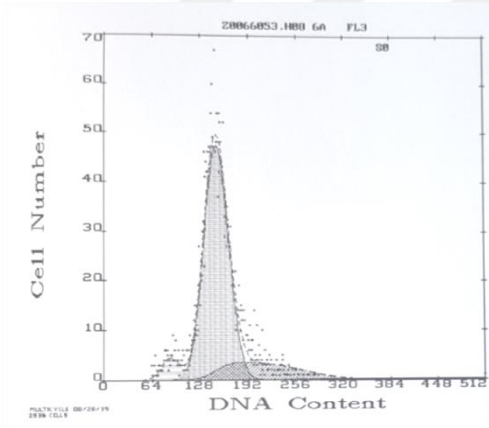
T98G Kontrol



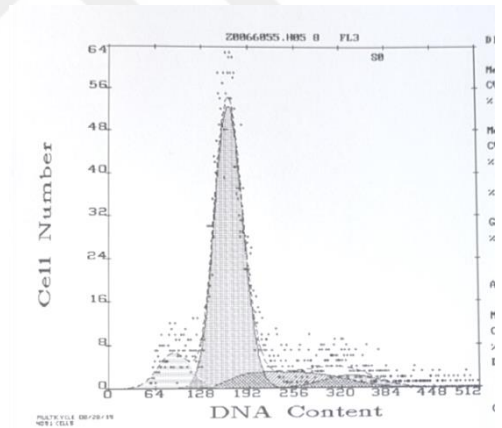
T98G Celestrol



T98G SB



T98G SB + Celestrol

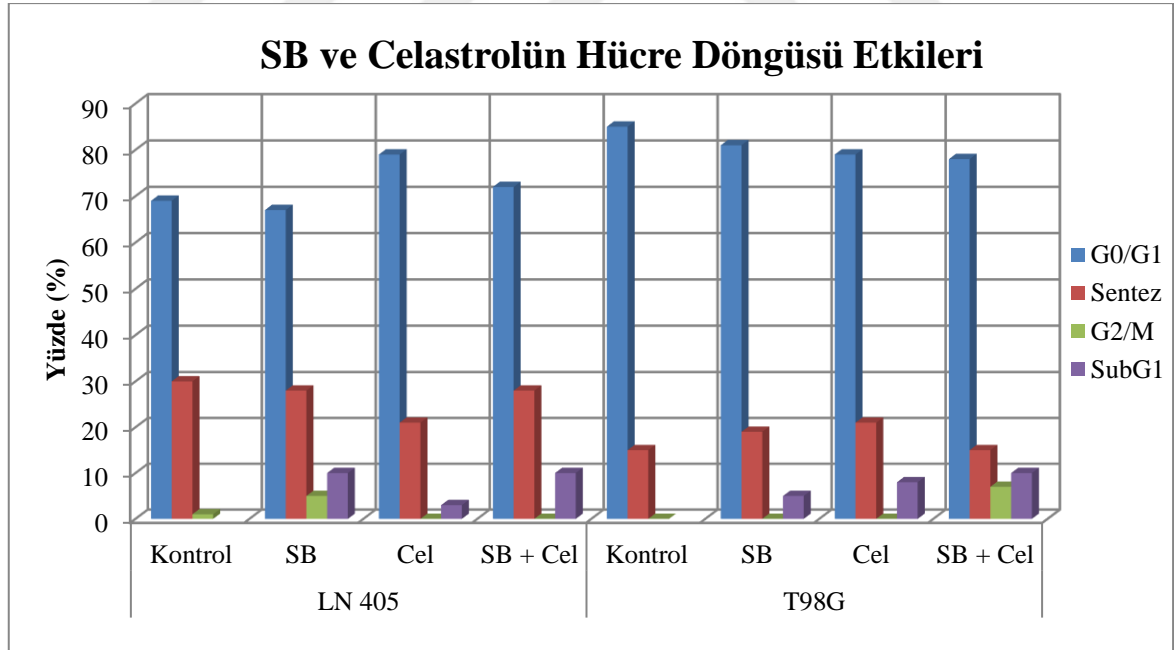


Şekil 14. T98G hücre serisine ait akım sitometri histogramı

Tablo 19. LN-405 ve T98G hücrelerinde SB'nin ve Celastrol'ün Hücre Döngüsüne Etkisi

Grup	Karşılaştırma Grubu	LN-405	T98G
Kontrol	SB	0,006	0,066
	Cel	0,101	0,012
	SB+Cel	0,014	0,001
SB	Cel	0,015	0,679
	SB+Cel	0,159	0,028
Cel	SB+Cel	0,088	0,042

SB: Sodyum Bütirat, Cel: Celastrol



Şekil 15. SB ve Celastrol'ün hücre döngüsü etkilerinin yüzde gösterimi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında; HDAC inhibitörü SB ve proteozom inhibitörü Celastrol'un LN-405 ve T98G GB hücre serilerinde apoptoz, otofaji ve DNA tamir enzimleri genlerinin ekspresyonu ile yine bu moleküllerin hücre döngüsü üzerine olan etkileri araştırılmıştır. SB ve Celastrol tek ve kombinasyon formunda IC₅₀ değerinde hücrelere uygulandıktan sonra apoptoz, otofaji ve klinik açıdan GB'de kemoterapötik dirençte ve hücrenin yaşam ölüm çizgisinde karar verici olduğu bilinen MGMT, MLH1, MSH2, MSH6, Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9 ve Atg6 genlerinin ekspresyonları RT-PZR ve hücre döngüsüne olan etkileri de akım sitometrisi ile saptanmıştır.

5.1. SB ve Celastrol Sitotoksitesi

Literatürde, SB'nin kanser hücreleri üzerindeki etkisine ilişkin onlarca çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda SB'nin IC₅₀ değerinin zamana ve doza bağlı olarak birbirinden farklı bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak genel olarak zamana bağlı değişen IC₅₀ değerleri değerlendirildiğinde 48-72 saat SB inkübasyonunun kanser hücrelerindeki sitotoksik değeri ortalama 1,5-20 mM arasında değişmektedir (Herbert ve ark., 2001; Joachimiak ve ark., 2007; Wang ve ark., 2016; Salimi ve ark., 2017; Xu ve ark., 2018; Sefat ve ark., 2019).

Literatürde aynı tür kanser hücre serilerinde ve hatta aynı hücre serilerinde dahi farklı SB duyarlılığının varlığı gösterilmiştir. Sefat ve ark (2019) SW480 ve HCT116 kolorektal kanser hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada 1, 2.5 ve 5 mM SB'nin sitotoksik bir etkisinin olmadığını fakat 10 ve 20 mM SB'nin 72 saatte hücrelerin büyük çoğunluğunun öldüğünü göstermiştir. Yine kolorektal kanser hücre serileri üzerinde yapılan çalışmalarda; Zhang ve ark. (2016) HT-29 ve HCT116 hücrelerinin 24 saat 2 mM SB inkübasyonu sonunda HCT-116 hücrelerinin ~ %25'nin, HT-29 hücrelerinin ~ %10'unun öldüğünü, Xu ve ark. (2018) HCT116 hücrelerinin 24 saat SB inkübasyonu sonunda hücrelerin IC₅₀ değerinin 2.5 mM olduğunu, Zhou ve ark. (2019) W480 ve

HCT116 hücrelerinin 24 saat 2 mM SB inkübasyonu sonunda hücre proliferasyonunun ~ % 40 oranında inhibe olduğunu göstermiştir. Salimi ve ark. (2017) MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücreleri üzerinde yaptığı çalışmalarda 48 saat boyunca 5 mM ve 10 mM SB ile muamelesi sonucunda MCF-7 hücrelerinin sırasıyla yaklaşık %27 ve %40, MDA-MB-468 hücrelerinin ise sırasıyla %30 ve %43 oranında öldüğünü göstermiştir. Wang ve ark. (2016) MCF-7 hücrelerinin 48 saatlik SB IC₅₀ değerini 10 mM olarak bildirmiştir. Hücre serilerinin kendi ve birbirleri arasındaki IC₅₀ değerlerinin farklı saptanmasının temel nedenlerini, hücrelerin pasaj sayısı farklılığı, kullanılan medyum çeşidi, sitotoksosite metot farklılığı şeklinde özetleyebiliriz.

Bu tez çalışmasında kullanılan LN-405 ve T98G hücrelerinden T98G'nin LN-405'e göre SB'ye daha duyarlı olduğu bulunmuştur. LN-405 ve T98G'nin epigenetik yapısının farklı olduğu bilinmektedir (Munoz J ve ark., 2011). Bu hücrelerin ikisinin de GB kökenli olmasına rağmen SB duyarlılığının farklılığı hücrelerin aslında genomik ve epigenomik yapılarının farklı olduğunu ve bu farklılıkların sinyal yollarından tutun da proliferasyon kabiliyetlerine kadar birçok sinyal yolağında değişikliğe yol açabileceğini dolayısıyla ilaçlara olan yanıtlarının da farklı olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, GB hücreleri ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda A-172, T98G ve U118MG hücreleri 2 mM SB'ye maruz bırakılarak 48 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin yaklaşık yarısının öldüğü gösterilmiştir (Herbert ve ark., 2001). Joachimiak ve ark. (2007) Glioblastoma C6 hücrelerinin SB IC₅₀ değerlerini 24 saatlik uygulama için 8.44 mM, 48 saatlik uygulama için 3.44 mM olarak saptamıştır. Başka bir çalışmada Tsung ve ark. (2017) GB 4910 ve 5310 hücrelerinin SB IC₅₀ değerinin 2,5 mM olduğunu bildirmiştir. Nakagawa ve ark. (2018) A-172 hücrelerinde 72 saatlik SB uygulamasının sonucunda IC₅₀ değerinin yaklaşık 4 mM olduğunu bildirmiştir.

Bu tez çalışmasında SB için elde edilen IC₅₀ değerleri 72 saat için yukarıdaki literatüre göre görece yüksek bulunmasının nedenleri; çalışmada kullanılan LN-405 ve T98G'nin genetik ve epigenetik yapısı ile test yöntemi ve diğer kültür unsurlarını

çeşitliliğinden kaynaklanabilir. Bundan dolayı hücre kültür çalışmalarında her veri kendi testi içerisinde bağımsız olarak değerlendirilmelidir.

Literatür göre Celastrol'ün farklı kanser hücrelerinde sitotoksitesinin araştırıldığı ve zamana bağlı olarak farklı IC₅₀ değerlerinin olduğu tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2012; Ge ve ark., 2013; Yan ve ark., 2014; Maysinger ve ark., 2017; Ren ve ark., 2017; Cha ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2019).

HepG2 ve Hepa1-6 karaciğer kanser hücrelerinde Celastrol IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 3.37 ve 2.55 µM olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2019). Ge ve ark. (2013) tarafından Fare C6 Glioma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada Celastrol'ün IC₅₀ değeri 2.56 µM olduğu belirlenmiştir. Huang ve ark. (2012) kemik iliğinden türetilen endoteliyal progenitor hücreler üzerinde yaptıkları çalışmada 2 µM Celastrol'ün hücrelerin büyük bir çoğunluğunun ölümüne sebep olduğu göstermiştir. Yan ve ark. (2014) HepG2 hücre serisi üzerinde yaptıkları çalışmada Celastrol'ün IC₅₀ değerini yaklaşık 4 µM olarak belirlemiştir. Ren ve ark. (2017) hepatoselüler karsinom hücre serileri olan HepG2 ve Bel7402 için Celastrol'ün IC₅₀ değerleri sırası ile ~2.5µM ve ~0.625µM olduğunu belirlemiştir ve bunun sonucunda hem çeşitli karaciğer kanseri hücre serilerinde hemde oral skuamöz hücreli karsinom (OSSC) hücrelerinde yaptıkları çalışmalarda hücre serilerinin aynı kanser tipinden elde edilmiş olmasına rağmen farklı Celastrol duyarlılığına sahip olduğu saptamıştır. Bu tez çalışması kapsamında da, iki farklı GB hücre serisinde Celastrol yanıtının farklı olduğu saptanmıştır. Bu durum Celastrol yanıtının metabolik ve genomik temelli heterojeniteye bağlı olabileceğini göstermektedir.

Cha ve ark. (2019) GB hücre serileri olan U87-MG, U251N, LN229'un 24 saat boyunca Celastrol'e tabi tutulduktan sonra elde edilen IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 1.216, 2.219, 4.576 µM olarak saptandığını bildirmektedir. Maysinger ve ark. (2017) tarafından U251N hücreleri üzerinde yapılan sitotoksite çalışmasında Celastrol'ün IC₅₀ değerini 1.5 µM olarak saptandığı belirtilmiştir. Boridy ve ark. (2014) U251N

hücrelerinde yaptıkları çalışmada 4 µM Celastrol'un hücrelerin yarısından fazlasını öldürdüğünü göstermiştir. Wang ve ark. (2018) T98G ve LN18 hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda Celastrol IC₅₀ değerlerini yaklaşık 5 µM bulmuşken, LN229 ve U87 hücreleri için 1 µM olduğunu bulmuştur. Bu tez çalışmasında GB hücreleri için elde edilen Celastrol IC₅₀ verilerinin literatürle uyumlu olduğu belirlenmiştir.

5.2. SB ve Celastrol'un Apoptoz, Otofaji ve Hücre Döngüsüne Etkisi

Kanser hücrelerinde HDAC etkinliğinin arttığı bilinmektedir (Taylor ve ar., 2019). Bu nedenle kanserde HDAC inhibitörü kullanmak akılcı bir terapötik yoldur. Literatürde HDAC inhibitörü olarak SB'nin terapötik ilişkisi bilinmesine rağmen GB'de SB'nin apoptotik etkisine ilişkin az sayıda çalışma bulunmaktadır (Engelhard ve ark., 2001; Sawa ve ark., 2001; Tsung ve ark., 2017; Taylor ve ark., 2019). Ayrıca, SB'nin glioma hücresi A172'de hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, hücreleri senesense sürüklediği bu nedenle GB'de SB kullanımının tedavi stratejisi olabileceği belirtilmektedir (Nakagawa ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında da SB uygulaması sonrasında her iki hücre serisinde de otofaji olmadan Kaspaz 9 üzerinden hücrelerin apoptoz sürecine girdiği saptanmıştır. SB gibi bir metilasyon ve HDAC inhibitör ajanının otofaji olmadan apoptoza sürüklenmesi beklenen bir durumdur ve sonucumuz literatürle uyumludur (Sawa ve ark., 2001; Tsung ve ark., 2017; Taylor ve ark., 2019).

Celastrol'un kanser hücrelerinin ölüm mekanizmasına ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu yayınlardan bir kısmında Celastrol'un apoptotik hücre ölümünü indüklediği bildirilirken (Kannaiyan ve ark., 2011; Cano ve ark., 2013; Kashyap ve ar., 2018; Yadav ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019) bir kısmında da otofajiyi indüklediği rapor edilmiştir (Xu ve ark., 2016; Li ve ark., 2019; Xu ve ark., 2020) Ayrıca, Celastrol uygulamasında apoptoz ve otofaji öncesi öncül ölüm modelinin paraptosiz olduğu da belirtilmektedir (Lee ve ark., 2016). Glioblastoma örneklerinde de apoptoz (Cha ve ark.,

2019) ve otofajinin (Boridy ve ark., 2014) indüklendiğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca literatürde Celastrol'un glioblastoma hücrelerine etkisine ilişkin yalnızca yedi adet çalışma tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında da Celastrol uygulanan LN-405 hücrelerinde Kaspaz 3 ekspresyonu kontrol grubu ile aynı düzeyde iken Kaspaz 9 ekspresyonu kontrole göre 3 kat artmıştır. T98G hücrelerinde ise Kaspaz ekspresyonlarının kontrole göre değişmediği saptanmıştır. Kaspaz ekspresyonunda değişimin olmaması Celastrol'un hücre spesifik etki gösterebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca inkübasyon süresi, Celastrol'un hücreyi apoptoza götürmesi adına T98G için yeterli olmayabileceği gibi yukarıda belirtildiği üzere otofaji ve apoptoz öncesi hücre paraptosis sürecine girmiş olabilir. Çünkü LN-405 hücre serisinde otofaji belirteci Atg6 ekspresyonu yalnızca 1.2 kat artmış saptanırken T98G hücresinde Atg6 ekspresyonu 1.4 kat azalmıştır. Hücrelerin Atg6 ekspresyonları Kaspaz ekspresyonları ile karşılaştırıldığı LN-405 otofaji sonrası apoptoz süreci başlatmışken T98G hücresinde paraptosis süreci yaşanmış olabilir. Bu apoptoz ve otofaji verileri Celastrol'un hücre ölüm mekanizmalarını hücre spesifik yönetirken paraptosis ve otofaji yolağı süreçlerini yaşayabileceğini ve bu süreçler paralelinde apoptozla sonuçlanan hücre ölümünü tetiklediği belirtilebilir. Lee ve ark. (2016), Celastrol uygulaması sonrası paraptosise paralel olarak HeLa hücrelerinde otofaji ve apoptozun indüklendiğini bildirmiştir. Bu Celastrol gibi proteozom inhibitörü moleküllerin etki mekanizmaları göz önüne alındığında olması muhtemel süreçlerdir. Çünkü, ubikutinlenmiş proteinlerin birikmesi, endoplazmik retikulum aracılı vakuolizasyona neden olurken organelleri kurtarmak isteyen hücre için de otofaji kaçınılmaz tercih olacaktır. Otofajinin uzun sürmesi de apoptozu tetikleyecektir. Bu algoritmada zamana bağlı olarak otofaji ve apoptozisin araştırılması gerektiği kadarı paraptozinin de mutlaka araştırılması gerekmektedir.

GB tedavisinde, HDACi'lerin proteozom inhibitörleriyle birlikte kullanılabilirliğini gösteren az sayıdaki çalışmada (Yu ve ark., 2008; Asklund ve ark., 2012; Premkumar ve ark., 2013) proteozom inhibitörü Bortezomibin HDACi molekülleriyle birlikte kullanımının glioma hücrelerinde DNA hasarını arttırdığı ve

apoptoza neden olduğu bildirilmiştir. Das ve ark. (2020) yaptıkları in siliko analizde, GB tedavisinde HDACi ve proteozom inhibitörlerinin birlikte kullanımını p53 mutant GB'lerde etkili olabileceğini belirtmiştir. Az sayıdaki literatüre göre, HDACi ve proteozom inhibitör kombinasyonları GB için önemli bir alternatif tedavi stratejisidir. Be nedenledir ki bu tez çalışmasında kan beyin bariyerini rahatlıkla geçen SB ve güçlü bir proteozom inhibitörü olarak bilinen Celastrol seçilmiştir. Ancak literatürde tüm kanser türleri dâhilinde SB ve Celastrol'ün birlikte kullanıldığı her hangi bir yayın tespit edilememiştir. Bu açıdan elde edilen verilerin literatüre katkısı önemlidir. SB ve Celastrol LN-405 hücresinde birlikte kullanıldığında SB'nin apoptotik etkisinin Celastrol varlığında devam ettiği ancak T98G'de kontrole göre azaldığı tespit edildi. Bu T98G'nin LN-405'e göre hem Celastrol'e hemde SB ile birlikte kullanımına biraz daha dirençli olduğunu göstermektedir. Sitotoksik değerlerden de bu durum anlaşılmaktadır. SB ve Celastrol'ün birlikte kullanımında da Atg6 ekspresyonunun azalması, kombinasyonda SB'nin, Celastrol'ün olası otofajik etkisini azaltabileceğine işaret etmektedir. Hem apoptoz hemde otofaji sonuçları bu iki molekülün GB'de paraptoz ve otofaji süreçleri yerine apoptozisi destekleyebileceğini göstermektedir. Bu tez çalışması SB ve Celastrol'ün apoptotik ve otofajik etkisinin araştırıldığı literatürdeki ilk çalışmadır.

SB ve Celastrol'ün hücre döngülerine olan etkileri değerlendirildiğinde, literatürde, SB'nin G0/G1'de hücre birikmesine neden olduğu (Engelhard ve ark., 2001) ve G1/S geçişini bloke ettiği (Sawa ve ark., 2001), Celastrol'ün ise glioblastoma dahil kanserlerde, G2/M duraklamasına (Ren ve ark., 2017; Yadav ve ark., 2018; Liu ve ark., 2019) neden olduğu bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında LN-405 hücre serisinde SB ve SB ile Celastrol'ün birlikte kullanımında kontrole göre hücrelerin apoptoza gittiği ve gruplar arasında anlamlı farkların olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SB'nin her iki hücrede de apoptotik süreci tetiklediği akım sitometri ile gösterilmiştir. Celastrolde uygulanan grupta, LN-405 hücre serisinde kontrole göre SubG1 artışının varlığı Celastrol'ünde apoptotik etkisinin var olduğunu göstermektedir. Ancak T98G'de SubG1

artışı ile saptanan apoptotik eğilimin gen ekspresyonu sonuçları arasındaki fark T98G’de yukarıda belirtilen paraptosis sürecinin yaşanmasından kaynaklanabilir. Bu da yine Celestrol’ün hücre spesifik etkisinin farklı düzeylerde olabileceğini göstermektedir. Literatürde SB ve Celestrol’ün birlikte kullanımının hücre döngüsü üzerine etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması, SB ve Celestrol’ün birlikte GB hücresinde SubG1 artışına neden olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

5.3. SB ve Celestrol’ün DNA Tamir Genlerinin Ekspresyonuna Etkisi

SB’nin MGMT, MLH1, MSH2 ve MSH6 gen ekspresyonlarına olan etkisine ilişkin literatürde her hangi bir çalışma tespit edilmemiştir. Bir çalışmada dolaylı olarak SB’nin glioma üzerindeki antiapoptotik mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır (Tsong vbe ark., 2017). Bu çalışmada, SB’nin glioblastomada antiapoptotik etkisini HEY1 isimli bir gen üzerinden yaptığı rapor edilmiştir. SB’nin, HEY1 geni metilasyonuna neden olduğu, HEY1 metilasyonu sonrası DNMT ekspresyonunun arttığı ve dolayısıyla onkogenlerin metilasyonu aracılığıyla antiapoptotik etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu arada HDAC’ların ekspresyonunu arttıran HEY1 geninin metilasyonu HDAC’ların azalmasına ve sonuçta SB’nin dolaylı yoldan HDAC inhibitör ve antiapoptotik etki gösterdiği bildirilmiştir (Tsong ve ark., 2017). DNA tamir genlerinin oluşumu ve progresyonunda en etkili olduğu kanser tipi kolorektal kanserdir. Bu kanser türünde yapılan çalışmaların sonuçları arasında da SB’nin tamir genleri arasındaki ilişkiyi ait çelişkili sonuçlar yer almaktadır (Coxhead ve ark., 2005; Sun ve Zhu ve ark., 2018). Coxhead ve ark., (2005) MMR negatif hücrelerde SB’nin daha etkili olduğunu belirtirken, Sun ve Zhu (2018) MLH1 eksikliğinde SB’nin apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Bultman ve Jobin (2014) ise kolonda mikrobiyal kökenli SB’nin epiteliyal kökenli hücrelerin proliferasyonunu tetiklediğini dolayısıyla SB’nin bir onkometabolit olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kolon kanseri çalışmaları göstermiştir ki SB’nin HDAC inhibitör etkisi metilasyon üzerinden gerçekleşebilmektedir (Sun ve Zhu, 2018) ve SB aynı zamanda bir metilasyon ajanı potansiyeline sahiptir (Cosgrove ve Cox, 1990).

SB'nin hücrel etkilerine ilişkin öne sürülen veriler bu tez çalışmasında SB'nin GB üzerindeki etkisinin araştırılmasını daha da önemli kılmaktadır. Bu tez çalışmasında SB molekülü MGMT, MLH1, MSH2 ve MSH6 genlerinin ekspresyonunu her iki hücre serisinde de azaltmıştır. Tamir genlerindeki ekspresyon azalması SB'nin kolorektal kanserde öne sürülen metilasyon potansiyeliyle ilişkili olabilir. SB'nin GB hücrelerindeki tamir genlerinin ekspresyonuna ilişkin etkisi literatüre ilk kez bu tez çalışması ile sunulmuştur.

Celastrol'ün MGMT, MLH1, MSH2 ve MSH6 gen ekspresyonlarına olan etkisine ilişkin literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Celastrol uygulaması sonrası MGMT geni her iki hücrede de kontrol ile benzer düzeyde saptanmıştır. Celastrol MLH1, MSH2 ve MSH6 genlerinin ekspresyonunu her iki hücre serisinde de azaltmıştır. Bu sonuç, Celastrol'ün GB tedavisinde radyoterapi ile birlikte kullanılabilirliğine işaret etmektedir. GB'de Celastrol'ün tamir genlerinin ekspresyonuna etkisi ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır.

SB ve Celastrol birlikte kullanıldığında ise MGMT geninin ekspresyonu LN-405'te kontrol ile aynı iken T98G hücresinde azalmıştır. Bu sonuç, SB ve Celastrol'ün birlikte kullanımının GB'de MGMT aracılı direncin üstesinden gelmek için kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak ilgili kombinasyon MLH1, MSH2 ve MSH6 genlerinin ekspresyonunu kısmen azaltmıştır. Genel olarak kanserlerde MMR genlerinin azalması hücrede yeni mutasyonların artmasına neden olabilir. Yeni mutasyonlar hücrenin ölümüne yol açabileceği gibi genomik kararsızlığı artması ile hücreyi radyoterapiye duyarlı hale getirebilir. Dolayısıyla SB ve Celastrol'ün birlikte kullanımının GB'de kullanılabilir. Ancak bu verilerin ve etki mekanizmasının, GB mikroçevresinin modellendiği ve GB ekstraselüler ortamının temsil edildiği organoid modellerde doğrulanması ve yolakta yer alan baz eksizyon ve Parp genleri de çalışılarak daha detaylı incelenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışması SB ve Celastrol'ün tek ve

birlikte kullanımını ile GB kemoterapötik direncine ait temel bir takım veriler sunmaktadır.

Bu tez çalışması bir takım yeni ve önemli veriler sunmakla birlikte kapsamında birçok sınırlılıkları barındırmakta ve geliştirilmesi gereken yönlerde sahiptir. Çalışmanın sınırlılıklarını ve gelecek projelerde yapılması önerilen kısımları a) direnç genlerinin ekspresyonlarının doza ve zamana bağlı olarak b) farklı gruplarda c) TMZ gibi bir alkilasyon ajanı kullanılarak d) asetilasyon, metilasyon ve protein seviyelerinin e) 3 boyutlu kültür (sferoid, organoid, mikroakışkan gibi) türlerinde incelenmesi şeklinde özetleyebiliriz. Ayrıca paraptosis, otofaji ve apoptoz genlerinin bir bütün olarak incelenerek doza ve zamana bağlı hücre döngüsü analizlerinin yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Sonuçlarımız bu eksikliklerin giderilerek daha detaylı moleküler genetik çalışmaların yapılmasının önemini göstermektedir. Bu tez çalışması, GB’de, olası yeni bir tedavi yaklaşımı için prelinik temel veri sunmaktadır.

Sonuç olarak;

- Bu tez çalışmasıyla, GB hücrelerinde SB ve Celestrol için yeni sitotoksosite verileri sunulmuştur.
- Bu tez çalışması; SB ve Celestrol’ün apoptotik ve otofajik etkisinin araştırıldığı literatürdeki ilk çalışmadır.
- Bu tez çalışması GB’de SB ve Celestrol’ün birlikte kullanıldığı ve hücre döngüsüne etkilerinin araştırıldığı literatürdeki ilk çalışmadır.
- Bu tez çalışması, SB ve Celestrol’ün GB hücrelerindeki tamir genlerinin ekspresyonuna ilişkin etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.
- Bu tez çalışması, SB ve Celestrol’ün GB’de kullanılmasının mümkün olabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

- Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther.* 2015 Aug;152:63-82.
- Almond, JB, Cohen, GM, The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy, *Leukemia*, 16, 433-43, 2002.
- Asklund T, Kvarnbrink S, Holmlund C, Wibom C, Bergenheim T, Henriksson R ve ark. Synergistic killing of glioblastoma stem-like cells by bortezomib and HDAC inhibitors. *Anticancer Res.* 2012 Jul;32(7):2407-13.
- Baehring JM, Betensky RA, Batchelor TT. Malignant peripheral nerve sheath tumor: the clinical spectrum and outcome of treatment. *Neurology.* 2003 Sep 9;61(5):696-8.
- Baker SJ, McKinnon PJ. Tumour-suppressor function in the nervous system. *Nat Rev Cancer.* 2004 Mar;4(3):184-96.
- Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol.* 2012 Dec;6(6):579-89.
- Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 2008 Nov 6;60(3):430-40.
- Bayin NS, Modrek AS, Placantonakis DG. Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications. *World J Stem Cells.* 2014 Apr 26;6(2):230-8.
- Bedford A, Gong J. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Anim Nutr.* 2018 Jun;4(2):151-159.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):669-81.
- Boridy S, Le P, Petrecca K, Maysinger D. Celastrol targets proteostasis and acts synergistically with a heat-shock protein 90 inhibitor to kill human glioblastoma cells. *Cell Death Dis.* 2014 May 8;5(5):e1216.
- Braun K, Ahluwalia MS. Treatment of Glioblastoma in Older Adults. *Curr Oncol Rep.* 2017 Oct 26;19(12):81.
- Bultman S.C, Jobin C. Microbial-derived butyrate: an oncometabolite or tumorsuppressive metabolite. *Cell Host Microbe.* 2014 Aug 13;16(2):143-145.
- Bush NA, Chang SM, Berger MS. Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurg Rev.* 2017 Jan;40(1):1-14.

- Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett.* 2008 Sep 28;269(1):7-17.
- Clarke J, Butowski N, Chang S. Recent advances in therapy for glioblastoma. *Arch Neurol.* 2010 Mar;67(3):279-83.
- Cosgrove DE, Cox GS. Effects of sodium butyrate and 5-azacytidine on DNA methylation in human tumor cell lines: variable response to drug treatment and withdrawal. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Sep 10;1087(1):80-6.
- Coxhead JM, Williams EA, Mathers JC. DNA mismatch repair status may influence anti-neoplastic effects of butyrate. *Biochem Soc Trans.* 2005 Aug;33(Pt 4):728-9.
- Croft W, Dobson KL, Bellamy TCM. Plasticity of Neuron-Glial Transmission: Equipping Glia for Long-Term Integration of Network Activity. *Neural Plast.* 2015;2015:765792.
- Dai Y, DeSano JT, Meng Y, Ji Q, Ljungman M, Lawrence TS ve ark., Celestrol potentiates radiotherapy by impairment of DNA damage processing in human prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Jul 15;74(4):1217-25.
- Das S, Deng X, Camphausen K, Shankavaram U. Synthetic Lethal Drug Combinations Targeting Proteasome and Histone Deacetylase Inhibitors in TP53-Mutated Cancers. *Arch Cancer Biol Ther.* 2020; 1(2): 42–47.
- Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs.* 2016 Oct 1;20(5 Suppl):S2-8.
- Dixit D, Xie Q, Rich JN, Zhao JC. Messenger RNA Methylation Regulates Glioblastoma Tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2017 Apr 10;31(4):474-475.
- Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol.* 2016 Jun 28;4:71.
- Dou QP, Li B. Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Updat.* 1999 Aug;2(4):215-223.
- Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 1;18(7). pii: E1414.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008 Mar 13;358(11):1148-59.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha ve ark. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000 Nov 9;343(19):1350-4.

- Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Sep;13(9):673-91.
- Farid M, Demicco EG, Garcia R, Ahn L, Merola PR, Cioffi A ve ark. Malignant peripheral nerve sheath tumors. *Oncologist.* 2014 Feb;19(2):193-201.
- Frankland-Searby S, Bhaumik RS, The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy, *Biochimica. et Biophysica. Acta.*, 1825, 64–76, 2012.
- Frost JL, Schafer DP. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol.* 2016 Aug;26(8):587-597.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A ve ark. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007 Nov 1;21(21):2683-710.
- Gerson SL. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2004 Apr;4(4):296-307.
- Grigoryan T, Birchmeier W. Molecular signaling mechanisms of axon-glia communication in the peripheral nervous system. *Bioessays.* 2015 May;37(5):502-13.
- Gusyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Semin Cancer Biol.* 2018 Aug;51:50-58.
- Han X, Sun S, Zhao M, Cheng X, Chen G, Lin S ve ark. Celastrol stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity in tumor cells by initiating the ROS/Akt/p70S6K signaling pathway and enhancing hypoxia-inducible factor-1 α protein synthesis. *PLoS One.* 2014 Nov 10;9(11):e112470.
- Hassane DC, Guzman ML, Corbett C, Li X, Abboud R, Young F ve ark. Discovery of agents that eradicate leukemia stem cells using an in silico screen of public gene expression data *Blood.* 2008 Jun 15;111(12):5654-62.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M ve ark. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
- Herbert H. E, Holly A. D, Peggy S. C, Linda V.E. Therapeutic effects of sodium butyrate on glioma cells in vitro and in the rat C6 glioma model. *Neurosurgery.* 2001 Mar;48(3):616-24; discussion 624-5
- Hornig J, Fröb F, Vogl MR, Hermans-Borgmeyer I, Tamm ER, Wegner M. The transcription factors Sox10 and Myrf define an essential regulatory network module in differentiating oligodendrocytes. *PLoS Genet.* 2013 Oct;9(10):e1003907.

- Huang S, Tang Y, Cai X, Peng X, Liu X, Zhang L ve ark. Celastrol inhibits vasculogenesis by suppressing the VEGF-induced functional activity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jul 6;423(3):467-72.
- Jaworska J, Ziemka-Nalecz M, Sypecka J, Zalewska T. The potential neuroprotective role of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, after neonatal hypoxia-ischemia. *J Neuroinflammation*. 2017 Feb 10;14(1):34.
- Jin HZ, Hwang BY, Kim HS, Lee JH, Kim YH, Lee JJ. Antiinflammatory constituents of *Celastrus orbiculatus* inhibit the NF-kappaB activation and NO production. *J Nat Prod*. 2002 Jan;65(1):89-91.
- Kannaiyan R, Shanmugam MK, Sethi G. Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Lett*. 2011 Apr 1;303(1):9-20.
- Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet*. 2012 Apr;81(4):303-11.
- Kashyap D, Sharma A, Tuli H.S, Sak K, Mukherjee T, Bishayee A ve ark. Molecular targets of celastrol in cancer: Recent trends and advancements. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Aug;128:70-81.
- Kessler T, Sahm F, Sadik A, Stichel D, Hertenstein A, Reifenberger G ve ark. Molecular differences in IDH wildtype glioblastoma according to MGMT promoter methylation. *Neuro Oncol*. 2018 Feb 19;20(3):367-379.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):461-553.
- Klink B, Schlingelhof B, Klink M, Stout-Weider K, Patt S, Schrock E. Glioblastomas with oligodendroglial component-common origin of the different histological parts and genetic subclassification. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Jun;34(3):261-75.
- Kovacs GG. Cellular reactions of the central nervous system. *Handb Clin Neurol*. 2017;145:13-23.
- Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*. 1998 Aug;20(8):615-26.
- Jacob G1, Dinca EB Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life*. 2009 Oct-Dec;2(4):386-93.
- Lecker SH1, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jul;17(7):1807-19. Epub 2006 May 31.

- Lee DH, Ryu HW, Won HR, Kwon SH. Advances in epigenetic glioblastoma therapy. *Oncotarget*. 2017 Mar 14;8(11):18577-18589.
- Lee P, Murphy B, Miller R, Menon V, Banik NL, Giglio P ve ark. Mechanisms and clinical significance of histone deacetylase inhibitors: epigenetic glioblastoma therapy. *Anticancer Res*. 2015 Feb;35(2):615-25.
- Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):707-19.
- Li QJ, Cai JQ, Liu CY. Evolving Molecular Genetics of Glioblastoma. *Chin Med J (Engl)*. 2016 Feb 20;129(4):464-71.
- Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Oct 17;99(20):1544-50. Epub 2007 Oct 9.
- Liu H, Xia J, Wang T, Li W, Song Y, Tan G ve ark. . Differentiation of human glioblastoma U87 cells into cholinergic neuron. *Neurosci Lett*. 2019 Jun 21;704:1-7.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803-20.
- Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem*. 2009 Jul 1;107(4):600-8.
- Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet*. 2006 Apr 15;15 Spec No 1:R17-29.
- Nakagawa H, Sasagawa S, Itoh K. Sodium butyrate induces senescence and inhibits the invasiveness of glioblastoma cells. *Oncol Lett*. 2018 Feb;15(2):1495-1502
- Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:367-402.
- Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 1;15(19):6002-7.
- Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Feb 15;19(4):764-72.
- Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C ve ark. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol*. 2017 Nov 6;19(suppl_5):v1-v88.
- Premkumar D.R, Jane E.P, Agostino N.R, DiDomenico J.D, Pollack I.F. Bortezomib-induced sensitization of malignant human glioma cells to vorinostat-induced apoptosis

- depends on reactive oxygen species production, mitochondrial dysfunction, Noxa upregulation, Mcl-1 cleavage, and DNA damage. *Mol Carcinog*. 2013 Feb;52(2):118-33.
- Rao M, Gershon MD. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 Sep;13(9):517-28.
- Rao M, Nelms BD, Dong L, Salinas-Rios V, Rutlin M, Gershon MD ve ark. Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia*. 2015 Nov;63(11):2040-2057.
- Ren B, Liu H, Gao H, Liu S, Zhang Z, Fribley AM ve ark. Celastrol induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via targeting ER-stress/UPR. *Oncotarget*. 2017 Oct 10;8(54):93039-93050.
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L ve ark. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994 Sep 9;78(5):761-71.
- Romani M, Pistillo MP, Banelli B. Epigenetic Targeting of Glioblastoma. *Front Oncol*. 2018 Oct 16;8:448.
- Sancar F. Quick Uptakes: Sex-Specific Tumor Signatures Help Explain Differences in Glioblastoma Survival. *JAMA*. 2019 Feb 13.
- Sasmita AO, Wong YP, Ling APK. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018 Feb;14(1):40-51.
- Sawa H, Murakami H, Ohshima Y, Sugino T, Nakajyo T, Kisanuki T ve ark. Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein Bad. *Brain Tumor Pathol*. 2001;18(2):109-14.
- Singh AK, Bishayee A, Pandey AK. Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients*. 2018 Jun 6;10(6). pii: E731.
- Staberg M, Michaelsen SR, Rasmussen RD, Villingshøj M, Poulsen HS, Hamerlik P. Inhibition of histone deacetylases sensitizes glioblastoma cells to lomustine. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017 Feb;40(1):21-32.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ ve ark. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96.
- Sun X, Zhu M-J. Butyrate Inhibits Indices of Colorectal Carcinogenesis via Enhancing α -Ketoglutarate-Dependent DNA Demethylation of Mismatch Repair Genes. *Mol Nutr Food Res*. 2018 May;62(10):e1700932.

- Taal W, Bromberg JE, van den Bent MJ. Chemotherapy in glioma. *CNS Oncol.* 2015;4(3):179-92.
- Taylor M.A, Khathayer F, Ray S.K. Quercetin and Sodium Butyrate Synergistically Increase Apoptosis in Rat C6 and Human T98G Glioblastoma Cells Through Inhibition of Autophagy. *Neurochem Res.* 2019 Jul;44(7):1715-1725.
- Tsung A.J, Guda M.R, Asuthkar S, Labak C.M, Purvis I.J, Lu Y ve ark. Methylation regulates HEY1 expression in glioblastoma. *Oncotarget.* 2017 Jul 4; 8(27): 44398–44409.
- Vahid F, Zand H, Nosrat-Mirshekarlou E, Najafi R, Hekmatdoost A. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: a review. *Gene.* 2015 May 10;562(1):8-15.
- Venkatesha SH1, Moudgil KD. Celastrol and Its Role in Controlling Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;928:267-289.
- Verkhatsky AN, Butt A. *Glial neurobiology a textbook.* 2007. 3, Morphology of Glial Cells; 21-28.
- Villa C, Miquel C, Mosses D, Bernier M, Di Stefano AL. The 2016 World Health Organization classification of tumours of the central nervous system. *Presse Med.* 2018 Nov - Dec;47(11-12 Pt 2):e187-e200.
- Wang F, Zheng Z, Guan J, Qi D, Zhou S, Shen X ve ark. Identification of a panel of genes as a prognostic biomarker for glioblastoma. *EBioMedicine.* 2018 Nov;37:6877.
- Wang Z, Hu P, Tang F, Lian H, Chen X, Zhang Y ve ark., HDAC6 promotes cell proliferation and confers resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cancer Lett.* 2016 Aug 28;379(1):134-42.
- Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W ve ark. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol.* 2010 Jan;6(1):39-51.
- Williams MJ, Singleton WG, Lowis SP, Malik K, Kurian KM. Therapeutic Targeting of Histone Modifications in Adult and Pediatric High-Grade Glioma. *Front Oncol.* 2017 Mar 28;7:45.
- Wong KF, Yuan Y, Luk JM. Tripterygium wilfordii bioactive compounds as anticancer and anti-inflammatory agents. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012 Mar;39(3):311-20.
- Wu J, Hong C, Pan H, Yang Q, Mei Y, Dou Q P, ve ark. Medicinal Compound Celastrol As a Potential Clinical Anticancer Drug: Lessons Learned From Preclinical Studies. *Clinical Cancer Drugs.* 2016;3(1).

- Xu Z, Tao J, Chen P, Chen L, Sharma S, Wang G ve ark. Sodium Butyrate Inhibits Colorectal Cancer Cell Migration by Downregulating Bmi-1 Through Enhanced miR-200c Expression. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Mar;62(6):e1700844.
- Yan Y-Y, Guo Y, Zhang W, Ma C-G, Zhang Y-X, Wang C ve ark. Celastrol enhanced the anticancer effect of lapatinib in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *J BUON*. Apr-Jun 2014;19(2):412-8
- Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol*. 2001 Jul;11(7):294-7.
- Yu C, Friday B.B, Yang L, Atadja P, Wigle D, Sarkaria J ve ark. Mitochondrial Bax translocation partially mediates synergistic cytotoxicity between histone deacetylase inhibitors and proteasome inhibitors in glioma cells. *Neuro Oncol*. 2008 Jun; 10(3): 309–319.
- Zhang J, Yi M, Zha L, Chen S, Li Z, Li C ve ark. Sodium Butyrate Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Colorectal Cells: Implications for Apoptosis. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0147218.
- Zhang J, Zhong Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Oct;71(20):3885-901.
- Zhang R, Chen Z, Wu S.S, Xu J, Wei P ve ark. Celastrol Enhances the Anti-Liver Cancer Activity of Sorafenib. *Med Sci Monit*. 2019 Jun 1;25:4068-4075.
- Zhang T, Li Y, Yu Y, Zou P, Jiang Y, Sun D. Characterization of celastrol to inhibit hsp90 and cdc37 interaction. *J Biol Chem*. 2009 Dec 18;284(51):35381-9.
- Zhou Q, Li G, Zuo S, Zhu W, Yuan X. RNA Sequencing Analysis of Molecular Basis of Sodium Butyrate-Induced Growth Inhibition on Colorectal Cancer Cell Lines. *Biomed Res Int*. 2019 Feb 27;2019:1427871

ÖZGEÇMİŞ

19.03.1994 tarihinde Yüksekova'da doğan Bahar KARTAL, ilk öğrenimini 2001-2004 yılları arasında Van Hacı Ömer Sabancı İlköğretim okulunda, 2005-2008 yılları arasında Van Cumhuriyet İlköğretim okulunda okuyarak mezun olmuştur. Lise öğrenimini 2009-2012 yılları arasında Van Atatürk Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. Lisans Öğrenimini ise 2012-2016 yılları arası Kilis 7 Aralık Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde tamamlamıştır. 2017 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.

EKLER





T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



YÜKSEKLİSANS TEZİ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	SODYUM BÜTİRAT VE CELASTROL KOMBİNASYONUNUN GLİOBLASTOMADAKİ TERAPÖTİK ETKİSİ			
İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
2	2	17	21	42
İntihal taraması yapılan program		Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %	
TURNİTİN		05 /02 / 2021	% 9	
*Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:				
- Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - 7 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)				
- Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç,				
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyiinceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabulettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.				
Gereğini bilgilerinize arz ederim.				
				BAHAR KARTAL İmza

Öğrencinin Adı Soyadı	BAHAR KARTAL
Anabilim Dalı	TIBBİ BİYOLOJİ
Öğrenci No	17930002009
Programı	<input type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora

DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR DOÇ. DR. MEHMET TAŞPINAR	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza)
--	--



