

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMA MULTİFORM (GBM) KANSER KÖK
HÜCRELERİNDE Mdivi-1 ARACILI DRP-1 İNHİBİSYONUNUN
MİTOKONDRIYAL FİSYON VE MİTOFAJİYE ETKİSİ

Elif DENER

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'nün TYL-
2022-2444 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Glioblastoma Multiform (GBM) Kanseri Kök Hücrelerinde Mdivi-1 Aracılı DRP-1 İnhibisyonunun Mitokondriyal Fiyon ve Mitofajiye Etkisi” başlıklı tez; 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.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Elif DENER

Tarih: 16/01/2023

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Elif DENER tarafından hazırlanan “Glioblastoma Multiform (GBM) Kanseri Kök Hücrelerinde Mdivi-1 Aracılı DRP-1 İnhibisyonunun Mitokondriyal Fisyon ve Mitofajiye Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/01/2023

İmza

Doç. Dr. Oya Sena Aydos
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu
Ankara Üniversitesi

İmza

Doç. Dr. Hasibe Verdi
Başkent Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
1.GİRİŞ	1
1.1.Beyin Tümörü	1
1.2 Gliomaların Sınıflandırılması	1
1.2.1 Glioblastoma Multiforme	2
1.2.1.1. GBM İçin Güncel Tedaviler	2
1.3 GBM ve Kanser Kök Hücrelerinin İlişkisi	3
1.4 Kanser Kök Hücreleri	4
1.4.1 Glioblastoma Kanser Kök Hücreleri ve Özellikleri	4
1.4.1.1 CD133	4
1.4.1.2 CD24	5
1.5 Mitokondri	6
1.5.1 Mitokondri Dinamiği	6
1.5.1.2 Mitokondriyal Füzyon	7
1.5.1.3 Mitokondriyal Fisyon	8
1.5.2 Mitofaji	9
1.6 Mdivi-1	10
1.7 Tezin Amacı	11
2.GEREÇ ve YÖNTEM	12
2.1. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	12
2.1.2 Hücre Hatlarının Temini	12
2.1.2 GBM Hücre Kültürü ve Pasajlanması	12
2.1.3 Hücre Canlılığının MTT Deneyi ile Belirlenmesi	13
2.1.4 Western Blot Yöntemi ile Protein İfadelerinin Belirlenmesi	15
2.1.5 Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	17
2.1.6 Mitokondri Morfoloji Değişimlerinin Konfokal Mikroskopu ile İncelenmesi	18
3.BULGULAR	
3.1 Glioblastoma Hücre Hatlarının Mikroskop Görüntüsü	19
3.2 MTT Deneyi Sonuçları	20
3.3 Protein ifadesi (Western Blotting) Bulguları	29
3.4 Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	35
3.5 Konfokal Mikroskop Görüntüleri	44
4.TARTIŞMA	53
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	61
ÖZET	65
SUMMARY	66



ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'nün TYL-2022-2444 proje numarası ile desteklenen çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Tezimde bana yol gösteren, engin bilgi ve yardımlarıyla beni başından sonuna kadar yönlendiren ve destekleyen, en zor zamanımda bile üstün hoşgörü anlayışıyla hiçbir zaman manevi desteğini eksik etmeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemim boyunca her zaman desteğini hissettiğim, tez sürecimde de başım her sıkıştığında yanı başımda olan Dr. Tülin ÖZKAN' a çok teşekkür ederim.

Özellikle tez süreci gibi bu zor yolculukta psikolojik olarak hep desteğini hissettiğim ve yine yüksek lisans sürecim boyunca manevi desteğiyle yanımda olup bana güç veren arkadaşım Ar. Gör. Nurbanu GÖNÜLKIRMAZ' a çok teşekkür ederim.

Teşekkürün en büyüğünü hak eden, tezim ve tüm hayatım boyunca desteklerini yanımda hissettiğim, beni bu günlere getiren, haklarını asla ödeyemeyeceğim canım aileme sonsuz sabır ve destekleri için için teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Drp1	Dinamin İlişkili Protein 1
GBM	Glioblastoma Multiforme
GKH	Glioblastoma Kök Hücreleri
IDH	İzositrat Dehidrojenaz
IMM	İç mitokondri membranı
KKH	Kanser Kök Hücreleri
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mtDNA	Mitokondriyal DNA
OMM	Dış mitokondri membranı
OXPPOS	Oksidatif fosforilasyon
TMZ	Temozolomid
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. GBM hücre hatları ışık mikroskobu görüntüsü; (U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high})	19
Şekil 3.2 U87 wt hücrelerinde farklı dozlarda mDivi-1'e 72 saat boyunca muamelenin MTT sonuçları	20
Şekil 3.3 U87 CD133 ^{high} hücrelerinde mDivi-1'in 72 saat boyunca muamelenin MTT sonuçları	21
Şekil 3.4 U87 CD24 ^{high} hücrelerinde mDivi-1'in 72 saat boyunca muamelenin MTT sonuçları	22
Şekil 3.5 TMZ ile 72 saat muamele edilen U87 wt hücrelerinin MTT sonuçları	23
Şekil 3.6 TMZ ile 72 saat muamele edilen U87 CD133 ^{high} hücrelerinin MTT sonuçları	24
Şekil 3.7 TMZ ile 72 saat muamele edilen U87 CD24 ^{high} hücrelerinin MTT sonuçları.	25
Şekil 3.8 U87 wt hücrelerinde Mdivi-1 ile TMZ'nin 72 saat kombine uygulanmasının MTT sonuçları	26
Şekil 3.9 U87 CD133 ^{high} hücrelerinde Mdivi-1 ile TMZ'nin 72 saat kombine uygulanmasının MTT sonuçları	27
Şekil 3.10 U87 CD24 ^{high} hücrelerinde Mdivi-1 ile TMZ'nin 72 saat kombine uygulanmasının MTT sonuçları	28
Şekil 3.11 U87 wt hücrelerinde Drp1 p-ser616 protein bantları	29
Şekil 3.12 U87 CD133 ^{high} hücrelerinde Drp1 p-ser616 protein bantları	30
Şekil 3.13 U87 CD24 ^{high} hücrelerinde Drp1 p-ser616 protein bantları	30
Şekil 3.14 U87 wt hücrelerinde Drp1 p-ser637 protein bantları	31
Şekil 3.15 U87 CD133 ^{high} hücrelerinde Drp1 p-ser637 protein bantları	32
Şekil 3.16 U87 CD24 ^{high} hücrelerinde Drp1 p-ser637 protein bantları	32
Şekil 3.17 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde protein düzeyinde kat artışları	33

Şekil 3.18 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde protein düzeyinde kat artışları	34
Şekil 3.19 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde DRP1 mRNA ifade analizi	35
Şekil 3.20 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde Bax mRNA ifade analizi	36
Şekil 3.21 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde BCL2 mRNA ifade analizi	37
Şekil 3.22 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde Bax/Bcl2 oranının gösterilmesi	38
Şekil 3.23 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde Fis1 mRNA ifade analizi	39
Şekil 3.24 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde Pink1 mRNA ifade analizi	40
Şekil 3.25 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde Parkin mRNA ifade analizi	41
Şekil 3.26 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde MCL-1 mRNA ifade analizi	42
Şekil 3.27 U87 wt, U87 CD133 ^{high} ile U87 CD24 ^{high} hücrelerinde BCL-XL mRNA ifade analizi	43
Şekil 3.28 U87 wt hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü	44
Şekil 3.29 U87 wt hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü	45
Şekil 3.30 U87 wt hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü	46
Şekil 3.31 U87 CD133 ^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü	47
Şekil 3.32 U87 CD133 ^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü	48
Şekil 3.33 U87 CD133 ^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü	49

Şekil 3.34 U87 CD24 ^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü	50
Şekil 3.35 U87 CD24 ^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü	51
Şekil 3.36 U87 CD24 ^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü	52



1.GİRİŞ

1.1. Beyin Tümörü

Beyin tümörleri, lokalizasyonları ve genellikle lokal olarak invaziv büyümeleri nedeniyle yüksek morbidite ve mortalite ile karakterize edilir. Çoğu neoplastik beyin lezyonu, merkezi sinir sistemi (MSS) dışındaki kanserlerden kaynaklanan metastazlardır (Gavrilovic ve Posner, 2005).

Gliomalar ve menenjiyomlar, birincil beyin tümörünün en yaygın türleridir. Gliomalar, tüm birincil beyin tümörlerinin yaklaşık %30' unu oluştururken, tüm kötü huylu tümörlerin ise %80'ini oluşturur. Birincil beyin tümörlerinin de ölümlerinin çoğundan sorumludur (Ferlay ve ark., 2010; Ostrom ve ark., 2015).

1.2. Gliomaların Sınıflandırılması

Birincil beyin tümörünün yaygın bir tipi olan gliomalar; astrositomları, oligodendrogliomaları ve ependimomaları içerir. Malign gliomalar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından anaplastik astrositom, anaplastik oligodendroglioma, anaplastik oligoastrositom ve anaplastik ependimomlar gibi derece III/IV tümörler veya glioblastoma multiforme (GBM) gibi derece IV/IV tümörler olarak sınıflandırılır.

WHO tümörün derecesini; nükleer atipi, mitotik aktivite, vasküler proliferasyon, nekroz, proliferatif potansiyel, klinik seyir ve tedavi sonucu dahil

olmak üzere spesifik patolojik özellikler gibi kriterlere göre belirlenir (Louis ve ark., 2007).

1.2.1 Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM), MSS'de görülen en yaygın ve agresif birincil (primer) malign tümördür. Başlıca iki gruba ayrılır: daha önce primer GBM olarak anılan ve vakaların yaklaşık % 90'ını temsil eden izositrat dehidrojenaz (IDH)-doğal tip GBM ve ikinci olarak da düşük dereceli diffüz bir gliomadan geliştirilen IDH-mutant GBM de vakaların yaklaşık %10'unu temsil eder (Davis, 2018).

1.2.1.1. GBM İçin Güncel Tedaviler

GBM için mevcut standart tedaviler, cerrahi rezeksiyon, radyasyon ve kemoterapinin bir kombinasyonunu içermektedir. Şu anda, GBM'i tedavi etmek için FDA tarafından onaylanan yalnızca iki ilaç vardır: yeni tanı GBM hastalarının (ndGBM) tedavisi için temozolomid (TMZ) ve nüks olan GBM hastalarının (rGBM) tedavisi için bevacizumab kullanılmaktadır (Stupp ve ark., 2005; Cohen ve ark., 2009).

Ne yazık ki, mevcut terapötik yaklaşımların GBM hastalarının prognozunu iyileştirmede çok sınırlı bir etkisi vardır. Hastaların ortalama yaşam süresi 15 ile sınırlı kalmakta ve 5 yıllık sağ kalım oranı ise %5'den az olduğu görülmektedir. Bu nedenle, GBM'e karşı daha etkili tedaviler bulma konusunda zorluklar devam etmektedir (Davis, 2018).

1.3 GBM ve Kanser Kök Hücrelerinin İlişkisi

Beyin tümörlerinde kök hücrelerin tanımlanması, MSS'deki tümörijenik süreci araştırmak ve bu hücrelere yönelik tedavileri geliştirmek için oldukça önemlidir (Brescia ve ark., 2012). GBM'lerin ayırıcı niteliğini ortaya koyan tümör içi heterojenite ve tedavi direncidir. Bu  zelliklerin glioblastoma kök hücreleri (GKH'ler) tarafından desteklendiği düşünülmektedir: GKH'ler kendi kendini yenileme ve farklılaşma olmak üzere iki ana özelliğe sahiptir (Lathia ve ark., 2015; Singh ve ark., 2003; Singh ve ark., 2004).

GKH'lerin, tümör büyümesi ve nüks etmesini tetiklediği gösterilmiştir. Bu sebeple GBM tedavisinde kanser kök hücrelerin (KKH'lerin) tümör n ks nden sorumlu olduğu bilindiğinden, terapötik olarak hedeflenmesi tümörün tedavisinde büyük önem taşımaktadır (Bao ve ark., 2006; Chen ve ark., 2012).

1.4 Kanser Kök Hücreleri

Kök benzeri kanser hücreleri, tümör başlatan hücreler (TIC'ler) veya kanser başlatan hücreler olarak adlandırılır. KKH'leri, kendi kendini yenileme, in vivo tümör başlatma yetenekleri ve metastaza yol açan diğer dokuları istila etme gibi tedavi direncinde rol oynayan özelliklere sahiptir (Smith ve Macleod, 2019; Lyakhovich ve Leonart, 2016; Ayob ve Ramasamy, 2018).

KKH'ler, birçok tümör tipinde tümör n ksetmesinden sorumludur. Tümörün tedavisinde geleneksel kemoterapi ve radyoterapi çoğu tümör hücresini ortadan kaldıracı de KKH'lerin tedavi sırasında direnç geliştirerek hayatta kaldığı düşünülmektedir. Direnç geliştiğinde KKH popülasyonunu arttırır ve daha agresif bir tümör seyrine neden olur. Bu ilaç direnci fenotipinin altında yatan hücresel

mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu durum KKH'lerini yeni kanser tedavileri geliştirmek için önemli bir hedef haline getirmektedir (Sultan ve ark., 2017; Jagust ve ark., 2019).

1.4.1 Glioblastoma Kanser Kök Hücreleri ve Özellikleri

1.4.1.1.CD133

4p15 kromozomu üzerinde bulunan CD133 (prominin-1 olarak da bilinir), 120 kDa moleküler ağırlığa sahip beş domainli bir transmembran glikoproteindir.

Yapılan önceki çalışmalarda; CD133 gliomalar, prostat kansinomu, kolorektal kanser, vb. dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde tümör oluşumu ve kanser ilerlemesi ile ilgili bir KKH belirteci olarak tanımlanmıştır (Landray ve ark., 2014; Vander ve ark., 2008; Isaacs ve ark. 2007).

CD133, yalnızca kök hücrelerin karakterizasyonu için bir biyobelirteç değildir, aynı zamanda hücre büyümesinde, çoğalmasında ve büyüyen tümörlerin patofizyolojisinde de rol oynayabilmektedir (Li, 2013).

CD133'ü eksprese eden hücreler; in vitro nörosfer oluşturma ve in vivo modellerde tümör oluşumunu indüklemeye kapasitesine sahiptir. Bu da GBM KKH işlevinde CD133'lerin merkezi rolü olduğunu düşündürür (Froni, 2004).

1.4.1.2.CD24

Metastazla ilişkili protein CD24, küçük, ağır şekilde glikosile edilmiş hücre bir hücre yüzeyi proteini olup hücre membranına glikozil- fosfatidilinozitol ile bağlanmaktadır (Kristiansen, 2004).

CD24, meme kanseri, pankreas kanseri ve glioma gibi çeşitli kanserlerde ve yüksek ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. CD24' ün yüksek ekspresyonu, kanserin patolojik derecesi veya prognozu ile pozitif olarak ilişkilidir (Kristiansen ve ark., 2003; Rostoker ve ark., 2015; Deng ve ark., 2012).

Yapılan çalışmalarda CD24, kanser hücrelerinin adhezyonunu, büyümesini, çoğalmasını, istilasını ve metastazını desteklediği gösterilmiştir. Ek olarak, CD24, çeşitli KKH'lerin aktif çoğalması için bir biyobelirteç olarak önerilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda KKH'leri hedeflemek ve hızla çoğalan kanserler için uygun tedavi planlarını formüle etmek açısından büyük önem taşımaktadır (Moldenhauer ve ark., 2012; Wang ve ark. 2010).

1.5 Mitokondri

Mitokondri çift membranlı bir organel olarak dış mitokondri membranı (OMM), iç zar boşluğu, iç mitokondri membranı (IMM) ve matriksten oluşmaktadır. İç mitokondri membranı çok sayıda krista olarak adlandırılan kıvrımlardan oluşmaktadır. Elektron taşıma sistemi düzeneği ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) bu kristalarda gerçekleşmektedir. Mitokondri aynı zamanda matriksinde binlerce kopyası olan halkasal çift zincir DNA genomuna da (mitokondriyal DNA; mtDNA) sahiptir (Wai ve Langer 2016).

1.5.1 Mitokondri Dinamiği

Mitokondri; hayatta kalma, çoğalma ve g gibi önemli hücrenel süreçleri yürütmek için hücrelere gerekli enerjiyi sağlayan dinamik bir organeldir. Tüm bu süreçler için kritik olan, mitokondriyal ağın hem füzyonunu hem de fisyonunu kapsayan mekanik bir mekanizma olan mitokondriyal mimarideki değişikliklerdir.

Mitokondriyal şekil, boyut ve lokalizasyondaki değişiklikler, enerji ve metabolik homeostazı sürdürmek için düzenlenmiş bir şekilde meydana gelirken, mitokondriyal dinamiklerin bozulması ise metabolik işlev bozukluğu ve hastalıkların başlangıcı ile ilişkilidir.

Kanserlerde, aşırı proliferasyonu yönlendiren, hücre içi stresi artıran ve besin alımını sınırlayan onkojenik sinyallerin tümü, kanser hücrelerinin biyoenerjetik ve biyosentetik gereksinimlerini değiştirebilir. Bunun sonucu olarak da mitokondriyal işlev ve şekil, kanser hücrelerinin çoğalmasını desteklemek ve hücre ölüm programlarının aktivasyonundan kaçınmak için tedavide direnç oluşturacak sonuçlara sebep olabilir (Trotta ve Chipuk., 2017).

1.5.1.2 Mitokondriyal Füzyon

Mitokondriyal füzyon, ökaryotik hücrelerde sık gerçekleşir. Füzyon iki membranın kaynaşması anlamına gelir. Mitokondriyal füzyondan, mitofusin 1 (MFN1), mitofusin 2 (MFN2) ve optik atrofi 1 (OPA1) sorumludur. Mitokondrinin dış zarında lokalize olan ve GTPaz aktivitesine sahip olan MFN1 ve MFN2 dış zarların kaynaşmasında görevlidir. Mitokondrinin i zarlarının kaynaşması OPA1 tarafından gerçekleştirilmektedir (Westerman, 2010).

1.5.1.3 Mitokondriyal Fisyon

Mitokondriyal fisyon, bir mitokondrinin iki küçük mitokondriye bölünmesidir. Drp1 (dinamin ilişkili protein 1) olarak da adlandırılan dinamin benzeri 1 (DNM1), GTPazların dinamin ailesinin bir üyesi, mitokondriyal bölünmenin önemli bir oyuncusudur (Friedman ve ark., 2011).

Fisyon ayrıca mitofaji ile hasarlı organellerin ortamdan uzaklaştırılması için çok önemlidir ve fisyon mekanizmasının düzgün çalışmadığı durumlarda dengesiz füzyon nedeniyle uzayan mitokondri sayısında artışa neden olur. Diğer taraftan füzyon mekanizmasının düzgün çalışmadığı durumlarda ise çok sayıda parçalanmış mitokondri ile sonuçlanır. Dolayısıyla füzyon ve fisyon, uygun mitokondriyal morfolojiyi korurken mitokondri arasında verimli içerik alışverişini sağlamak için dengelenmesi gereken zıt süreçlerdir. Füzyon ve fisyon makinelerinin zıt ve dengeli çalışması hücrenin sürekli değişen fizyolojik koşullarına yanıt vermesine izin verir (Chan, 2006; Detmer ve ark., 2007; Elgass ve ark., 2013).

Fisyon; mitokondrinin endoplazmik retikulum ile etkileşimi ile başlar. Daha sonra büyük sitoplazmik GTPaz Drp1, bir mitokondriyi ikiye bölmek için mitokondriye alınır. Ayrıca Drp1, aktivitesini düzenleyen çok sayıda amino asit residüsüne sahiptir. Serin 616'daki (S616) fosforilasyon fisyonu aktive eden bir modifikasyon iken, S637'deki fosforilasyonun ise Drp1'in fisyon aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Ingerman ve ark., 2005; Taguchi ve ark., 2007; Chang ve Blackstone, 2007).

Mitokondriyal dinamiklerdeki dengesizlik, kanser gelişimine ve metastatik ilerlemeye sebep olmaktadır. Tümör hücrelerinde mitokondriyal morfolojiyi araştıran çoğu çalışmada, artan fisyonun tümörigenezi desteklediği bildirilmiştir. Fisyondan sorumlu olan Drp1'in artan ekspresyonunun çeşitli kanser türlerinde fragmente

mitokondriyi indüklediği bildirilmiştir. Bu sebeple Drp1'in kanserde yüksek ekspresyonu kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olabilir ((Kashatus ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2013).

1.5.2 Mitofaji

Mitokondriye özgü otofaji olan mitofaji; hasarlı mitokondrinin seçici olarak ortadan kaldırılmasıdır ve bu nedenle mitokondriyal kalite kontrolü için gereklidir.

İşlevsel olmayan mitokondri, oksidatif strese neden olan aşırı miktarda reaktif oksijen türü (ROS) ürettiğinden, kusurlu mitokondrinin çıkarılması hücrel hayatta kalma için kritik öneme sahiptir. Oksidatif stresin, Ca²⁺ homeostazını etkileyerek, mitokondriyal solunum zincirini bozarak ve mitokondriyal DNA'da mutasyonları indükleyerek, böylece nörodejenerasyonu tetikleyerek hücrelere zarar verdiği gösterilmiştir. Sonuç olarak, mitofaji, hasarlı mitokondrinin seçici olarak parçalanmasıyla hücrenin hayatta kalmasını destekler (Ashrafı ve Schwarz 2013).

Mitofajiye, mitokondriyal Ser/Thr kinaz PINK1 ve sitozolik E3 ubiquitin ligaz Parkin'den oluşan PINK1/Parkin yolu aracılık eder (Park ve ark. 2006). PINK1 esas olarak, Parkin'in ubikuitinasyonu tarafından bozulma için etiketlediği hasarlı mitokondri için moleküler bir sensör görevi görür (Geisler ve ark., 2010; Matsuda ve ark., 2010; Narendra ve ark., 2010; Vives-Bauza ve ark., 2010).

1.6 Mdivi-1

Drp1'i seçici ve tersine çevrilebilir şekilde inhibe eden küçük bir molekül olan mitokondriyal bölünme inhibitörü 1 (Mdivi-1) bir kinazolinon türevidir.

Mdivi-1, hem Drp1'in mitokondri etrafındaki halka benzeri yapılara kendi kendine bağlanmasını hem de GTP hidrolizini katalize etme kapasitesini baskılayarak Drp1'i hedeflediği gösterilmiştir (Cassidy-Stone ve ark., 2008).

Drp1 aracılı mitokondriyal fisyon, kemoterapide dirençten sorumlu olabilir. Fisyon fazla olan hücrelerde kanser hücreleri yüksek oranda mitokondriyal ağlar oluşturmaya eğilimli olduğundan, tedavi direnci oluşur. Mdivi-1 tedavisi ile bu fenotipi tersine çevirmek amaçlanmaktadır (Kong ve ark., 2015).

Drp1'in Mdivi-1 ile inhibe edilmesiyle KKH'lerin spesifik olarak yok edilmesi amaçlanmakta ve potansiyel olarak kanser hastaları için kalıcı bir tedavi sağlayabileceğinden, mevcut kanser araştırmaları için oldukça önemlidir.

1.7. Tezin Amacı

GBM hücreleri ve GKH'lerinde fisyonun Drp1 hedefli baskılanmasının hücre sağ kalımında azalmaya ve kök hücre devamlılığını sağlayan genlerin düşük ifadenmesine, radyoterapiye karşı gelişen direncin üstesinden gelinmesine dair araştırmalar bulunmasına rağmen, bu konu netlik kazanmamıştır.

GKH belirteci olan CD133 zenginleştirilmiş GBM tümör hücre kültüründe mitokondriyal fisyon baskılandığında hücre sağ kalımının azaldığını bildiren sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır.

Konvansiyonel terapötik olan TMZ oldukça toksik bir ajandır. Hastadaki sistemik toksisiteyi azaltan ve/veya etkinliğini artıran yeni tedavi protokollerinin

geliştirilmesi çok önemlidir. GBM tedavisinde kullanılacak alternatif yaklaşımların üretilmesini sağlamak amacıyla bu tez projesinde Glioblastoma bulk hücreleri ve GKH'lerinde mitokondriyal fisyonun önemi ve baskılanmasının hücre canlılığına, mitofajiye ve apoptozis üzerine olan etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Ayrıca, GBM'de kullanılan konvansiyonel kematerapötik ajan olarak kullanılan TMZ ile birlikte Mdivi-1'in sinerjistik etkinliği **ilk kez** araştırılmıştır.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

2.1.1. Hücre Hatlarının Temini

Tübitak destekli 1003 Proje kapsamında lentiviral yöntemle CD133 yüksek ifade ettirilen U87 CD133^{high} ve lentiviral yöntemle CD24 yüksek ifade ettirilen U87 CD24^{high} hücreler elde edilmiş ve kültürleri başarılı şekilde yapılmıştır ve bu hücreler şu an -80 °C’de muhafaza edilmektedir.

2.1.2 GBM Hücre Kültürü ve Pasajlanması

GBM hücre serisi olan wt U87 (CD133 düşük/low; CD24 düşük/low;yabanıl tip) hücrelerinin ve lentiviral yöntemle CD133 yüksek ifade ettirilen U87 CD133^{high} ve lentiviral yöntemle CD24 yüksek ifade ettirilen U87 CD24^{high} hücrelerinin 37 °C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde, %10 Fetal Sığır Serum (FBS) ile %1 Streptomisin-Penisilin içeren DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) içerisinde kültürleri yapılmıştır. Hücrelerin konfluent durumuna göre 2-3 günde bir pasajları gerçekleştirilmiştir.

2.1.3 Hücre Canlılığının MTT Deneyi ile Belirlenmesi

Mdivi-1'in etkin dozunu hücre serilerinde belirlemek amacı ile aşağıdaki protokol izlenmiştir.

Mdivi-1 aracılı Drp1 inhibisyonunun, wt U87 hücreleri ve U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinin canlılığına olan etkisini ve ayrıca bu hücrelerde Mdivi-1'in IC50 dozunu belirlemek amacıyla metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) yöntemi uygulanmıştır. MTT deneyinde, wt U87 hücreleri ve U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücreleri 4X10³ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara 100 µl hücre besiyeri karışımı ekilmiştir.

Bir gece hücrelerin yapışması beklendikten sonra ertesi gün artan dozlarda (literatürde belirtilen değerler baz alınarak) Drp1 inhibitörü Mdivi-1 72 saat süre zarfında uygulanmıştır. Mdivi-1 uygulamasından sonra 10 µl MTT ajanı her bir kuyucuğa eklendikten sonra (MTT ajanı PBS'de 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır) 2 saat 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun hemen ardından 100 µl MTT çözelti solüsyonu her bir kuyucuğa eklenmiş ve bir gece 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilip ertesi gün spektrofotometre cihazında 550 ve 690 nm dalga boylarında okuması yapılmıştır.

TMZ'nin etkin dozunun hücre serilerinde belirlemek amacı ile aşağıdaki protokol izlenmiştir.

GBM tedavisinde standart olarak uygulanan TMZ'nin wt U87, U87 CD133^{high} ve U87 CD24^{high} hücrelerinde canlılığına olan etkisini ve ayrıca bu hücrelerde TMZ'nin IC50 dozunu belirlemek amacıyla metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) yöntemi uygulanmıştır. MTT deneyinde, wt U87 hücreleri ve U87 CD133^{high} ile U87

CD24^{high} hücreleri 4X10³ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara 100 µl hücre besiyeri karışımı ekilmiştir.

Bir gece hücrelerin yapışması beklendikten sonra ertesi gün artan dozlarda (literatürde belirtilen değerler baz alınarak) TMZ 72 saat süre boyunca uygulanmıştır.

TMZ'nin uygulamasından sonra 10 µl MTT ajanı her bir kuyucuğa eklendikten sonra (MTT ajanı PBS'de 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır) 2 saat 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun hemen ardından 100 µl MTT çözelti solüsyonu her bir kuyucuğa eklenmiş ve bir gece 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilip ertesi gün spektrofotometre cihazında 550 ve 690 nm dalga boylarında okuması yapılmıştır.

Mdivi-1 ile TMZ kombine uygulanarak etkin dozunun hücre serilerinde belirlemek amacı ile aşağıdaki protokol izlenmiştir.

GBM tedavisinde standart olarak uygulanan TMZ'nin wt U87, U87 CD133^{high} ve U87 CD24^{high} hücrelerinde daha düşük dozlarda etkisinin artırılabilmesi ve olası sinerjistik etkiyi saptamak amacıyla bu hücrelerde Mdivi-1 ile kombinasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, 4x10³ hücre/kuyu olacak şekilde wt U87, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 100 µl hücre besiyeri karışımı ekilmiştir.

Bu hücreler daha sonra tespit edilen TMZ IC₅₀ ve IC₅₀ değerinin altındaki dozlar ile birlikte Mdivi-1 için tespit edilen IC₅₀ ve IC₅₀ değerinin altındaki dozlar ile toplamda 100 µl hacimde (DMEM) 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra yukarıda belirtilen MTT deneyinin aşamaları gerçekleştirilmiştir.

2.1.4 Western Blot Yöntemi ile Protein İfadelerinin Belirlenmesi

wt U87 hücreleri ve U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücreleri 12×10^4 hücre olacak şekilde 6'lı plakalara ekilmiş ve uygun miktarda besi ortamında bekletilmiştir.

Sadece Mdivi-1, sadece TMZ ve kombine olarak uygulanan wt U87 hücreleri ve U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücreler 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

wt U87 hücreleri ve U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinden elde edilen ekstreler, BCA metoduna göre protein tayini yapılmıştır.

Bu hücrelerin ekstreleri %12'lik SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile molekül büyüklüklerine göre ayrılmaları sağlanmıştır. Bu amaçla, eşit miktarda protein içeren örnekler 4X Laemmli yükleme tamponu 1X'e karşılık gelecek şekilde karıştırılmış ve 95°C'de 5 dakika denatüre edilmiştir. Eşit miktarda protein (20 µg) içeren ekstreler, %12'lik SDS-PAGE'e yüklenerek 90 V'da yaklaşık 2 saat jelde yürütülmüştür.

PVDF membrana transfer edilerek blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, elektroforez tamamlandıktan sonra jeller camlardan çıkartılmış ve 25 mM Tris, 0,192 M glisin, %20(v/v) metanol, 0,5 g SDS içeren transfer tamponunda, 15 dakika oda sıcaklığında orta hızda çalkalanarak dengeye getirilmiştir. SDS-PAGE sonucu elde edilen jel boyutunda kesilen ve metanolle 30 saniye aktive edilmiş PVDF membran, blotlama sırasında kullanılacak süngerler ve filtre kağıtları birkaç dakika transfer tamponunda ıslatılmış ve western blot modülünün kullanma talimatına uygun şekilde katottan anoda doğru, sünger, filtre kâğıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve iki sünger üst üste konarak ve arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek sandviç yapılmış ve 30 dk transfer yapılmıştır.

Membran bloklama işlemi %10 yağsız süt tozunun PBS'deki çözeltisi kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat düşük hızda çalkalama ile gerçekleştirilmiştir

Primer antikor (Drp1 p-ser616, Drp1 p-ser637, beta-actin) ile inkübasyon aşamasında, 1:1000 seyreltilmiş ve membran ile +4°C'de bir gece düşük hızda çalkalanarak inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda membran üç kez, beşer dakika TBS-Tween de orta hızda çalkalanarak yıkanmıştır.

Daha sonra membran, sekonder antikor (Anti-Rabbit IgG) ile 2 saat orta hızda çalkalanarak, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sekonder antikor, PBS-tween içinde 1:3000 oranında seyreltilmiş ve membran ile inkübe edilmiştir. Ardından PBS tween çözeltisi ile yüksek hızda çalkalanarak 20 dakika yıkanmıştır. En son aşamada membranlarda oluşan protein bantları, Millipore ECL ajanı kullanılarak görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

2.1.5 Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Sadece Mdivi-1, sadece TMZ ve kombine olarak uygulanan wt U87 hücreleri ve U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücreler 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Apoptotik ve otofajik genlerin ifadelerini eş zamanlı kantitatif PCR (q-PCR) ile saptamak amacıyla tüm örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır.

RNA izolasyonu sırasında kültür ortamındaki hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım atılmıştır. Pellet üzerine Trizol eklenip homojenize edilerek hücreler 15-30°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Her tüpe 200 µl kloroform eklenmiştir. Tüpler elle 15 sn. boyunca sallandıktan sonra 15-30°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.

12,000g.'de 2-8°C, 13 dk santrifüj edilip santrifüj sonrası alttaki faz kırmızı fenol-kloroform fazı, ara faz ve renksiz-akıcı üst faz olmak üzere 3 faz oluşmuştur. Üst fazda yer alan RNA, RNaz içermeyen yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 0.5 mL izopropil alkol eklenip 15-30°C'de 10dk inkübe edilip tüpler 12,000 x g'de 10 dk 2-8°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, 1 ml %75'lik etanol eklenerek örnekler vorteks yapılmış 7,500 x g.de 5 dk 2-8°C'de santrifüjlenmiştir.

RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutulmuş, sonrasında RNA, RNaz içermeyen DEPC'li su içinde çözülmüştür. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. qRT-PCR yöntemi kullanılarak genlerin ifadesi kantitatif olarak analiz edilmiştir.

İlk olarak hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden 500 ng kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Bu yöntemde kullanıma hazır olan master miks ve cDNA örneği ile bir karışım hazırlanır. Bu karışımdan her kuyucuğa eşit miktarda dağıtılır ve gerçek zamanlı PCR programında okutulur.

2.1.6 Mitokondri Morfoloji Değişimlerinin Konfokal Mikroskobu ile İncelenmesi

Sadece Mdivi-1, sadece TMZ ve kombine olarak uygulanan wt U87 hücreleri ve U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücreler 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

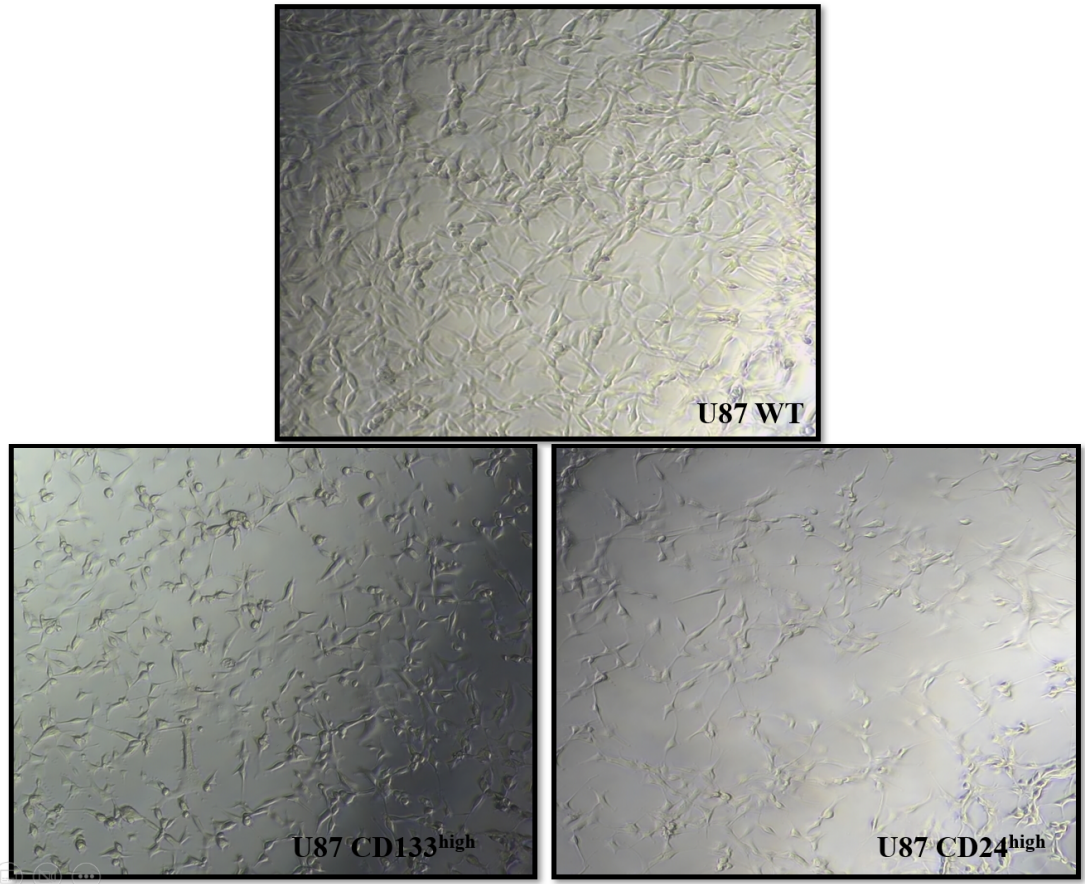
İnkübasyon sonunda hücreler soğuk DPBS ile iki kez yıkandıktan sonra 25 nM Mitotracker Red Boyama solüsyonunda 20 dakika 37° C %5 CO2 bulunan etüvde inkübe edilmiştir. Hücrelerin mitokondri morfolojisindeki değişimler konfokal

mikroskobunda 63x büyütme ile gözlemlenmiştir. Mitokondri morfolojisindeki değişimler rastgele seğim yapılarak değerlendirilmiştir.



3. BULGULAR

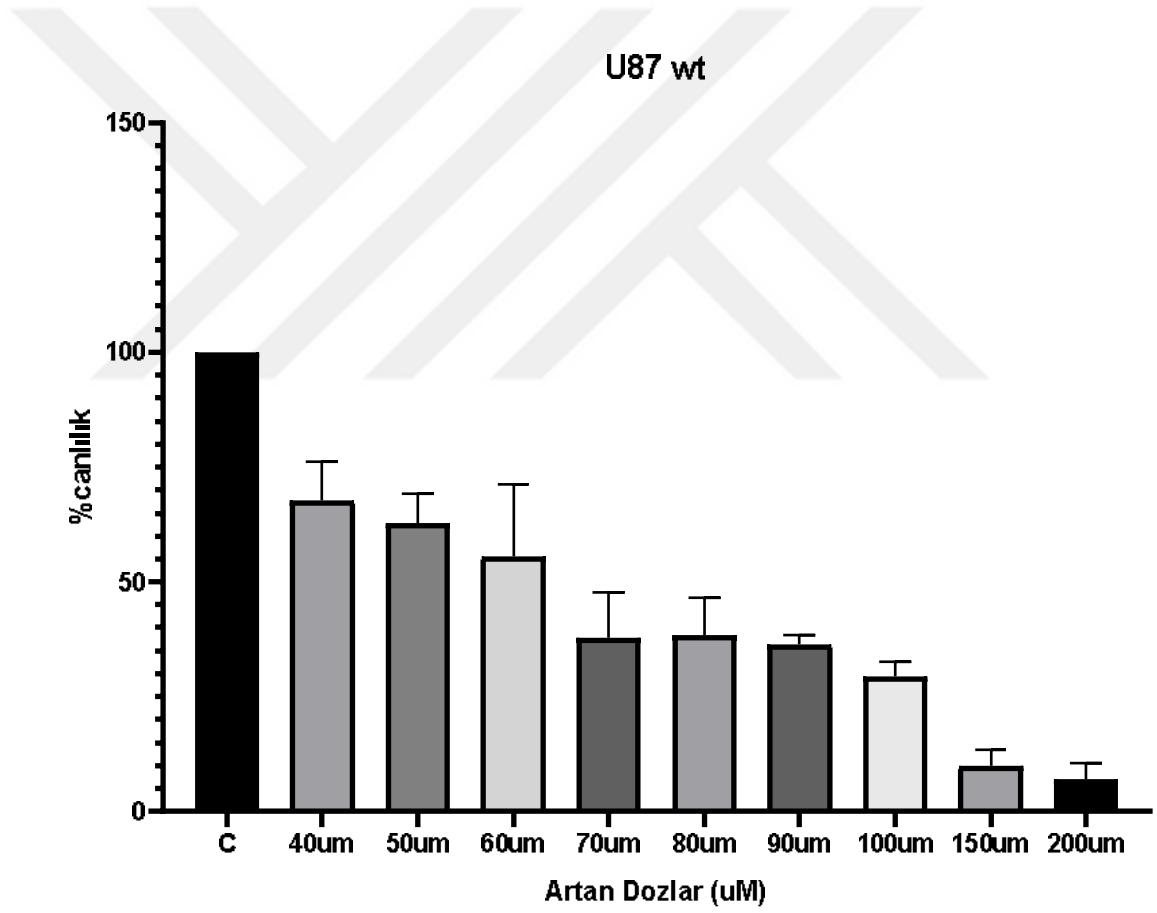
3.1 Glioblastoma Hücre Hatlarının Mikroskop Görüntüsü



Şekil 3.1 GBM hücre hatları ışık mikroskobu görüntüsü; U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} (40x)

3.2 MTT Deneyi Sonuçları

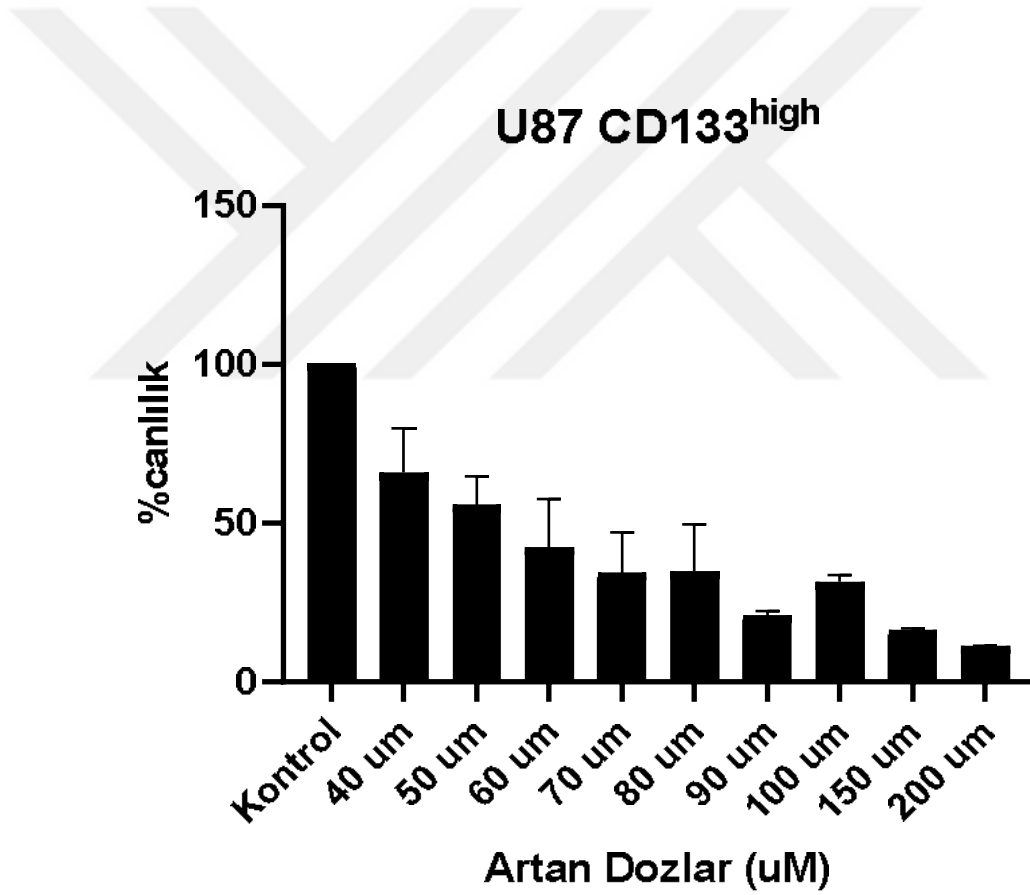
3.2.1 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} Hücre Serilerinde Mdivi-1 MTT Analizi



Şekil 3.2 U87 wt hücrelerinde farklı dozlarda Mdivi-1'e 72 saat boyunca muamelenin MTT sonuçları

Yukarıdaki grafikte U87 wt hücrelerine MTT denemesi yapılarak hücreler 72 saat boyunca 40, 50, 60 70, 80, 90, 100, 150,200 μM doz aralığında tek başına Mdivi-1 uygulanıp canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

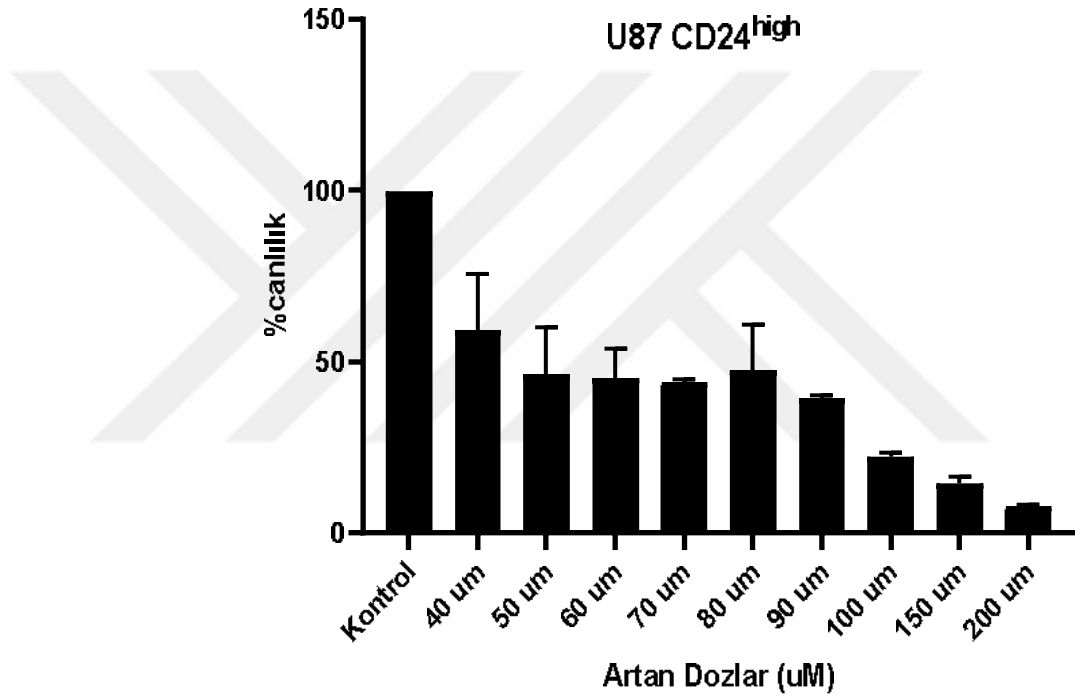
Elde edilen sonuçlara göre U87 wt hücreleri için 62 μM Mdivi-1 etkili bulunmuştur ancak kombine denemeleri için daha düşük bir doz olan 50 μM seçilerek sinerjistik etkiyi görmek amaçlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.3 U87 CD133^{high} hücrelerinde farklı dozlarda Mdivi-1'e 72 saat boyunca muamelenin MTT sonuçları

Yukarıdaki grafikte U87 CD133^{high} hücrelerine MTT denemesi yapılarak hücreler 72 saat boyunca 40, 50, 60 70, 80, 90, 100, 150,200 μ M doz aralığında tek başına Mdivi-1 uygulanıp canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre U87 CD133^{high} hücreleri için 55 μ M Mdivi-1 etkili bulunmuştur ancak kombine denemeleri için daha düşük bir doz olan 50 μ M seçilerek sinerjistik etkiyi görmek amaçlanmıştır (Şekil 3.3).

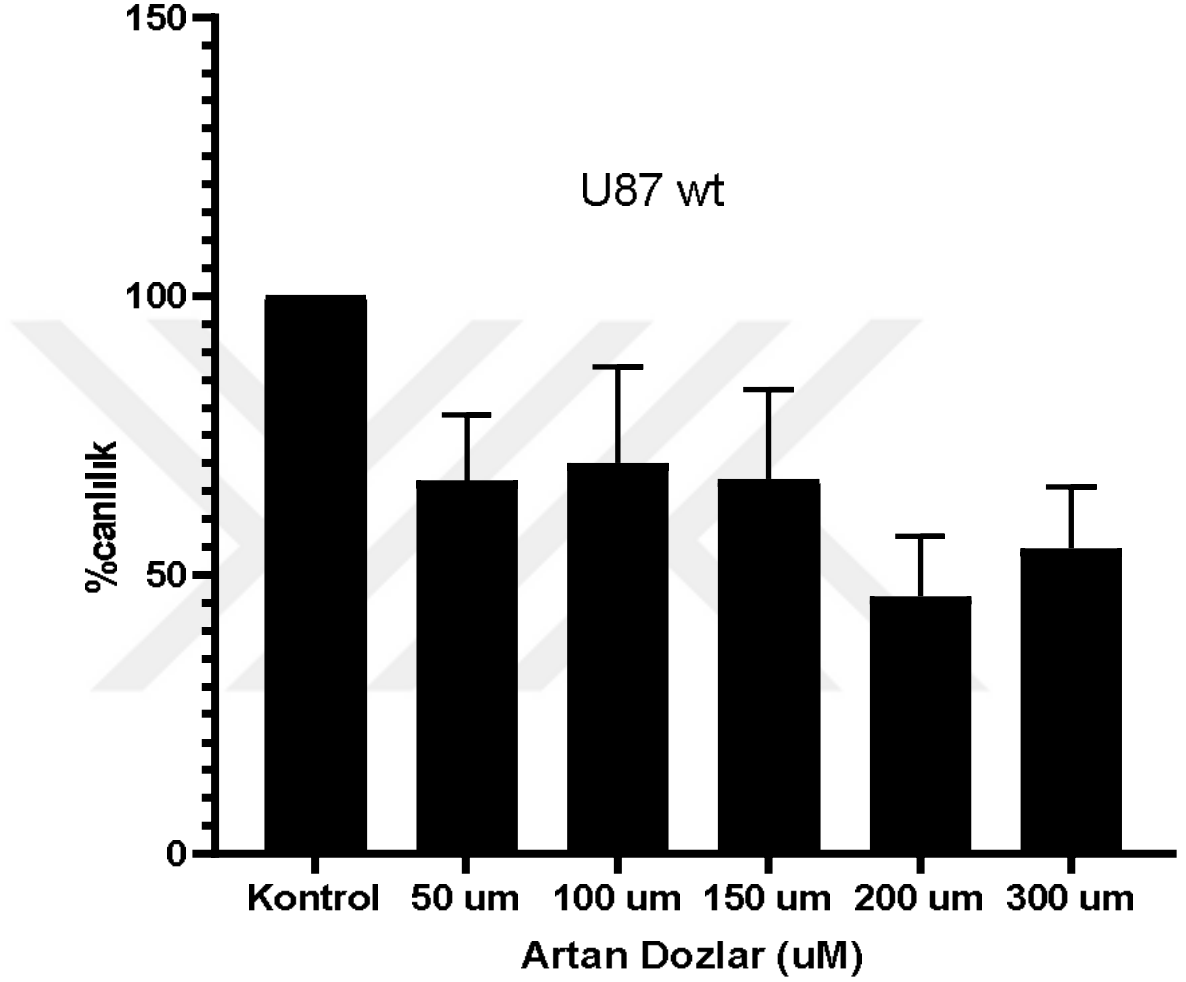


Şekil 3.4 U87 CD24^{high} hücrelerinde farklı dozlarda mDivi-1'e 72 saat boyunca muamelenin MTT sonuçları

Yukarıdaki grafikte U87 CD24^{high} hücrelerine MTT denemesi yapılarak hücreler 72 saat boyunca 40, 50, 60 70, 80, 90, 100, 150,200 μ M doz aralığında tek başına Mdivi-1 uygulanıp canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre U87 CD24^{high} hücreleri için 50 μ M Mdivi-1 etkili bulunmuştur (Şekil 3.4).

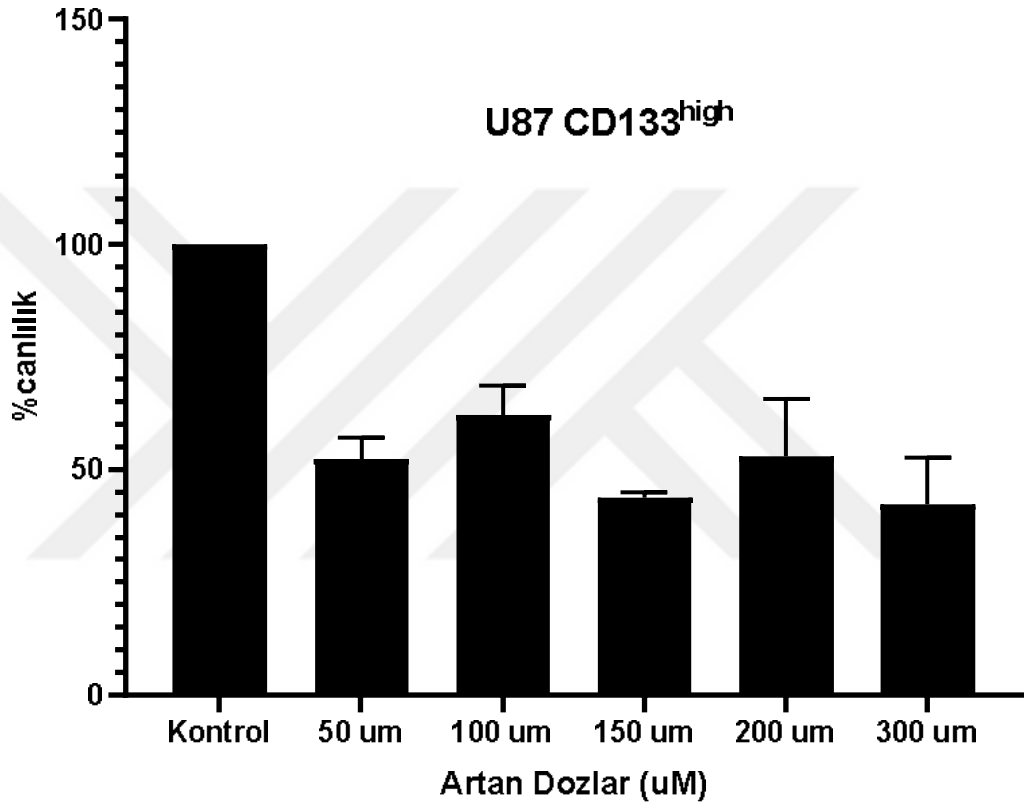
3.2.2 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} Hücre Serilerinde TMZ MTT Analizi



Şekil 3.5 TMZ ile 72 saat muamele edilen U87 wt hücrelerinin MTT sonuçları

Yukarıdaki grafikte U87 wt hücrelerine MTT denemesi yapılarak hücreler 72 saat boyunca 50, 100, 150, 200, 300 µM doz aralığında tek başına TMZ uygulanıp canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

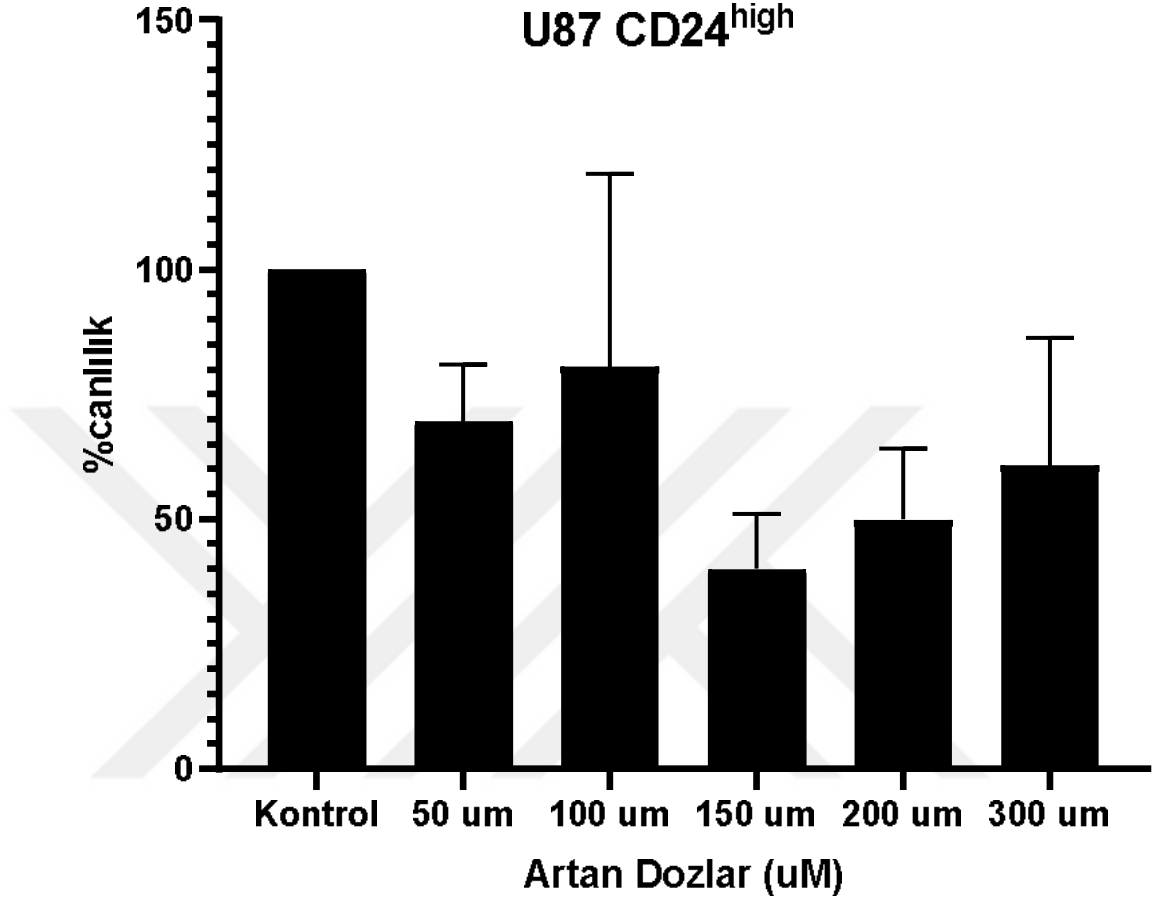
Elde edilen sonuçlara göre U87 wt hücreleri için 175 μ M TMZ etkili bulunmuştur ancak kombine denemeleri için daha düşük bir doz olan 50 ve 100 μ M seçilerek sinerjistik etkiyi görmek amaçlanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.6 TMZ ile 72 saat muamele edilen U87 CD133^{high} hücrelerinin MTT sonuçları

Yukarıdaki grafikte U87 CD133^{high} hücrelerine MTT denemesi yapılarak hücreler 72 saat boyunca 50, 100, 150, 200, 300 μ M doz aralığında tek başına TMZ uygulanıp canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre U87 CD133^{high} hücreleri için 150 μ M TMZ etkili bulunmuştur ancak kombine denemeleri için daha düşük bir doz olan 50 ve 100 μ M seçilerek sinerjistik etkiyi görmek amaçlanmıştır (Şekil 3.6).

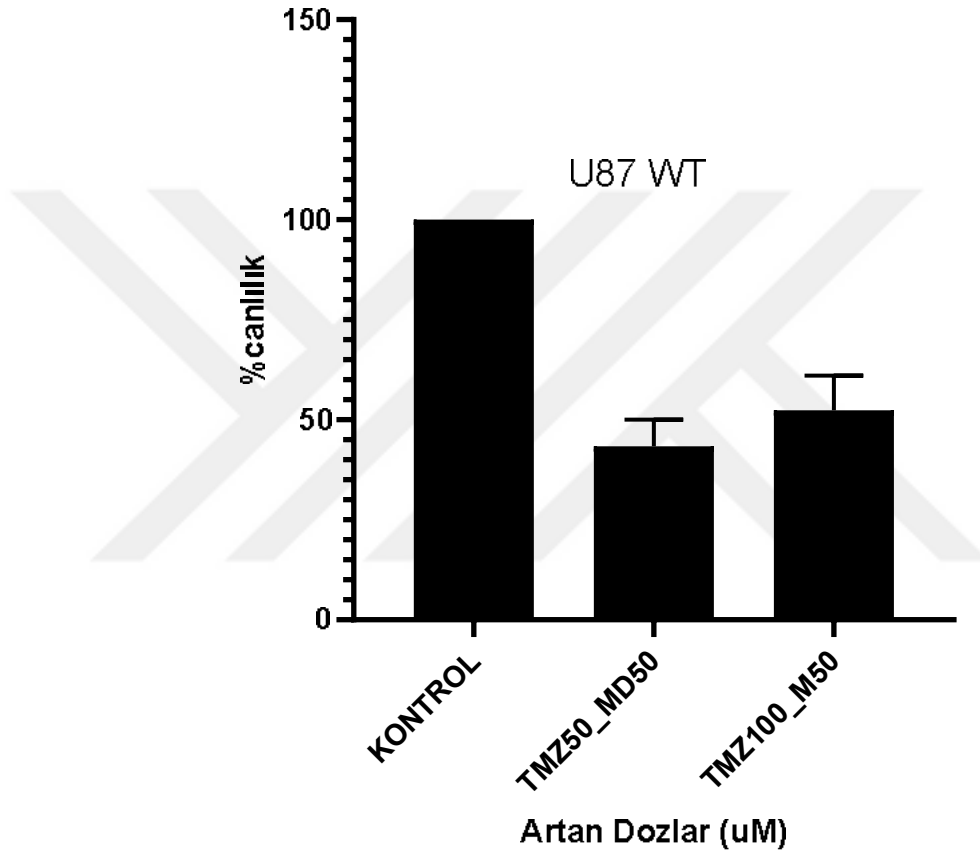


Şekil 3.7 TMZ ile 72 saat muamele edilen U87 CD24^{high} hücrelerinin MTT sonuçları

Yukarıdaki grafikte U87 CD24^{high} hücrelerine MTT denemesi yapılarak hücreler 72 saat boyunca 50, 100, 150, 200, 300 µM doz aralığında tek başına TMZ uygulanıp canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

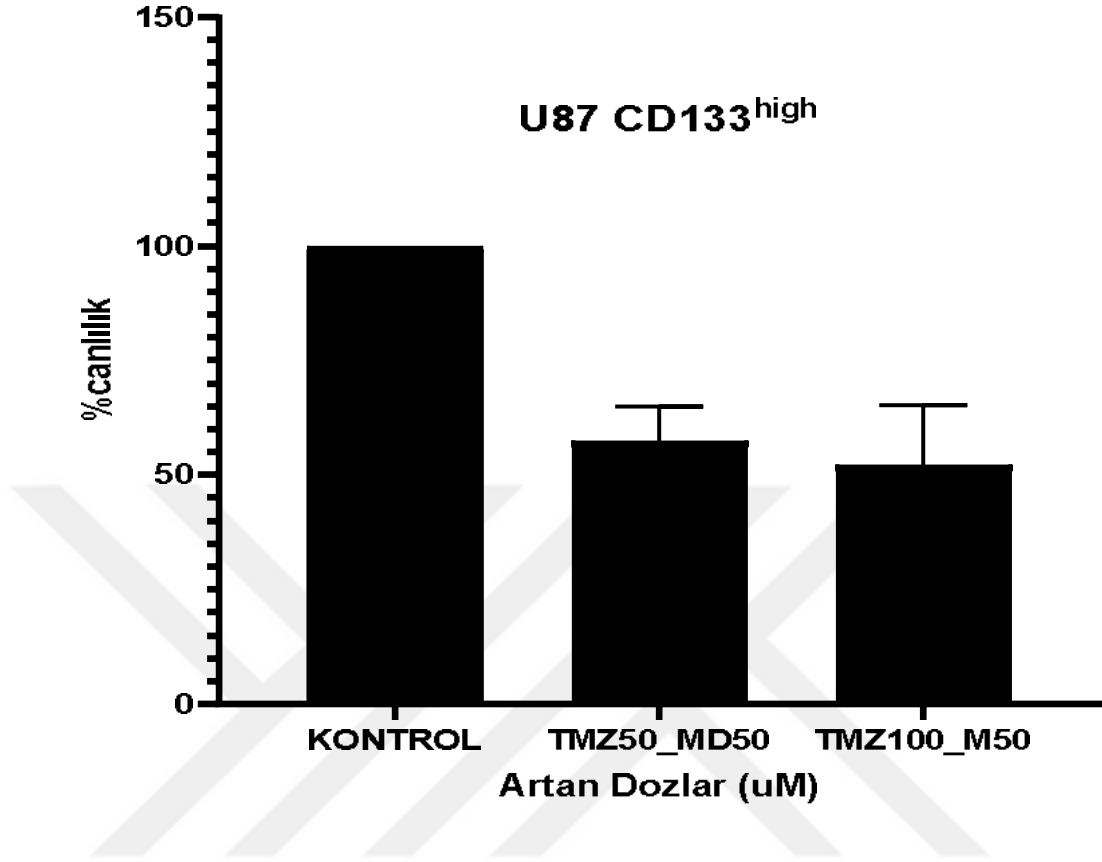
Elde edilen sonuçlara göre U87 CD24^{high} hücreleri için 150 µM TMZ etkili bulunmuştur ancak kombine denemeleri için daha düşük bir doz olan 50 ve 100 µM seçilerek sinerjistik etkiyi görmek amaçlanmıştır (Şekil 3.7).

3.2.3 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} Hücre Serilerinde Mdivi-1 ile TMZ'nin Kombine MTT Sonuçları



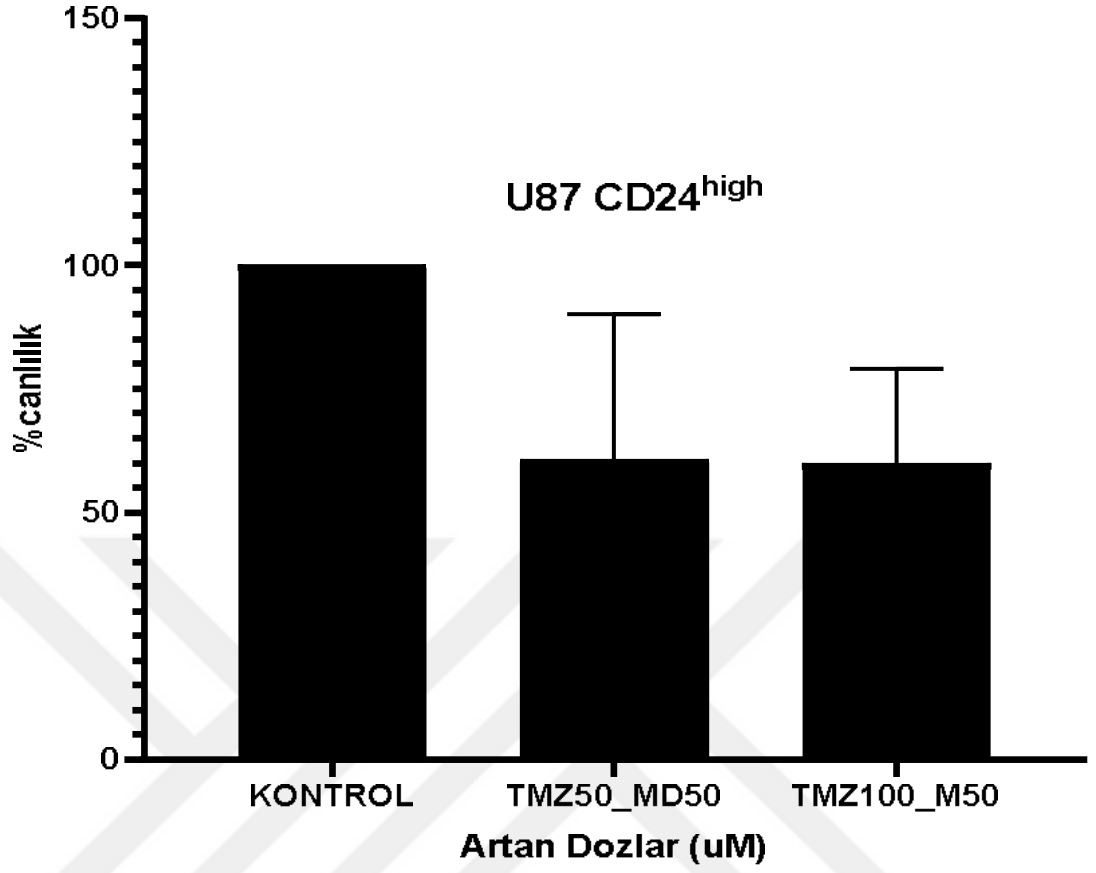
Şekil 3.8 U87 wt hücrelerinde Mdivi-1 ile TMZ'nin 72 saat kombine uygulanmasının MTT sonuçları

Yukarıdaki grafikte U87 wt hücrelerine tek başına Mdivi-1 ve tek başına TMZ uygulanarak belirlenen dozlar ile kombine şekilde MTT denemesi yapılarak hücreler 72 saat boyunca 50 μ M Mdivi-1+50 μ M TMZ ve 50 μ M Mdivi-1+100 μ M TMZ ile muamele edilerek canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre U87 wt hücreleri için 50 μ M Mdivi-1+50 μ M TMZ dozu seçilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.9 U87 CD133^{high} hücrelerinde Mdivi-1 ile TMZ'nin 72 saat kombine uygulanmasının MTT sonuçları

Yukarıdaki grafikte U87 CD133^{high} hücrelerine tek başına Mdivi-1 ve tek başına TMZ uygulanarak belirlenen dozlar ile kombine şekilde MTT denemesi yapılarak hücreler 72 saat boyunca 50 µM Mdivi-1+50 µM TMZ ve 50 µM Mdivi-1+100 µM TMZ ile muamele edilerek canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre U87 CD133^{high} hücreleri için 50 µM Mdivi-1+50 µM TMZ dozu seçilmiştir (Şekil 3.9).

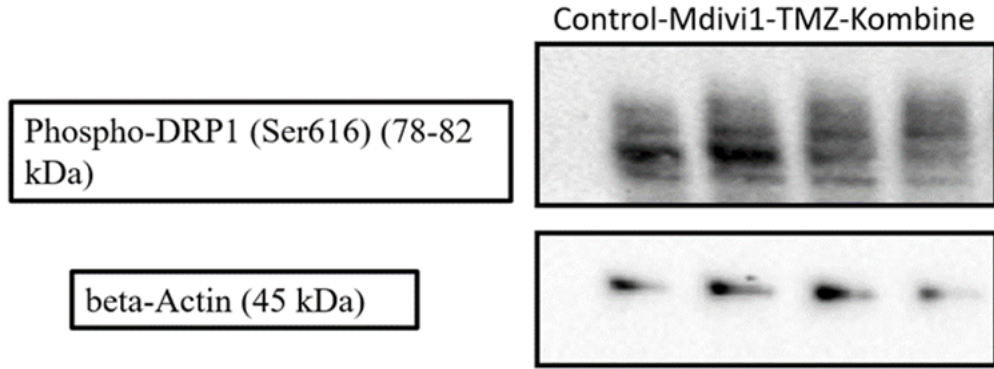


Şekil 3.10 U87 CD24^{high} hücrelerinde Mdivi-1 ile TMZ'nin 72 saat kombine uygulanmasının MTT sonuçları

Yukarıdaki grafikte U87 CD24^{high} hücrelerine tek başına Mdivi-1 ve tek başına TMZ uygulanarak belirlenen dozlar ile kombine şekilde MTT denemesi yapılarak hücreler 72 saat boyunca 50 μ M Mdivi-1+50 μ M TMZ ve 50 μ M Mdivi-1+100 μ M TMZ ile muamele edilerek canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre U87 CD24^{high} hücreleri için 50 μ M Mdivi-1+50 μ M TMZ dozu seçilmiştir (Şekil 3.10).

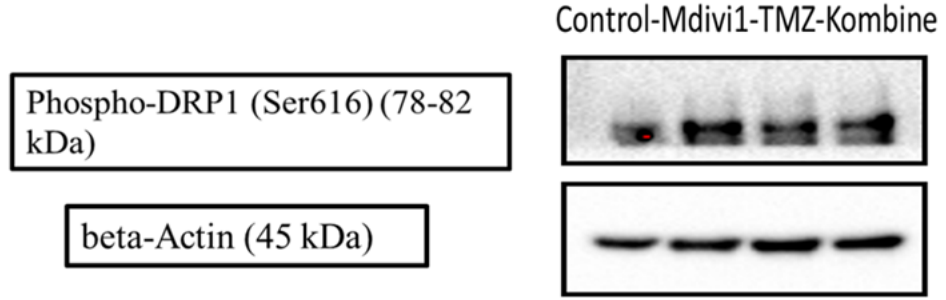
3.3 Protein ifadesi (Western Blotting) Bulguları

Protein ifadesi düzeyi ImageJ analiz programına göre U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde protein bant kalınlıklarına göre yapılmıştır. Bant kalınlıkları Drp1 p-ser616 ve Drp1 p-ser637/Beta Aktin oranı olarak birbirine göre kıyaslanmıştır. Beta aktin antikoru burada internal kontrol olarak kullanılmıştır. İstatiksel analiz ise bu verilere göre yapılmıştır.



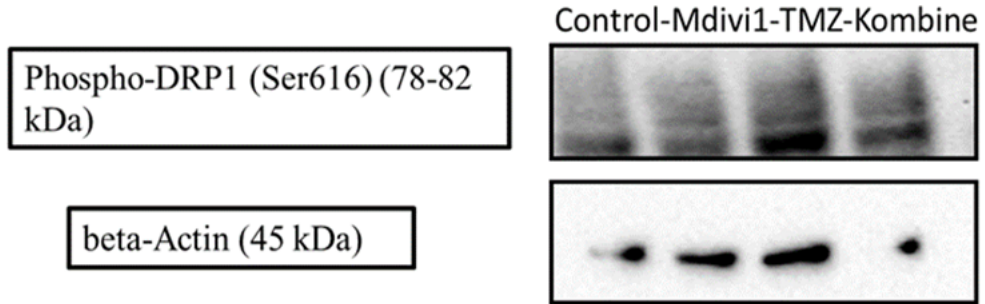
Şekil 3.11 U87 wt hücrelerinde Drp1 p-ser616 protein bantları

U87 wt, U87 CD133^{high} ve U87 CD24^{high} hücrelerinde yapılan MTT deneyleri sonucunda 50 µM Mdivi-1+50 µM TMZ dozu seçilerek Drp1 p-ser616 protein düzeyinde doğrulanması için western blotting yapılmıştır.



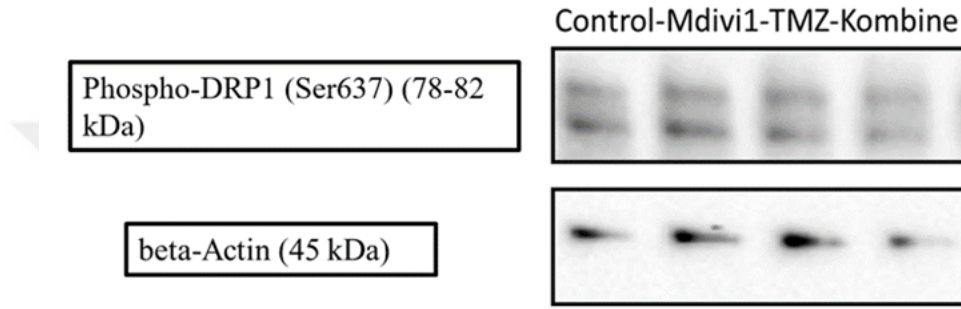
Şekil 3.12 U87 CD133^{high} hücrelerinde Drp1 p-ser616 protein bantları

MTT deneyinde elde edilen sonuçlar doğrultusunda kontrol, sadece 50 μ M Mdivi-1, sadece 50 μ M TMZ ve kombine olarak 50 μ M Mdivi-1+50 μ M TMZ hücrelere 72 saat uygulanarak bu süre sonucunda hücrelerden protein izolasyonu yapılarak western blotting yöntemiyle protein düzeyinde analiz yapılmıştır.



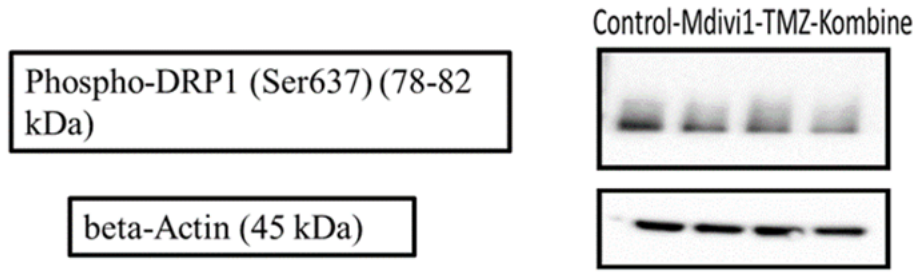
Şekil 3.13 U87 CD24^{high} hücrelerinde Drp1 p-ser616 protein bantları

Fisyonu aktive eden bir modifikasyon olan Serin 616 (S616) fosforilasyonu U87 wt, U87 CD133^{high} ve U87 CD24^{high} hücrelerinde internal kontrol olan beta aktine göre kıyaslanarak kantitatif bir değer elde edilmiştir.



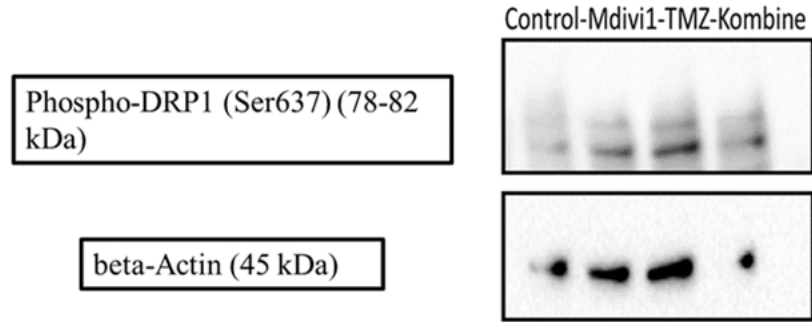
Şekil 3.14 U87 wt hücrelerinde Drp1 p-ser637 protein bantları

U87 wt, U87 CD133^{high} ve U87 CD24^{high} hücrelerinde yapılan MTT deneyleri sonucunda 50 μ M Mdivi-1+50 μ M TMZ dozu seçilerek Drp1 p-ser637 protein düzeyinde doğrulanması için western blotting yapılmıştır.



Şekil 3.15 U87 CD133^{high} hücrelerinde Drp1 p-ser637 protein bantları

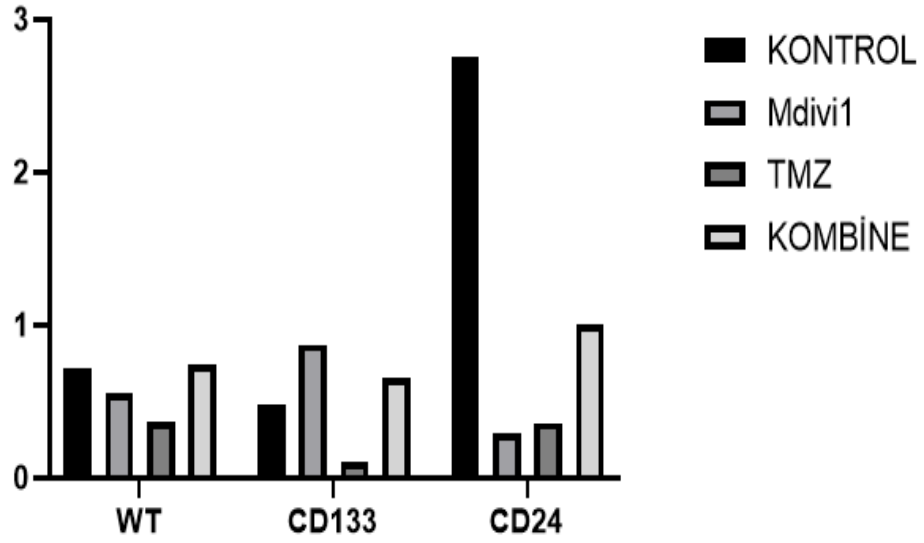
DRP1'in fisyon aktivitesini azalttığını gösteren Serin 637 (S637) fosforilasyonu üç hücre serisinde de protein düzeyinde bakılmıştır.



Şekil 3.16 U87 CD24^{high} hücrelerinde Drp1 p-ser637 protein bantları

Drp1 p-ser616 protein bantları ve Drp1 p-ser637 protein bantlarının analizi yapılarak kantitatif olarak analiz edilerek grafiği elde edilmiştir.

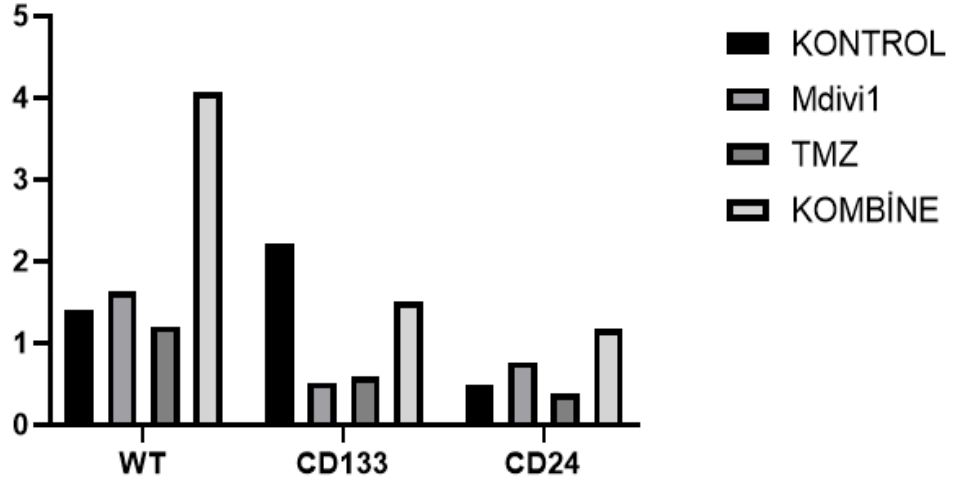
Ser616



Şekil 3.17 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde protein düzeyinde kat artışları

U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde western blotting yapılarak analiz edilen sonuçlarda özellikle U87 CD24^{high} hücrelerinde fisyonun kontrol gurubunda çok yüksek olduğu görülmüştür. 72 saat Mdivi-1 ile muamele sonrası ise fisyonun yaklaşık 3 kat azaldığı gözlenmiştir.

Ser637



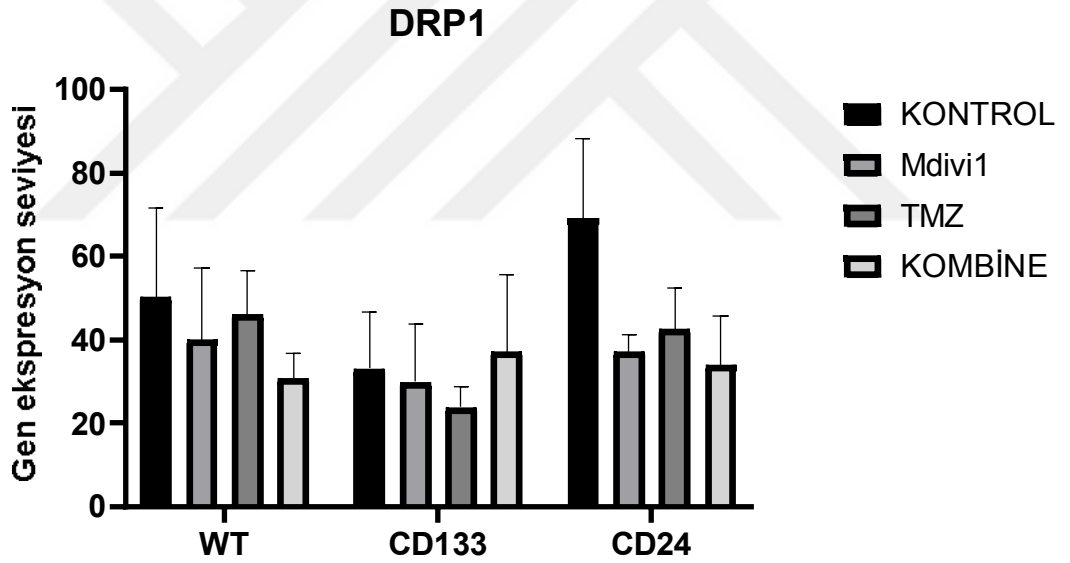
Şekil 3.18 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde protein düzeyinde kat artışları

U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde western blotting yapılarak analiz edilen sonuçlarda özellikle U87 CD133^{high} hücrelerinde fisyonun baskılanması kontrol gurubunda yüksek iken 72 saat Mdivi-1 ile muamele sonrası ise fisyonun baskılanmasının yaklaşık 2 kat azaldığı gözlenmiştir.

3.4 Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

Bu çalışmada qRT-PCR yöntemi kullanılarak genlerin ifadesi kantitatif olarak analiz edilmiştir.

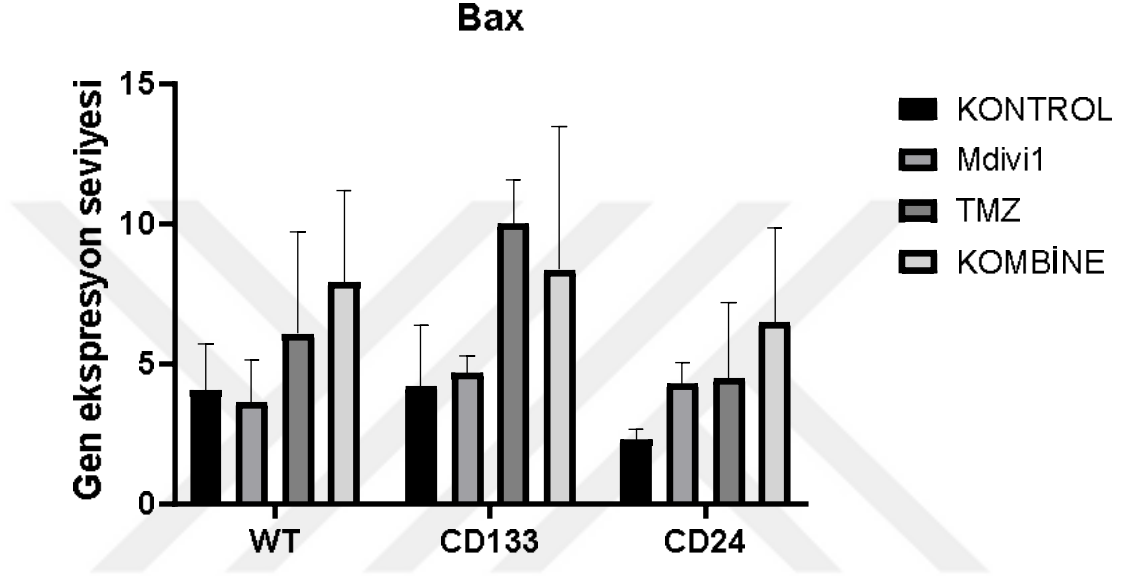
qRT-PCR çalışmamızda kullanılan apoptotik ve otofajik genler ve GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) genlerine özgü primerler "Perl Primer" programı kullanılarak tasarlanmıştır.



Şekil 3.19 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde DRP1 mRNA ifade analizi

Bu tez kapsamında U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde apoptotik ve otofajik genlerin ifadeleri eş zamanlı kantitatif PCR ile analiz edilmiştir. DRP1 ifadesine bakıldığında U87 CD24^{high} hücrelerinde DRP-1 ifadesi yüksek iken

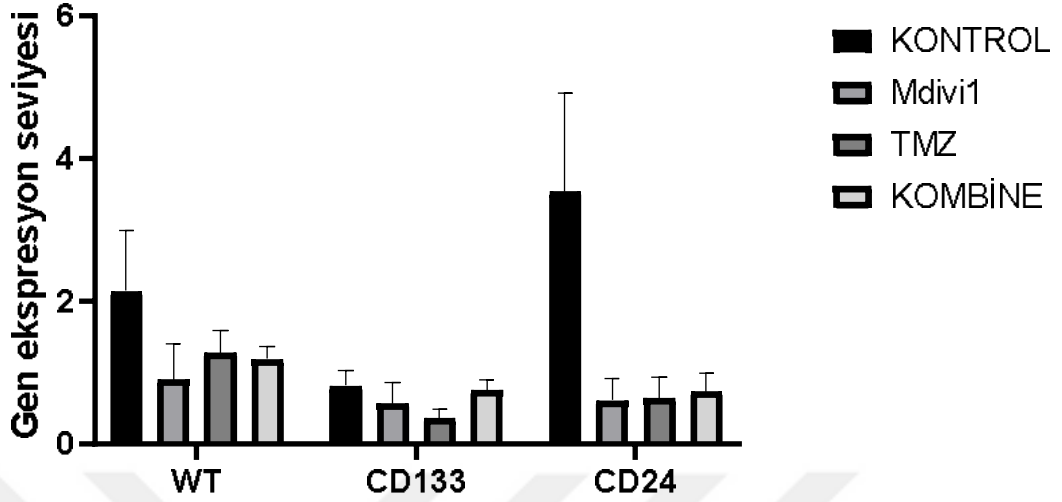
Mdivi-1 uygulaması ve kombine uygulama sonrası DRP-1 ifadesi düştüğü gözlenmiştir ve bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,05).



Şekil 3.20 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Bax mRNA ifade analizi

U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Bax'ın ekspresyon seviyesine bakıldığı zaman U87 CD24^{high} hücrelerinde kombine uygulaması sonrası artış gözlenmiş ve bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,02)

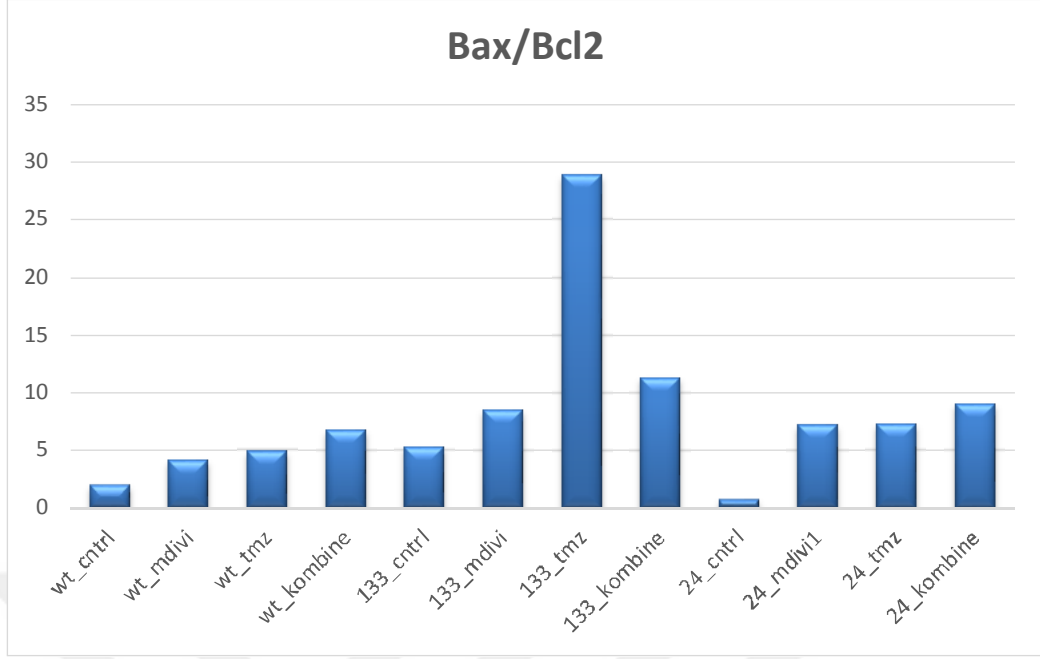
Bcl2



Şekil 3.21 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde BCL2 mRNA ifade analizi

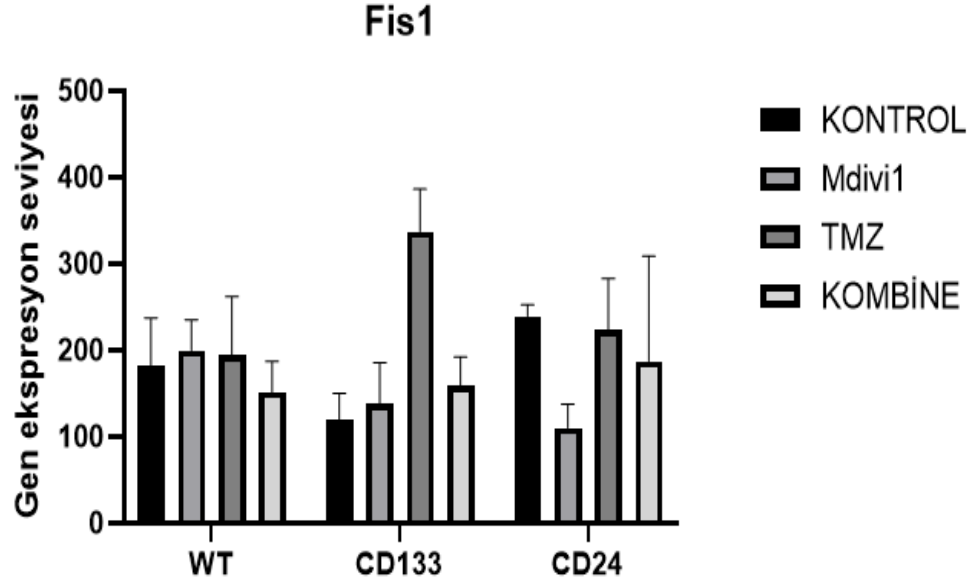
U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde BCL-2'nin mRNA düzeyinde ekspresyonuna bakıldığı zaman U87 wt hücrelerinde Mdivi-1 uygulaması sonrası istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş bulunmuştur (p=0,05).

Ayrıca U87 CD24^{high} hücrelerinde BCL-2'nin mRNA düzeyinde ekspresyonuna bakıldığı zaman ise sadece Mdivi-1, sadece TMZ ve kombine olarak uygulanan gruplarda ciddi bir düşüş olmuştur ve bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,02).



Şekil 3.22 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Bax/Bcl2 oranının gösterilmesi

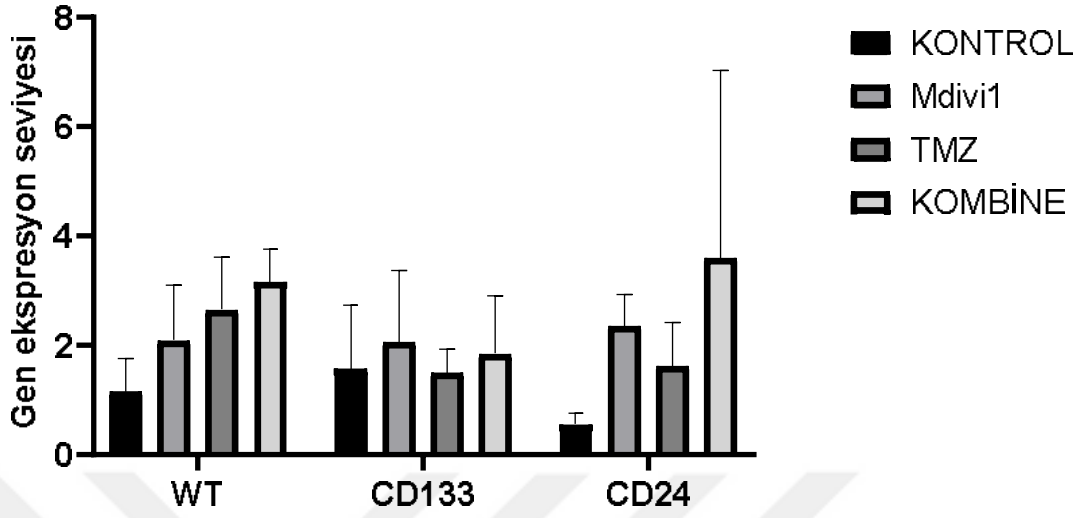
U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Bax/Bcl2 oranına bakıldığı zaman üç hücre serisinde de kontrol grubuna göre ilaç uygulanan gruplarda bu oranının arttığı ve dolayısıyla apoptozun da arttığı bu sonuçlardan çıkarılabilir.



Şekil 3.23 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Fis1 mRNA ifade analizi

U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Fis1' in ekspresyon seviyesine bakıldığı zaman U87 CD24^{high} hücrelerinde Mdivi-1 uygulaması sonrası anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.

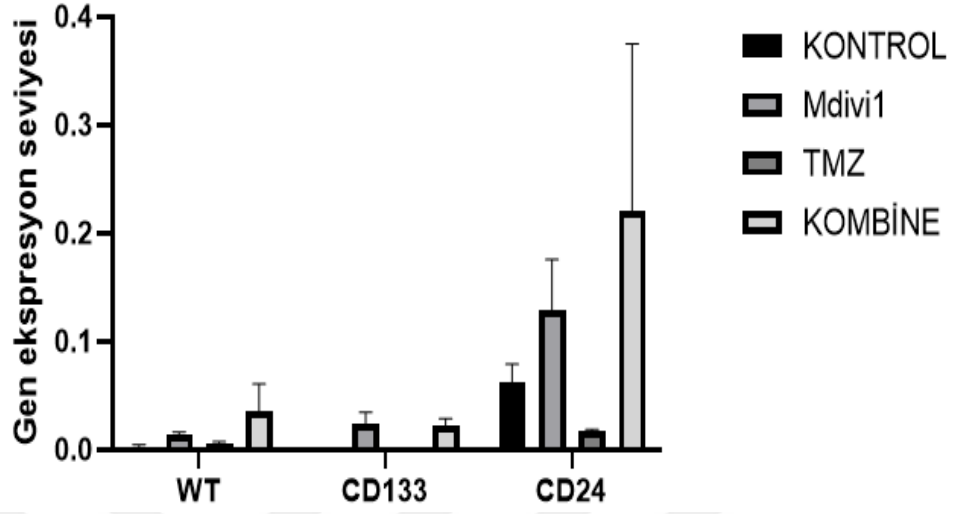
Pink1



Şekil 3.24 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Pink1 mRNA ifade analizi

U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Pink1'in ekspresyon seviyesinde U87 wt hücrelerinde sadece TMZ ve kombine uygulanan grupta bir artış gözlenmiş ve bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,02).

Parkin

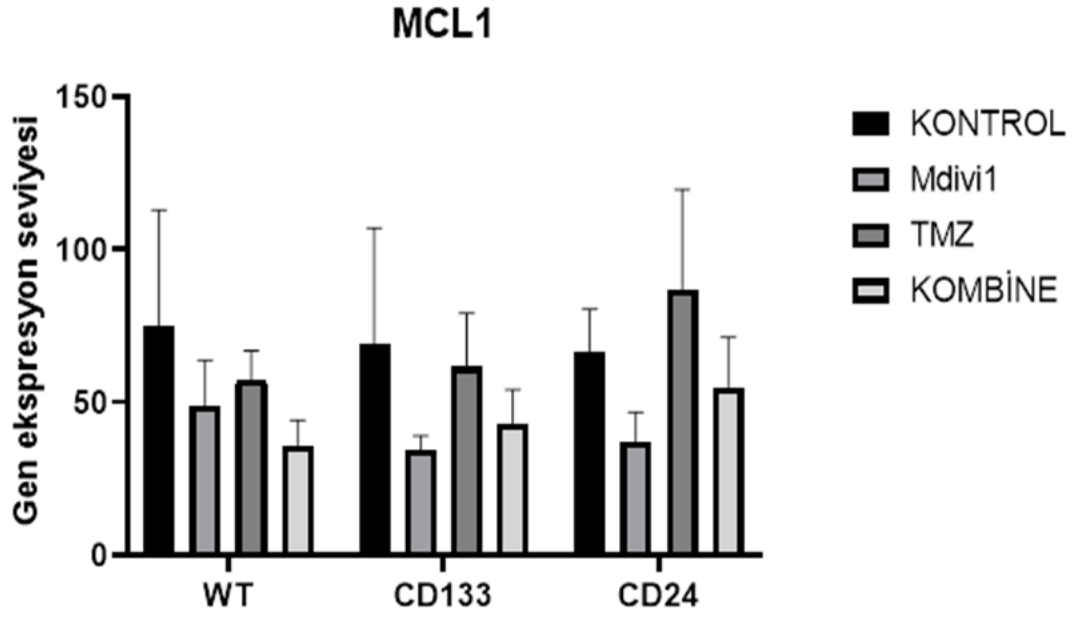


Şekil 3.25 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Parkin mRNA ifade analizi

U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Parkin'in ekspresyon seviyesine bakıldığı zaman U87 wt sadece Mdivi-1 ve kombine uygulanan gruplardaki artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,02).

Ayrıca U87 CD133^{high} hücrelerinde sadece Mdivi-1 ve kombine uygulanan gruplardaki artış da istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,02).

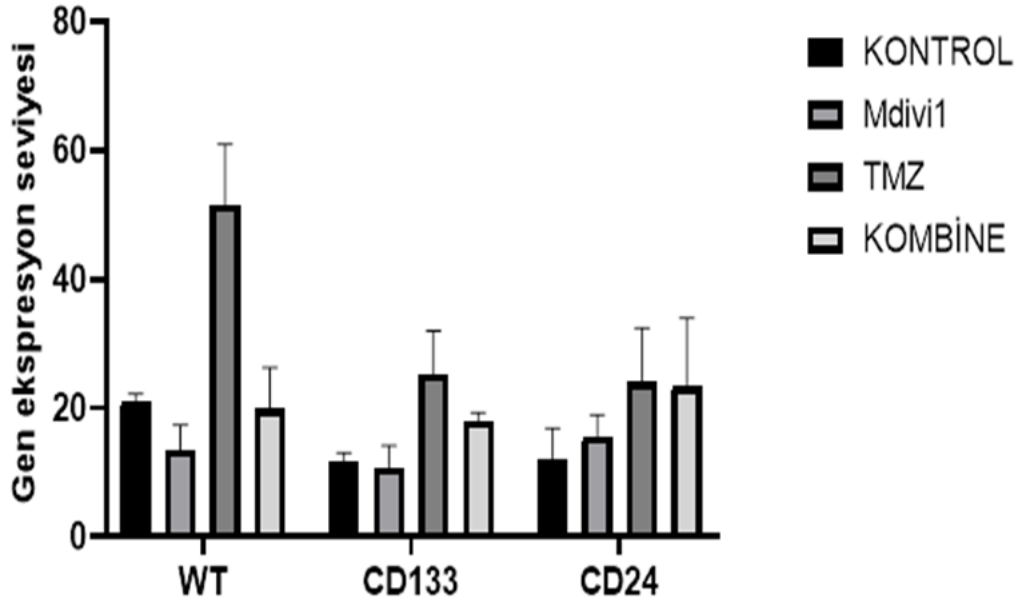
U87 CD24^{high} hücrelerinde ise sadece Mdivi-1 ve kombine uygulanan gruplardaki artış da istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,02).



Şekil 3.26 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde MCL-1 mRNA ifade analizi

Mdivi-1 uygulandıktan sonra apoptozis analizi için apoptotik genlerden pro-apoptotik Bax ve anti-apoptotik genlerden Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 oranları transkript düzeyinde değerlendirilmiştir. Her üç hücre serisinde de kombine uygulama sonrası apoptozun arttığı gözlenmiştir.

BCLXL

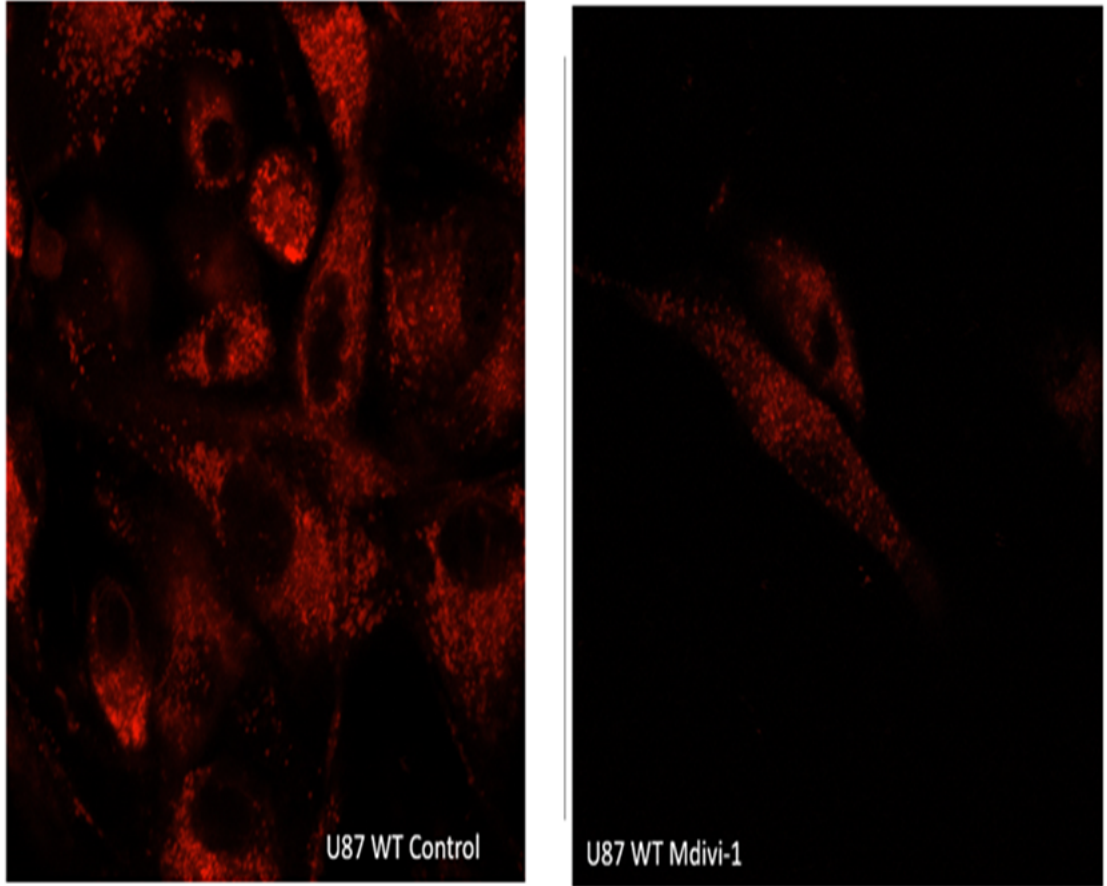


Şekil 3.27 U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde BCL-XL mRNA ifade analizi

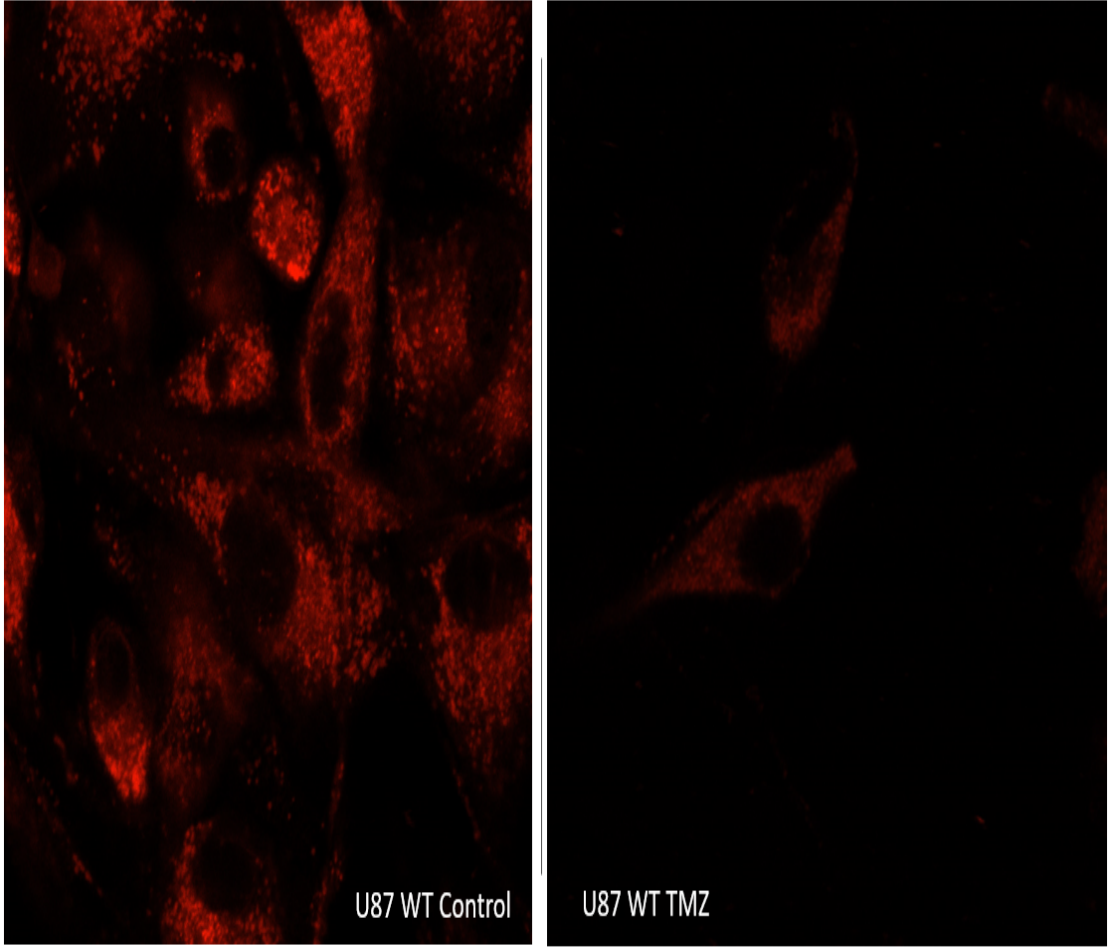
En fazla Bcl-2 ekspresyonunda azalma U87 CD24^{high} hücrelerinde gözlenmiştir. Bu hücrelerin Mdivi-1 uygulamasına cevaben Bax/Bcl-2 oranının arttığı ve apoptozis uyarımına en duyarlı hücreler olduğu belirlenmiştir.

3.5 Konfokal Mikroskop Görüntüleri

U87 wt, U87 CD133^{high} ve U87 CD24^{high} hücreler Mitotracker Red ile yapılmış olan boyamalar sonucu konfokal mikroskopunda görüntülenerek mitokondri morfolojisindeki değişimler incelenmiştir.

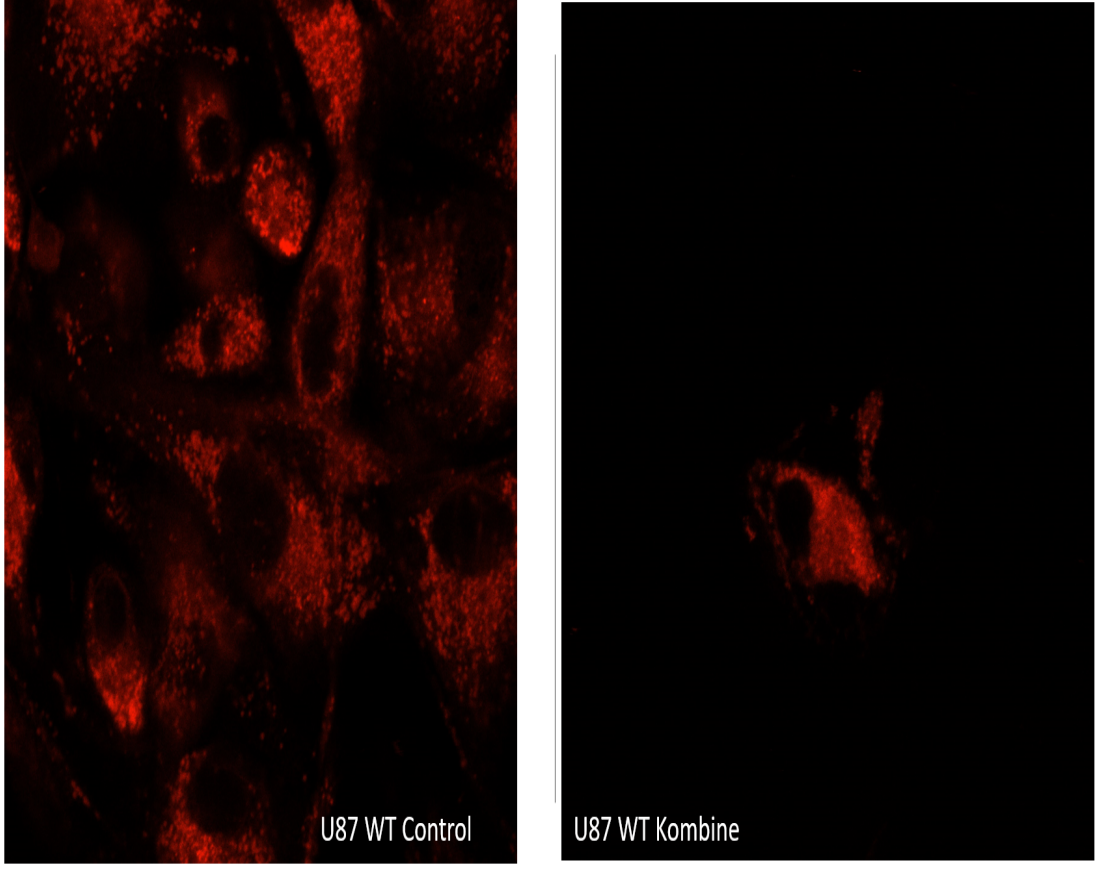


Şekil 3.28 U87 wt hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü

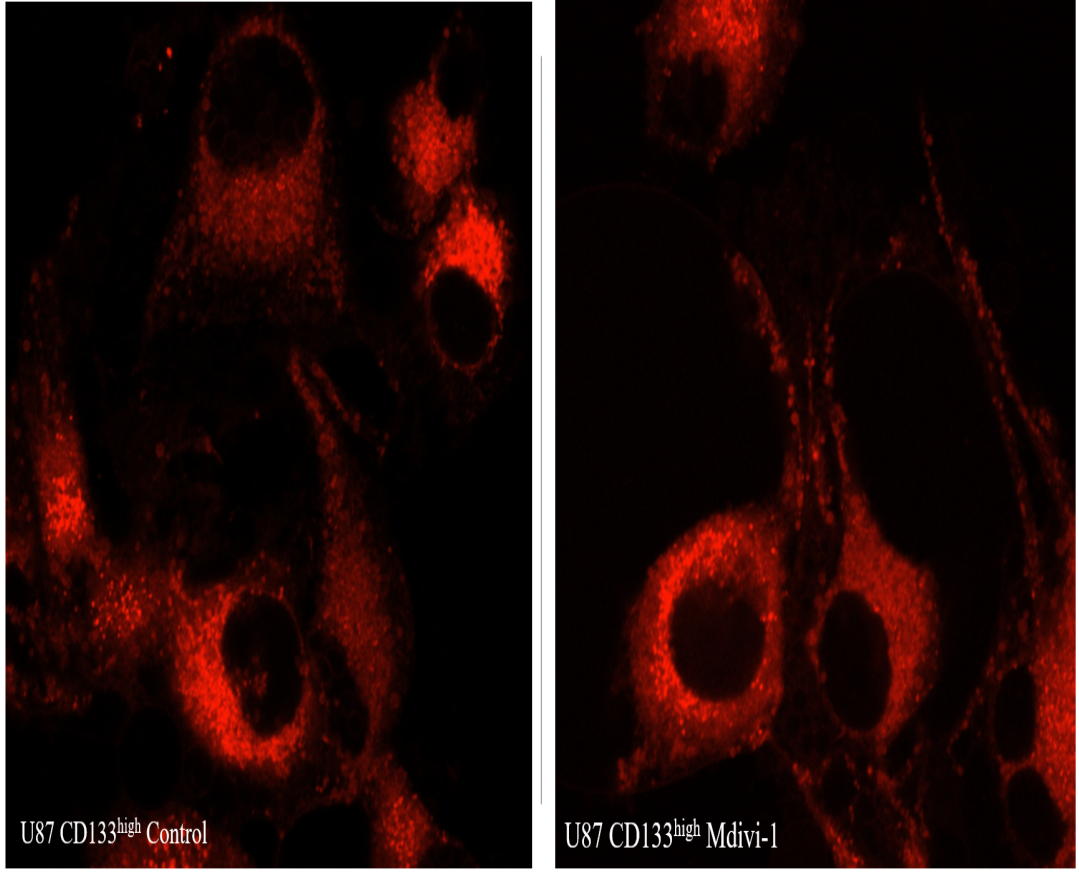


Şekil 3.29 U87 wt hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü

U87 wt hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanarak konfokal mikroskobu ile mitokondri morfolojisindeki değişimleri incelemek amaçlanmıştır. Kontrol grubuna göre ilaçlı gruplarda mitokondri sayısında azalma gözlene de mitokondriyal fragmentasyonun azaldığı net bir şekilde ayırt edilememiştir.

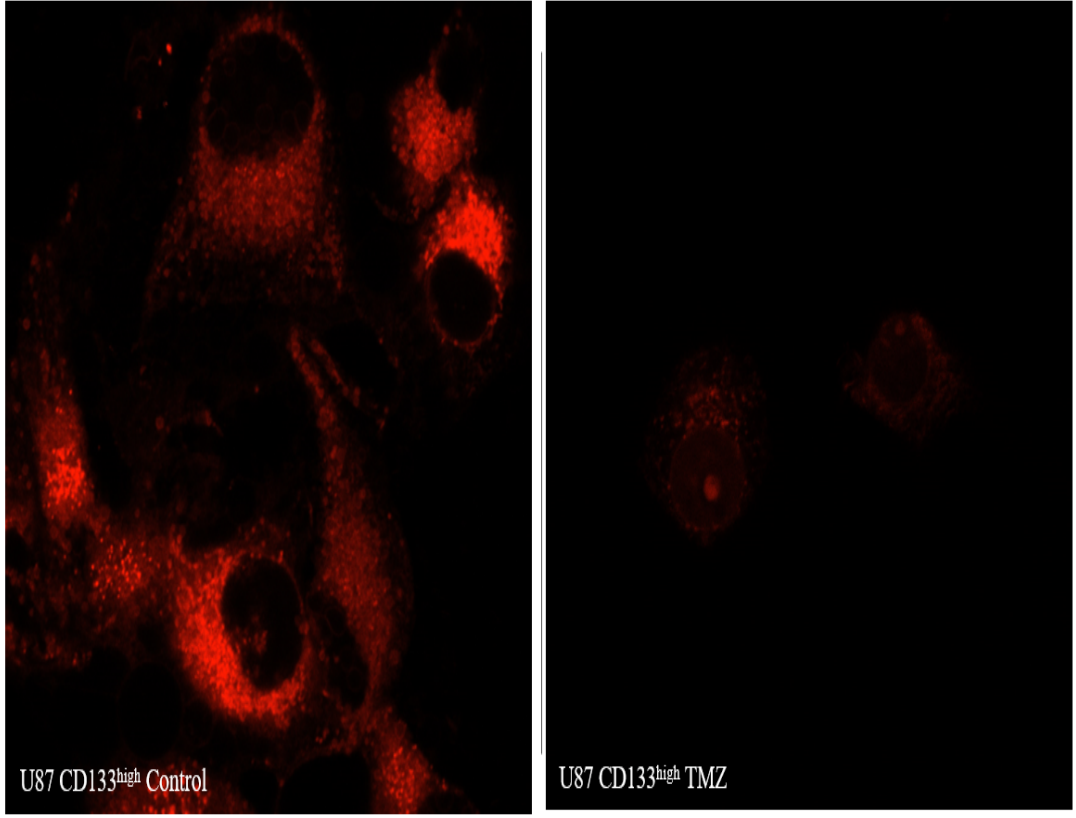


Şekil 3.30 U87 wt hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü

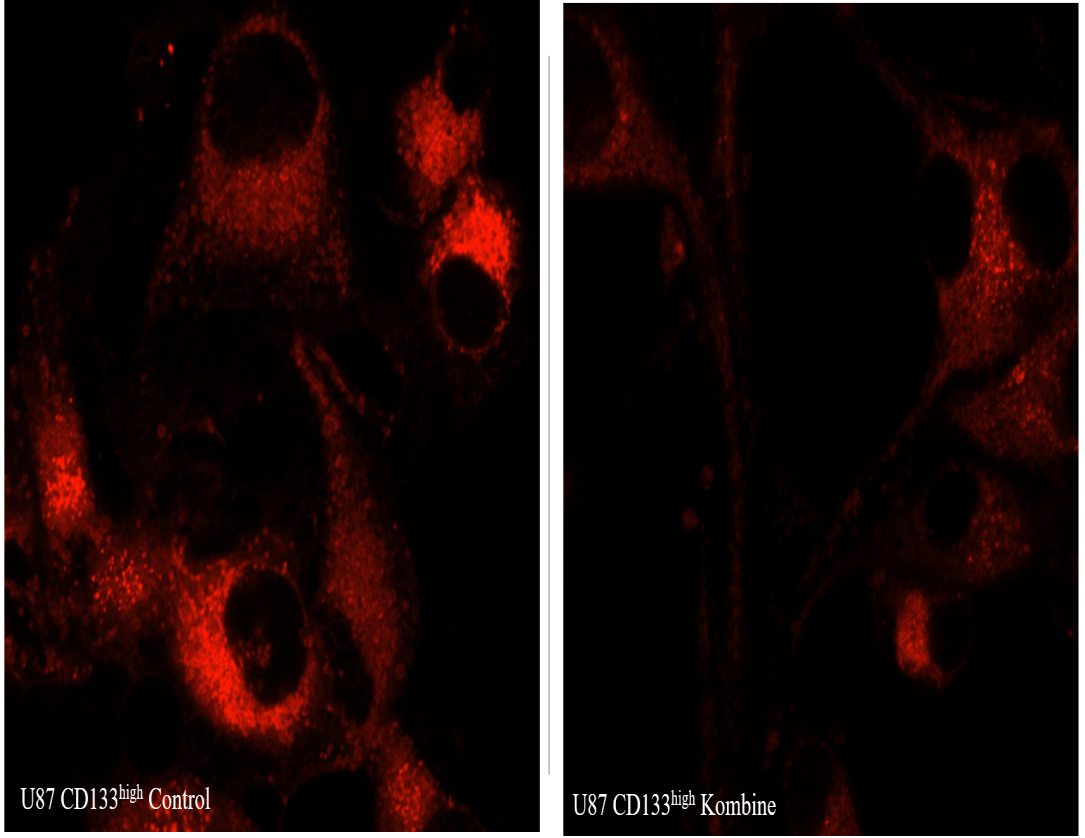


Şekil 3.31 U87 CD133^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü

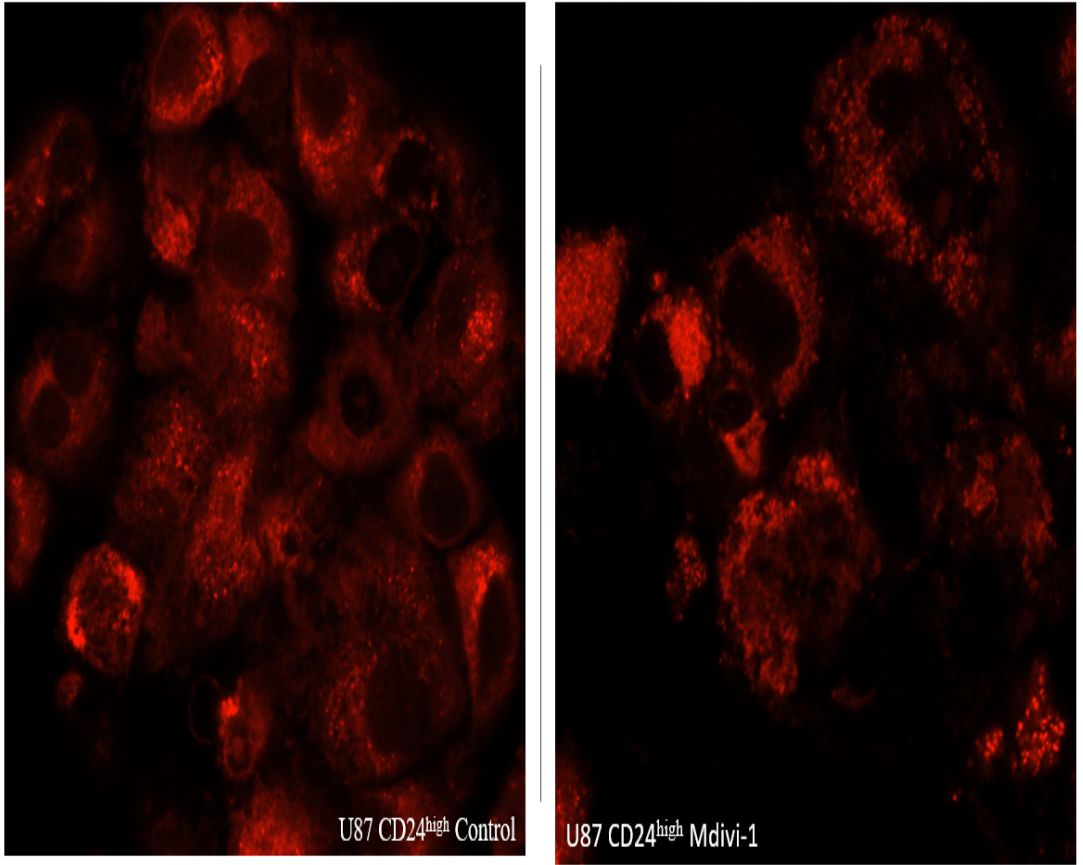
U87 CD133^{high} hücreleri Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanarak konfokal mikroskobu ile mitokondri morfolojisindeki değişimleri incelemek amaçlanmıştır. Görüntüler 63X büyütme ile çekilmiştir.



Şekil 3.32 U87 CD133^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü

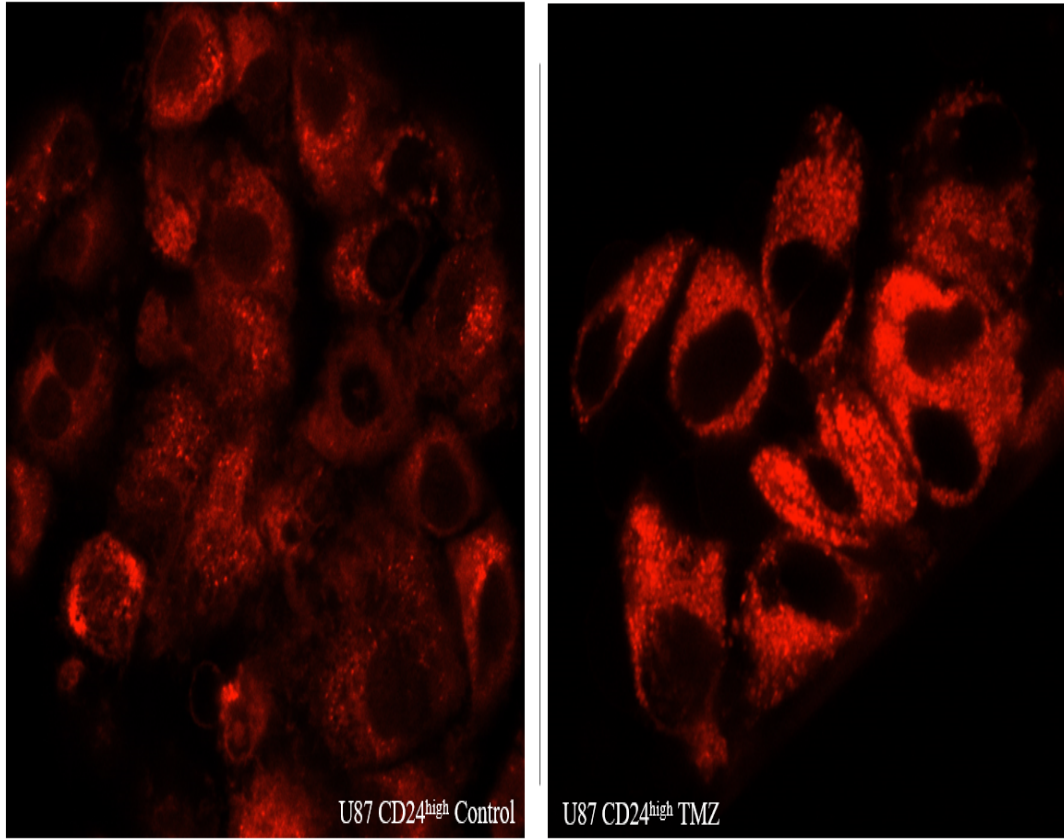


Şekil 3.33 U87 CD133^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü

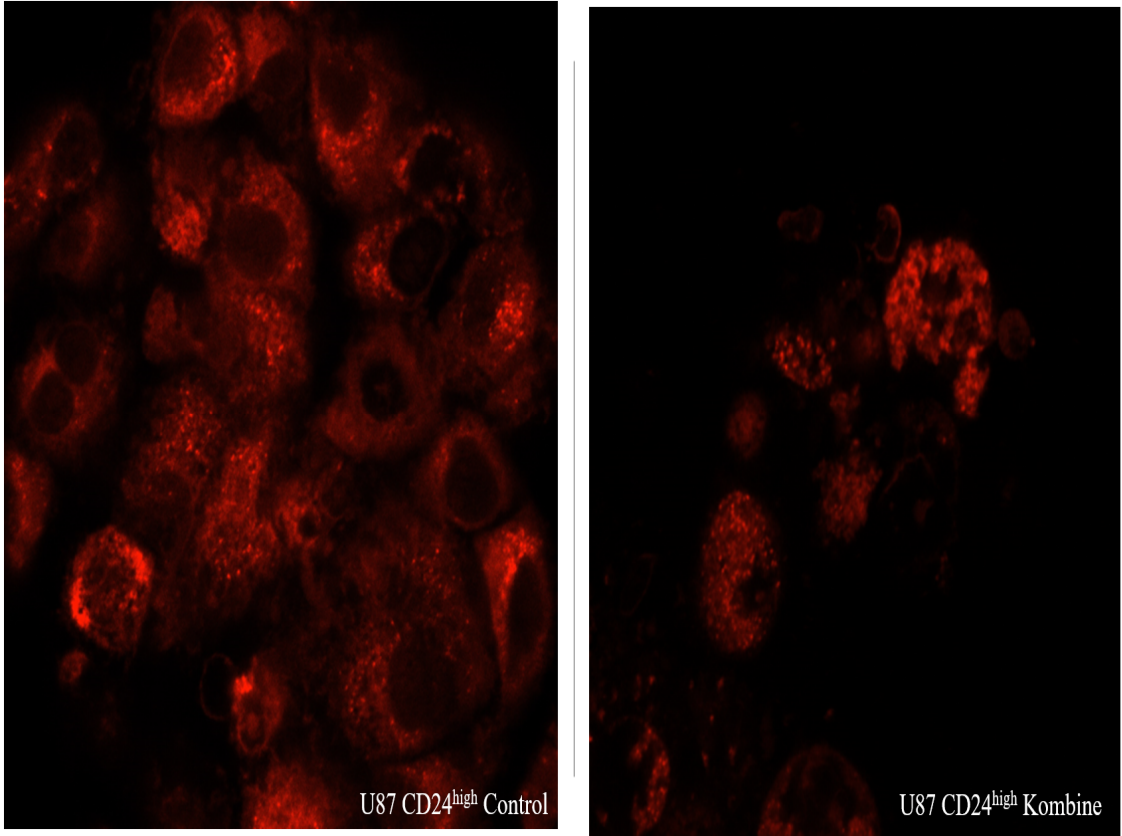


Şekil 3.34 U87 CD24^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü

U87 CD24^{high} hücreleri Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanarak konfokal mikroskobu ile mitokondri morfolojisindeki değişimleri incelemek amaçlanmıştır. Kontrol grubuna göre ilaçlı gruplarda mitokondri sayısında azalma gözlenirse de mitokondriyal fragmentasyonun azaldığı net bir şekilde ayırt edilememiştir.



Şekil 3.35 U87 CD24^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü



Şekil 3.36 U87 CD24^{high} hücrelerinin Mitotracker Red (kırmızı) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü

4. TARTIŞMA

Glioblastoma multiform (GBM), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre derece IV beyin tümörüdür. Yetişkinlerde yoğun hücre proliferasyonu, istilacı büyüme ve anormal anjiyogenez ile karakterize en yaygın birincil beyin tümörü olarak bilinir.

GBM tedavisi, cerrahi rezeksiyonu takiben radyoterapi ve alkilleyici ajan olan temozolomid (TMZ) temelli kemoterapiyi içermektedir. Ancak, uygulanan yoğun tedaviye rağmen, GBM hastalarının ortalama yaşam süresi 14-17 aydır ve hastaların sadece %5' i beş yıldan daha uzun süre hayatta kalabilmektedir (Prager ve ark., 2020)

GBM sıklıkla ölümcül bir hastalıktır ve GBM hastalarına uygulanan mevcut standart tedavinin sadece minimal düzeyde etkili olduğu ve çoğunlukla nüksetme ile sonuçlandığı belirtilmektedir. Ayrıca, GBM; tümör baskılayıcılar, onkogenler veya ölüm yolaklarında sık görülen işlev bozuklukları ve tedaviye direnç kazanımı nedeniyle yaklaşık 6 ayda daha agresif olarak nüks etmektedir.

Nitekim, intratümöral heterojenite ve tedavi direnci ile karakterize GBM'de; glioblastoma kök hücrelerinin (GKH) varlığının tümörün nüksetmesine sebep olduğu belirtilmektedir.

GKH'lerin tümörün ilerlemesi, tedaviye direnç ve nüksteki öneminden dolayı, son dönem çalışmalar GKH'lerin karakterizasyonu ve elimine edilmesi üzerine yoğunlaşmıştır (King ve Benhabbour, 2021)

Yapılan alışmalar, farklı moleküler, genetik ve metabolik özellikleri bakımından GKH'lerin nöral kök hücrelerden (NKH) ve farklılaşmış GBM hücrelerinden farklı olduklarını göstermektedir. Dolayısıyla, GKH'leri hedef alan yeni terapötik stratejilerin geliştirilebilmesi için GKH'lerin kök hücre özelliklerinin devamlılığını sağlayan mekanizmaların tam olarak anlaşılması önem arz etmektedir.

Tedavi edilemeyen birincil beyin malignansilerinden olan GBM, hedeflenebilecek belirgin bir tümörijenik yolağın bulunmaması, GBM'de terapötik yaklaşımları ve araştırmaları zorlaştırmaktadır. GBM'de konvansiyonel kemoterapötik ajan olan ve kesin tedavi içermeyen TMZ'ye gelişen ilaç direncinde yüksek MGMT ifadesi, artan anjiyogenez, apoptozise karşı gelişen direnç, mitokondriyal mutasyonlar ve Glioblastoma başlatan hücrelerin (TIC) bulunması gibi çeşitli mekanizmalar tedavi direncinin sebepleri arasında sayılabilir.

Hücrede enerji sağlayan alt birim olan mitokondri, apoptozis, ROS retimi ve kalsiyum homeostazisini düzenlemekte etkilidir. Mitokondriyal kalite kontrolünde yer alan fisyon ve füzyon ile mitokondri morfolojisi değişebilmektedir. Fisyon miktarında artış gibi mitokondriyal dinamiklerdeki düzensizlikler tümör gelişimine ve ilerlemesine neden olabilmektedir. Bu yüzden kanser tedavisinde mitokondriyal fisyonun hedeflenmesi son zamanlarda kullanılan önemli stratejiler arasında yer almaktadır.

Bir kinazolinon türevi olan Mdivi-1 mitokondriyal fisyon inhibitörü olarak kullanılmaktadır. İlk kez 2008 de tümör büyümesini güçlü bir Şekilde baskıladığı ve önemli anti-tümörijenik etkisi olduğu ve apoptozisi uyardığı bildirilmiştir. Normal epitel ve fibroblast hücrelerinde anti-apoptotik veya anti-proliferatif etkisi olmadığı gösterilen Mdivi-1 DRP-1 inhibitörü olarak fisyonu baskılamaktadır.

Mdivi-1'in anti-neoplastik etkilerini DRP-1'den bağımsız gösterdiği ile ilgili bilgiler de gelmeye başlamıştır.

Mitokondri kalite kontrolü, GBM köklüğünü, dormansi ve farklılaşmasının sürdürülmesini düzenler ve mitokondriyal parçalanma GKH'ların tedaviye direnç geliştirmesine sebep olduğu bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında GBM tedavisinde etkili olabileceği düşünülen alternatif bir tedavi protokolü olarak mitokondriyal fisyon inhibitörü olan Mdivi-1'in tek başına veya TMZ ile kombine kullanılmasının etkinliği GKH düzeyinde in vitro araştırılmıştır.

Courtois ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada pankreatik KHK'lerde Mdivi-1 ile inhibisyonda, KHK içeriğini etkili bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca Mdivi-1 muamelesi sonrası KHK'lerde enerji krizini ve apoptozu tetiklediği de gösterilmiştir. Mdivi-1 inhibisyonu ile mitokondriyal fisyonun baskılanması hedeflenerek pankreatik KHK'lerde tedavi için önemli bir terapötik stratejik hedef olabileceği vurgulanmıştır (Courtois ve ark., 2021).

Mitokondriyal fisyon genellikle hücrel strese yanıt olarak indüklenir ve birçok kanser hücresinde mitokondriyal fragmentasyon gözlenir. DRP1'i hedefleyerek mitokondriyal fisyonun engellenmesini sağlamak, kanser hücresinin büyümesini yavaşlatır. Bu nedenle, DRP1 aktivitesinin düzenlenmesi ve mitokondriyal fisyon, kanser hücrelerinde oldukça kritik bir süreçtir (Ferreira-da-Silva ve ark., 2015; Wan ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2013).

2015 yılında Xie ve ark. tarafından yapılan çalışmada; GKH modeli olarak kullanılan beyin tümörü başlatıcı (CD133 ve ayrıca evreye özgü embriyonik antijen 1

(SSEA1) veya CD15 ifadesi yüksek) hücrelerde RNA interferans teknolojisi veya Mdivi-1 aracılı farmakolojik inhibisyonu kullanılarak DRP-1'in hedeflenmesi bu hücrelerde apoptozisi indüklediği ve tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. GBM de DRP'in hedeflendiği bu tek yayın bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

Ancak bu tez çalışmasında, bulk tümör hücreleri olarak U87 hücreleri, tümör başlatıcı ve dirençten sorumlu olan GKH olarak CD133^{high} hücreleri ve CD24^{high} yüksek ifade eden üçüncü bir grup hücrede fisyonun Mdivi-1 ile baskılanmasının tek başına ve TMZ ile birlikte etkileri literatürde ilk kez araştırılmıştır.

Mdivi-1, GBM standart tedavisinde uygulanan TMZ ile kombine şekilde uygulanmıştır. Bu kapsamda Mdivi-1 ve TMZ' nin IC50 dozları belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda da Mdivi-1 uygulanan wt U87 hücreleri, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde özellikle KHK'lerde kontrole göre canlılığın ciddi şekilde azaldığı gösterilmiştir. Kombine ilaç denemelerimizde 50 uM ve 50 uM TMZ'nin kombine uygulanmasının hücrelerde proliferasyonu baskıladığı ve apoptozisi uyardığı canlılığın azaldığı gösterilmiştir. Fisyon genleri RT-PCR ile transkript düzeyinde analiz edilmiş ve özellikle U87 CD24^{high} yüksek ifade eden GBM hücrelerinde wt U87 ve U87133^{high} hücrelerine kıyasla Drp1 ekspresyonunun istatistiksel düzeyde anlamlı yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,05)

Fisyonda bir diğer görevli gen olan Fis1 ifadesi ise beklenildiği gibi kontrol gruplarında yüksek bulunmuş, Mdivi-1 uygulandıktan sonra wt U87 ve CD133^{high} hücrelerinde Fis-1 ifadesi değişmezken özellikle U87 CD24^{high} KKH grubunda bu gen ekspresyonunda anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.

CD24 proteinin GBM ile ilişkilendirilmesi ise 2012 yılında Deng ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile rapor edilmiştir. Yüz elli bir glioma dokusu ile yapılan bu çalışmada CD24 proteinin hem mRNA hem de protein seviyesi olarak GBM dokularında yüksek ifade edildiği belirtilmiştir (Deng ve ark.2012). Bu

proteinin GBM dokularının kök hücrelerinde yüksek olabileceği ve bir kök hücre belirteci olabileceğinden ilk defa 2013 yılında yapılan bir çalışmada bahsedilmiştir. Bu çalışmada GBM, meme ve pankreatik tümörlerden tümör başlatıcı hücreler (TBH) toplanmış ve bu hücrelerdeki ortak yüzey genleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak ise CD133, CD44 ve CD24 yüzey belirteçleri yüksek bulunmuştur (Benayoun ve Shaked 2013). Ardından yapılan bir çalışma ise GBM kök hücrelerde kök hücre karakterinden sorumlu olduğu düşünülen Gli rapor edilmiş, bu genin beraberinde migrasyon/invazyondan sorumlu olduğu düşünülen CD24'ün de ifadesini artırdığı gösterilmiştir (Santoni ve ark.2013). Bir diğer çalışmada ise 5-fluorouracil (5-FU) ilacının GBM kök hücre popülasyonu üzerindeki etkisine bakılmış ve CD24^{high}/CD44^{low} ilaç uygulandıktan sonra Notch1 ifade artmasına bağlı kök hücrelerin sayısında artış saptanmıştır (Chockalingam ve Ghosh 2013).

CD24+ CD133+ karaciğer kanser kök hücrelerinin, kök hücre karakteri gösterdiği, tümör oluşumunu başlattığı ve progresyonunda rol oynadığı, CD24+ CD133+ hücrelerinde iNOS ifadesinin arttığı ve iNOS/NO, Notch1 aracılı TACE/ADAM17 aracılı kötü prognoza yol açtığı belirlenmiştir (Wang ve ark. 2018).

CD24, Runz ve ark. tarafından bir “gate keeper” olarak tanımlanmış ve meme kanseri hücrelerinde lipid raftlarında yer aldığı β 1 integrin yerleşimine katkıda bulunduğu böylece tümör hücrelerinin adezyonunu ve göçünü etkilediği bildirilmiştir.

CD24'ün tümör hücrelerinde ortak olarak Src kinaz, Wnt/ β katenin, EGFR sinyal yolunu uyardığı, çeşitli tümörlerde HER2, Ral-Gtpase ve MAPK yolları üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir. CD24 aracılı aktifleşen kinazların aktivasyonu tümör gelişiminde önemli rol oynamaktadır.

Mdivi-1 uygulandıktan sonra apoptozis analizi için apoptotik genlerden pro-apoptotik Bax ve anti-apoptotik genlerden Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 oranları transkript düzeyinde değerlendirilmiştir. Her üç hücre serisinde de kombine uygulama sonrası apoptozun arttığı gözlenmiştir.

Anti-apoptotik protein olan Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 ifadelerinde ise her üç hücre serisinde de Mdivi-1 sonrası ekspresyon seviyesi azalarak apoptozun teşvik edildiği gösterilmiştir. Mdivi-1 uygulanan 3 grup hücreden bu inhibitöre en duyarlı hücrelerin yine U87 CD24^{high} ifade eden hücreler olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca yine en fazla Bcl-2 ekspresyonunda azalma U87 CD24^{high} hücrelerinde gözlenmiştir. Bu hücrelerin Mdivi-1 uygulamasına cevaben Bax/Bcl-2 oranının arttığı ve apoptozis uyarımına en duyarlı hücreler olduğu belirlenmiştir.

Beyin tümörü başlatıcı hücrelerde DRP-1 aracılı sağ-kalım mekanizmasında; siklin bağımlı kinaz 5 (CDK5)'in Ser616'dan Drp1'i fosforile ederek aktivasyonuna, Ca²⁺-kalmodulin bağımlı protein kinaz 2 (CAMK2)'in ise beyin tümörünü başlatamayan tümör hücrelerinde DRP-1'i Ser637'den fosforile ederek inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Sonuçta; CDK5/CAMK2-DRP1-AMPK sinyal doğrultusunun gliomalarda önem taşıması ve Drp1 aktivasyonunun GBM'da kötü prognoz ile korelasyon göstermesi; mitokondriyal dinamiğin beyin tümörü başlatıcı hücreler için terapötik bir hedefi temsil edebileceği vurgulanmıştır.

DRP1, aktivitesini düzenleyen çok sayıda amino asit residüsüne sahiptir. Serin 616'da (S616) fosforilasyon fisyonu aktive eden bir modifikasyon iken; Serin 637'deki (S637) fosforilasyon DRP1'in fisyon aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Kashatus ve ark., 2015; Taguchi ve ark., 2007; Chang ve ark., 2007).

Drp'nin Serin 637'den fosforilasyonu baskılanması ve sitozolde tutulması anlamına gelirken, Drp1'in p-ser637'den fosforilasyonu ise mitokondri zarına geçmesine ve fisyonun başlatılmasına ve sonuçta fragmentasyona neden olmaktadır.

Bizim çalışmamız kapsamında protein düzeyinde U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Serin 616 (Drp1 p-ser616) ifadesine bakıldığı zaman özellikle U87 CD24^{high} KKH' lerinde kontrolde fisyon çok yüksek iken DRP1 inhibitörü Mdivi-1 uygulandığı zaman fisyonun ciddi oranda düştüğü gözlenmiştir. Mdivi-1'in protein düzeyinde aktive Drp'in baskılayıcı etkisini en fazla CD24^{high} hücreleri üzerinde gösterdiği belirlenmiştir.

U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde DRP1 ifadesine transkript düzeyinde RT-PCR ile bakıldığında U87 CD24^{high} hücrelerinde DRP-1 ifadesi diğer hücrelere kıyasla en yüksek bulunmuş, yine sadece bu hücrelerde Mdivi-1 tek başına ve TMZ ile kombine uygulandığında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p=0,05).

U87 wt ve en fazla U87 CD24^{high} hücrelerinde Mdivi-1 uygulandıktan sonra baskılayıcı fosforilasyonun arttığı aktive edici fosforile DRP-1'in azaldığı western blot ile gösterilmiştir. Ayrıca Mdivi-1 ve TMZ kombine verilen üç hücre serisinde de aktive edici Serin616'dan fosforillenmiş protein miktarına bağlı olarak fisyonun baskılandığı gözlenmiştir.

CD24^{high} hücrelerinde başlangıç Drp1 transkripsiyon düzeyinin en yüksek olması ve Mdivi-1 uygulandıktan sonra Drp1 ifadesinde azalma western ile desteklenmiştir.

Drp1 fosforilasyonun çeşitli kinazlar ile gerçekleştirildiği bilinmektedir (Roe ve Qi, 2018). CD24 yolağında Src, MAPK ve özellikle ERK gibi aktifleşen kinazların Drp Ser⁶¹⁶ fosforilasyonuna yol açtığı ve bu yüzden Drp1 inhibisyonundan en fazla CD24 ifade eden hücrelerin etkilendiği **ilk kez** bu tez çalışmasında belirlenmiştir.

Drp1'in aktive edici fosforilasyonu ve mitokondriye çağrılmasından sorumlu olan PINK1, mitokondride bulunan farazi bir serin/treonin kinazdır. PINK1, hücrel stres durumlarında Parkin ve Ubikuitini fosforilleyerek E3 ligazı aktive etmek üzere Parkini mitokondriye çağırır. Bu durum, Parkin E3 ligazında aktivasyona ve mitokondriyal dış zar proteinlerinin ubikuitinlenmesine bu da ubikuitinlenmiş proteinlerin otofajik reseptörler tarafından tanınmasına ve mitokondrinin yıkım için otofagozomlar tarafından yutulmasına neden olur. Böylece, hasarlı mitokondrinin mitofaji aracılı temizlenmesi ile sonuçlanır.

PINK1 ve Parkin, önemli mitokondriyal füzyon proteinleri Mitofusin 1 ve 2'nin degradasyonunu uyarır ve PINK1 ise Drp1'i mitokondriye çağırılması ile mitokondriyal fisyonu uyarıcı aktivite göstermektedir.

Bu yüzden Parkin ile PINK1 aktivasyonunun fisyonu uyardığı füzyonu ise baskıladığı ve mitokondri kalite kontrolünde genelde fisyonu uyardıkları yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

Mdivi1'in mitofaji üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla PINK1 ve PARKIN gen ifadeleri RT-PCR ile araştırılmıştır. İnhibitör uygulanmayan gruplarda, PINK1 ifadesi CD133^{high} hücrelerinde en yüksek bulunurken, PARKIN düzeyleri CD24^{high} hücrelerde en yüksek bulunmuştur. Mdivi-1 ilave edildikten sonra TMZ ve kombine ilaç uygulanan U87 wt hücrelerinde ve CD24^{high} hücrelerinde PINK1 ifadesi istatistiksel anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Drp1'in inhibisyonu çeşitli kinazların aktif olduğu CD24^{high} hücrelerinde PINK1'in ifadenmesinde artışa neden olmuştur. Bu artış CD133^{high} hücrelerin de gözlenmemiştir. PARKIN ifadesinin Mdivi-1 tek başına ve kombine ilaç uygulandığında, her üç hücre serisinde ve en fazla da CD24^{high} hücrelerinde anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir.

GBM'deki terapötik hedeflerin belirlenmesi ve GBM tedavisinde yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için ek araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, kemodirencin gelişmesinde rol oynayan GKH'lerin onkojenik transformasyon ve tümörigenezi yönlendiren moleküler karakterlerinin anlaşılmasının GBM tedavisinin iyileştirilmesine önemli katkı sağlayacağı belirtilmektedir (Cheng ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasında, bulk tümör hücreleri ile iki farklı CD133 ve CD24 lentiviral olarak ayrı ayrı yüksek ifade eden GKH'lerinde DRP1 'i hedefleyen Mdivi-1'in tek başına veya TMZ ile kombine uygulanarak sinerjistik tedavi etkinliği **ilk kez araştırılmıştır.**

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Konvansiyonel terapötik olan TMZ oldukça toksik bir ajandır. Hastadaki sistemik toksisiteyi azaltan ve/veya etkinliğini artıran yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi çok önemlidir. GKH'lerinde mitokondriyal fisyonun önemi ve baskılanmasının hücre canlılığına, mitofajiye ve apoptozis üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, GBM'de kullanılan konvansiyonel kemoterapötik ajan olarak kullanılan TMZ ile birlikte Mdivi-1'in sinerjistik etkinliği ilk kez araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında, özellikle tümör başlatıcı özellikleri olan ve radyoterapi ve kemoterapiye direnç ve kötü prognoz ile ilişkili olan CD133 ve CD24 kanser kök hücre belirteçlerini yüksek ifade eden iki farklı U87 GBM hücrelerinin ile bulk tümör hücrelerinin TMZ'ye alternatif tedavi veya sinerjistik olarak Mdivi-1 kullanılmıştır.

- ✓ Bu çalışmada GBM tedavisinde etkili olabileceği düşünülen alternatif bir tedavi protokolü olarak mitokondriyal fisyon inhibitörü olan Mdivi-1'in tek başına veya TMZ ile kombine kullanılmasının etkinliği GKH düzeyinde in vitro araştırılmıştır.
- ✓ Mdivi-1 aracılı DRP-1 inhibisyonunun, wt U87 hücreleri ve U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinin canlılığına olan etkisi araştırılmış ve ayrıca bu hücrelerde Mdivi-1'in IC50 dozları belirlenmiştir.
- ✓ Mdivi-1 uygulanan bulk tümör hücreleri ile iki farklı GKH hücre serilerinin bu inhibisyondan doza ve zamana göre etkilendiği ve TMZ'den daha etkili bir şekilde canlılıklarında azalmaya neden olduğu **ilk kez** belirlenmiştir. Drp1 inhibitörüne en duyarlı hücrelerin ise U87 CD24^{high} ifade eden hücreler olduğu belirlenmiştir.

- ✓ Drp1 inhibitörü Mdivi-1 ve TMZ tek başına ve kombine 72 saat ve 50 uM ve olarak uygulanan U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde apoptotik ve otofajik genlerin ifadeleri eş zamanlı kantitatif PCR ile analiz edilmiştir.
- ✓ RT-PCR ile fisyon genleri transkript düzeyinde analiz edilmiş ve U87 CD24^{high} yüksek ifade eden GBM hücrelerinde, özellikle ilaç uygulanmadığında wt U87 ve U87 CD133^{high} hücrelerine kıyasla DRP-1 ekspresyonunun istatistiksel düzeyde anlamlı yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0,05)
- ✓ Fis1 ifadesi ise beklenen gibi ilaç uygulanmayan kontrol gruplarında yüksek iken Mdivi-1 verdikten sonra wt U87 ve U87 CD133^{high} hücrelerinde değişmemiş, özellikle U87 CD24^{high} GKH grubunda bir düşüş gözlenmiştir.
- ✓ Mdivi-1 uygulandıktan sonra apoptozis analizi için apoptotik genlerden pro-apoptotik Bax ve anti-apoptotik genlerden Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 oranları transkript düzeyinde değerlendirilmiştir. Bizim sonuçlarımızda, ilaç uygulanmayan gruplarda en yüksek Bcl-2 oranı sırasıyla CD24^{high}, CD133^{high} ve wtU87 hücrelerinde gözlenmiş ve Mdivi-1 uygulandıktan sonra U87 CD24^{high} GKH grubunda pro-apoptotik protein olan Bax ifadesinde bir artış ve Bcl-2 düzeyinde çok önemli bir azalma gözlenmiştir.
- ✓ Anti-apoptotik protein olan Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 ifadelerinde ise her üç hücre serisinde de Mdivi-1 sonrası ekspresyon seviyesi azalarak apoptozun teşvik edildiği gösterilmiştir.

- ✓ Ayrıca Mdivi-1 uygulanan hücrelerde bulk ve GKH hücrelerinde gözlenen hücre ölümünün apoptozisin uyarılması ile gerçekleştiği Bax/Bcl-2 oranlarından belirlenmiştir. Mdivi-1 uygulamasına cevaben her üç hücre serisinde TMZ'den daha etkin bir şekilde Bax/Bcl-2 oranının arttığı ve apoptozis uyarımının gerçekleştiği anlaşılmıştır.
- ✓ Bu çalışma kapsamında protein düzeyinde U87 wt, U87 CD133^{high} ile U87 CD24^{high} hücrelerinde Serin 616 (Drp1 p-ser616) ifadesine bakıldığı zaman özellikle U87 CD24^{high} KKH' lerinde kontrolde fisyon çok yüksek iken DRP1 inhibitörü Mdivi-1 uygulandığı zaman fisyonun ciddi oranda azaldığı gözlenmiştir. Mdivi-1'in protein düzeyinde aktive Drp'in baskılayıcı etkisini en fazla CD24^{high} hücreleri üzerinde gösterdiği belirlenmiştir.
- ✓ U87 wt ve en fazla da U87 CD24^{high} hücrelerinde Mdivi-1 uygulandıktan sonra baskılayıcı fosforilasyonun arttığı aktive edici fosforile Drp-1'in azaldığı western blotting ile gösterilmiştir. Ayrıca Mdivi-1'in tek başına ve TMZ kombine verildiği üç hücre serisinde de fisyonun baskılanmasının hücre ölümüne neden olduğu **ilk kez** gözlenmiştir.
- ✓ Mdivi1'in mitofaji üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla PINK1 ve PARKIN gen ifadeleri RT-PCR ile araştırılmıştır. İnhibitör uygulanmayan gruplarda, PINK1 ifadesi CD133 hücrelerinde en yüksek bulunurken, PARKIN düzeyleri CD24^{high} hücrelerde daha yüksek bulunmuştur. Mdivi1 uygulandıktan sonra yine bu hücrelerde PINK1 ifadesi istatistiksel oranda artmıştır.

Bu sonuçlar, fisyon ve mitofaji inhibisyonunun Glioblastoma'da TMZ'den bağımsız apoptozisi uyaran ve kanser kök hücrelerini de hedefleyebilen alternatif terapötik ajan olarak kullanılabileceği literatürde ilk kez gösterilmiştir.



ÖZET

Glioblastoma Multiform (GBM) Kanser Kök Hücrelerinde Mdivi-1 Aracılı DRP-1 İnhibisyonunun Mitokondriyal Fisyon ve Mitofajiye Etkisi

GBM’de, glioblastoma kök hücrelerinin (GKH) varlığının ilaç direncine ve tümörün nüksetmesine sebep olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar, farklı moleküler, genetik ve metabolik özellikleri bakımından GKH’lerin nöral kök hücrelerden (NKH) ve farklılaşmış GBM hücrelerinden farklı olduklarını göstermektedir. Dolayısıyla, GKH’leri hedef alan yeni terapötik stratejilerin geliştirilebilmesi için GKH’lerin kök hücre özelliklerinin devamlılığını sağlayan mekanizmaların tam olarak anlaşılması önem arz etmektedir.

Spesifik olarak GKH belirteçlerinden CD133 ve CD24 lentiviral olarak ayrı ayrı yüksek ifade eden GKH’lerde ilk kez fisyon rol oynayan Drp1’in Mdivi-1 aracılı farmakolojik inhibisyonunun fisyon ve mitofaji mekanizmaları üzerine olan etkilerinin araştırılması sonucu hipotezimizi destekleyecek önemli ve özgün sonuçlar elde edilmiştir.

GBM tedavisinde alternatif bir tedavi protokolü olarak mitokondriyal fisyon inhibitörünün tekli veya TMZ ile kombine kullanılmasının etkinliğinin GKH düzeyinde in vitro olarak ilk kez araştırılmıştır.

Bu tez kapsamında apoptoz ve mitofaji ilişkili genlerin mRNA düzeyinde ifadesine bakılmıştır. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile Fisyon için DRP-1, Fis1, Apoptozis için Bax, Bcl-2, Mcl-1, ve mitofaji belirteci olarak Pink1, Parkin genlerinin mRNA ifade analizleri yapılmıştır. Post-translasyonel düzeyde kontrol edilen Drp1’in aktive edici fosforilasyon ve inhibe edici fosforilasyon düzeyleri ise western blot analizi ile protein düzeyinde araştırılmıştır.

Mdivi-1 uygulanan bulk tümör hücreleri ile iki farklı GKH hücre serilerinin bu inhibisyondan doza ve zamana göre etkilendiği ve **TMZ’den daha etkili bir şekilde canlılıklarında azalmaya neden olduğu ilk kez** belirlenmiştir. Hücrelerde gözlenen bu ölümün apoptozis aracılı gerçekleştiği belirlenmiştir.

Mdivi-1 inhibitörünün Glioblastoma’da TMZ’den bağımsız apoptozisi uyaran ve kanser kök hücrelerini de hedefleyebilen alternatif terapötik ajan olarak kullanılabilceği **ilk kez** gösterilmiştir.

Drp1 ifadesinin ve fisyon mekanizmasının CD24^{high} hücrelerinde daha aktif olduğu ilk kez belirlenmiş ve Mdivi-1’in bu hücrelerde en etkili fisyon baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir.

Mdivi-1’in tek başına veya TMZ’in birlikte düşük dozlarda uygulanmasının bulk tümör hücreleri ve GKH’lerde hücre canlılığına ve apoptozis üzerine olan etkilerinin ilk kez bu tez çalışmasıyla belirlenmiş olması, GBM tedavisinde kullanılabilcek alternatif yaklaşımların üretilmesine katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: Glioblastoma Kök Hücre, CD133, CD24, Mitokondriyal Kalite Kontrol, Mitokondriyal Metabolizma

SUMMARY

Effect of mdivi-1 Mediated DRP-1 Inhibition on Mitochondrial Fission and Mitophagy in Glioblastoma Multiform (GBM) Cancer Stem Cells

It has been reported that the presence of glioblastoma stem cells (GSC) in GBM causes drug resistance and tumor recurrence. Studies show that SSCs differ from neural stem cells (NSC) and differentiated GBM cells in terms of their different molecular, genetic and metabolic properties. Therefore, it is important to fully understand the mechanisms that maintain the stem cell properties of SSCs in order to develop new therapeutic strategies targeting SSCs.

As a result of investigating the effects of Mdivi-1-mediated pharmacological inhibition of Drp1, which plays a role in fission, on fission and mitophagy mechanisms for the first time, important and original results have been obtained to support our hypothesis, specifically in SSCs that express CD133 and CD24 lentivirally, which are among the SSC markers.

The efficacy of mitochondrial fission inhibitor alone or in combination with TMZ as an alternative treatment protocol in the treatment of GBM was investigated for the first time in vitro at the GCC level.

Within the scope of this thesis, the expression of apoptosis and mitophagy-related genes at the mRNA level was examined. Simultaneous polymerase chain reaction and mRNA expression analyzes of DRP-1, Fis1, Bax, Bcl-2, Mcl-1 for apoptosis, and Pink1 as a mitophagy marker, Parkin genes for Fission were performed. . Activating phosphorylation and inhibitory phosphorylation levels of Drp1, which is controlled at the post-translational level, were investigated at protein level by western blot analysis.

It was determined for the first time that Mdivi-1 applied bulk tumor cells and two different GKH cell lines were affected by this inhibition according to dose and time and caused a decrease in their viability more effectively than TMZ. It was determined that this death observed in cells was mediated by apoptosis.

It has been shown for the first time that Mdivi-1 inhibitor can be used as an alternative therapeutic agent that stimulates TMZ-independent apoptosis in Glioblastoma and can also target cancer stem cells.

It was determined for the first time that Drp1 expression and fission mechanism were more active in CD24^{high} cells and Mdivi-1 was shown to cause the most effective fission suppression in these cells.

The fact that the effects of Mdivi-1 alone or in combination with TMZ at low doses on cell viability and apoptosis in bulk tumor cells and SSCs were determined for the first time in this thesis study will contribute to the production of alternative approaches that can be used in GBM treatment.

Keywords: Glioblastoma Stem Cell, CD133, CD24, Mitochondrial Quality Control, Mitochondrial Metabolism

KAYNAKLAR

- ASHRAFİ G, SCHWARZ TL. (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* Jan;**20**(1):31-42.
- AYOB AZ, RAMASAMY TS. (2018) Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci.*;**25**(1):20.
- BAO S, WU Q, MCLENDON RE, HAO Y, SHİ Q, HJELMELAND AB, DEWHIRST MW, BİGNER DD, RİCH JN. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* Dec 7;**444**(7120):756-60.
- BRESCİA P, RİCHİCHİ C, PELİCCİ G. (2012) Current strategies for identification of glioma stem cells: adequate or unsatisfactory?. *J Oncol.*;376894.
- BRETZ N, NOSKE A, KELLER S, ERBE-HOFMANN N, SCHLANGE T, SALNİKOV AV, MOLDENHAUER G, KRİSTİANSEN G, ALTEVOGT P. (2012) CD24 promotes tumor cell invasion by suppressing tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in a c-Src-dependent fashion. *Clin Exp Metastasis.* Jan;**29**(1):27-38.
- CASSİDY-STONE A, CHİPUK JE, INGERMAN E, SONG C, YOO C, KUWANA T, KURTH MJ, SHAW JT, HİNSHAW JE, GREEN DR, NUNNARİ J. (2008) Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell.* **14**:193–204.
- CHAN DC. (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**:79-99.
- CHANG CR, BLACKSTONE C. (2007) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem.* Jul 27;**282**(30):21583-7.
- CHEN J, Lİ Y, YU TS, MCKAY RM, BURNS DK, KERNİE SG, PARADA LF. (2012) A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature.* Aug 23;**488**(7412):522-6.
- CHENG WY, CHOW KC, CHİAO MT, YANG YC, SHEN CC. (2020) Higher Levels of Dynamin-related Protein 1 are Associated with Reduced Radiation Sensitivity of Glioblastoma Cells. *Curr Neurovasc Res.* **17**(4):446-463.
- COHEN MH, SHEN YL, KEEGAN P, PAZDUR R. (2009) FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist.*;**14**(11):1131-1138.

- COURTOIS S, DE LUXÁN-DELGADO B, PENÍN-PEYTA L, ROYO-GARCÍA A, PAREJO-ALONSO B, JAGUST P, ALCALÁ S, RUBÍOLO JA, SÁNCHEZ L, SAÍNZ B JR, HEESCHEN C, SANCHO P. (2021) Inhibition of Mitochondrial Dynamics Preferentially Targets Pancreatic Cancer Cells with Enhanced Tumorigenic and Invasive Potential. *Cancers (Basel)*. Feb **9**;13(4):698.
- DAVIS ME. (2018) Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin Oncol Nurs.*; **34**(5):420-429.
- DENG J, GAO G, WANG L, WANG T, YU J, ZHAO Z. (2012) CD24 expression as a marker for predicting clinical outcome in human gliomas. *J Biomed Biotechnol*. 2012:517172
- DETMER SA, CHAN DC. (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nov; **8**(11):870-9.
- ELGASS K, PAKAY J, RYAN MT, PALMER CS. (2013) Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta*. **1833**:150- 161.
- FERLAY J, PARKIN DM, STELIAROVA-FOUCHER E. (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in. *Eur J Cancer*. 2010; **46**(4):765-781.
- FRIEDMAN JR, LACKNER LL, WEST M, DIBENEDETTO JR, NUNNARI J, VOELTZ GK. (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. Oct 21; **334**(6054):358-62.
- GALLI R, BINDA E, ORFANELLI U, CIPELLETTI B, GRITTI A, DE VITIS S, FIOCCO R, FORONI C, DIMECO F, VESCOVI A. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. Oct 1; **64**(19):7011-21.
- GAVRILOVIĆ IT, POSNER JB. (2005) Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *J Neurooncol.*; **75**(1):5-14.
- GEISLER S, HOLMSTRÖM KM, SKUJAT D, FIESEL FC, ROTHFUSS OC, KAHLE PJ, SPRINGER W. (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol*. Feb; **12**(2):119-31.
- INGERMAN E, PERKINS EM, MARINO M, MEARS JA, MCCAFFERY JM, HINSHAW JE, NUNNARI J. (2005) Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol*. Sep 26; **170**(7):1021-7.
- JAGUST P, DE LUXÁN-DELGADO B, PAREJO-ALONSO B, SANCHO P. (2019) Metabolism-Based Therapeutic Strategies Targeting Cancer Stem Cells. *Front Pharmacol*. 10: **203**

- KASHATUS JA, NASCIMENTO A, MYERS LJ, SHER A, BYRNE FL, HOEHN KL, COUNTER CM, KASHATUS DF. (2015) Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell*. Feb 5;**57**(3):537-51.
- KING JL, BENHABBOUR SR. (2021) Glioblastoma Multiforme-A Look at the Past and a Glance at the Future. *Pharmaceutics*. Jul 9;**13**(7):1053.
- KONG B, TSUYOSHÍ H, ORÍSAKA M, SHIEH DB, YOSHIDA Y, TSANG BK. (2015) Mitochondrial dynamics regulating chemoresistance in gynecological cancers. *Ann N Y Acad Sci*. **1350**:1–16.
- KRISTIANSEN G, SAMMAR M, ALTEVOGT P. (2004) Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*. Mar;**35**(3):255-62
- KRISTIANSEN G, WİNZER KJ, MAYORDOMO E, BELLACH J, SCHLÜNS K, DENKERT C, DAHL E, PÍLARSKY C, ALTEVOGT P, GUSKÍ H, DÍETEL M. (2003) CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res*. Oct 15;**9**(13):4906-13.
- LANDRAY MJ, HAYNES R, HOPEWELL JC, PARISH S, AUNG T, TOMSON J, WALLENDZSUS K, CRAIG M, JIANG L, COLLINS R, ARMITAGE J. (2014) Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. *N Engl J Med*. Jul 17;**371**(3):203-12.
- LATHIA JD, MACK SC, MULKEARNS-HUBERT EE, VALENTIM CL, RICH JN. (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*;**29**(12):1203-
- LÍ Z. (2013) CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol*. **2**(1):17.
- LOUIS DN, OHGAKI H, WIESTLER OD, CAVENEE WK, BURGER PC, JOUVET A, SCHEITHAUER BW, KLEIHUES P. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. Aug;**114**(2):97-109.
- LYAKHOVICH A, LEONART ME. (2016) Bypassing Mechanisms of Mitochondria-Mediated Cancer Stem Cells Resistance to Chemo- and Radiotherapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:1716341
- MATSUDA N, SATO S, SHIBA K, OKATSU K, SAISHO K, GAUTIER CA, SOU YS, SAIKI S, KAWAJIRI S, SATO F, KIMURA M, KOMATSU M, HATTORI N, TANAKA K. (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol*. Apr 19;**189**(2):211-21.
- NARENDRA DP, JIN SM, TANAKA A, SUEN DF, GAUTIER CA, SHEN J, COOKSON MR, YOULE RJ. (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*. Jan 26;**8**(1):e1000298.

- O'BRIEN CA, POLLETT A, GALLINGER S, DICK JE. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. Jan 4;**445**(7123):106-10.
- OSTROM QT, GITTLEMAN H, FULOP J, LIU M, BLANDA R, KROMER C, WOLINSKY Y, KRUCHKO C, BARNHOLTZ-SLOAN JS. CBTRUS (2015) Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*. Oct;**17** Suppl 4(Suppl 4):iv1-iv62.
- PARK J, LEE SB, LEE S, KIM Y, SONG S, KIM S, BAE E, KIM J, SHONG M, KIM JM, CHUNG J. (2006) Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*. Jun 29;**441**(7097):1157-61
- PRAGER BC, BHARGAVA S, MAHADEV V, HUBERT CG, RICH JN. (2020) Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends Cancer*. Mar;**6**(3):223-235.
- ROSTOKER R, ABELSON S, GENKIN I, BEN-SHMUEL S, SACHIDANANDAM R, SCHEINMAN EJ, BITTON-WORMS K, ORR ZS, CASPI A, TZUKERMAN M, LEROITH D. (2015) CD24(+) cells fuel rapid tumor growth and display high metastatic capacity. *Breast Cancer Res*. Jun 4;**17**(1):78.
- SINGH SK, CLARKE ID, TERASAKI M, BONN VE, HAWKINS C, SQUIRE J, DIRKS PB. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. Sep 15;**63**(18):5821-8.
- SINGH SK, HAWKINS C, CLARKE ID, SQUIRE JA, BAYANI J, HIDE T, HENKELMAN RM, CUSIMANO MD, DIRKS PB. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. Nov 18;**432**(7015):396-401.
- SMITH AG, MACLEOD KF. (2019) Autophagy, cancer stem cells and drug resistance. *J Pathol*. Apr;**247**(5):708-718.
- STUPP R, MASON WP, VAN DEN BENT MJ, WELLER M, FISHER B, TAPHOORN MJ, BELANGER K, BRANDES AA, MAROSI C, BOGDAHN U, CURSCHMANN J, JANZER RC, LUDWIN SK, GORLIA T, ALLGEIER A, LACOMBE D, CAIRNCROSS JG, EISENHAEUER E, MIRIMANOFF RO; (2005) European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. Mar 10;**352**(10):987-96.
- SULTAN M, COYLE KM, VIDOVIC D, THOMAS ML, GUJAR S, MARCATO P. (2017) Hide-and-seek: the interplay between cancer stem cells and the immune system. *Carcinogenesis*. **38**(2):107-118.

- TAGUCHI N, ISHIHARA N, JOFUKU A, OKA T, MIHARA K. (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem.* Apr 13;**282**(15):11521-9.
- TROTTA AP, CHIPUK JE. (2017) Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology. *Cell Mol Life Sci.* Jun;**74**(11):1999-2017
- VANDER GRIEND DJ, KARTHAUS WL, DALRYMPLE S, MEEKER A, DEMARZO AM, ISAACS JT. (2008) The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. *Cancer Res.* Dec 1;**68**(23):9703-11.
- VIVES-BAUZA C, ZHOU C, HUANG Y, CUI M, DE VRIES RL, KIM J, MAY J, TOCILESCU MA, LIU W, KO HS, MAGRANÉ J, MOORE DJ, DAWSON VL, GRAÏLHE R, DAWSON TM, LI C, TIEU K, PRZEDBORSKI S. (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 5;**107**(1):378-83.
- WAI T, LANGER T. (2016) Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab.* Feb;**27**(2):105-117.
- WANG, W., WANG, X., PENG, L., DENG, Q., LIANG, Y., QING, H., JIANG, B. (2010). CD24-dependent MAPK pathway activation is required for colorectal cancer cell proliferation. *Cancer science*, 101(1), 112-119.
- WESTERMANN B. (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Dec;**11**(12):872-84.
- ZHAO J, ZHANG J, YU M, XIE Y, HUANG Y, WOLFF DW, ABEL PW, TU Y. (2013) Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene.* Oct;**32**(40):4814-24.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı	Elif
Soyadı	Dener

II- Eğitimi:

2013- **Yüksek Lisans** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD.

2013-2017 **Lisans** İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik