



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**GLİOMA HÜCRELERİNDE STRES PROTEİNLERİNİN
ANLATIMINDA HSF1'İN ROLÜ**

Elçin GÜNGÖR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR**

Aralık, 2018

İSTANBUL

Bu alışma, 25.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Cenk KIĞ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 26959 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tezime başlarken “Hayat siz planlar yaparken başınıza gelenlerdir.” cümlesini anlamamı sağlayan birçok an yaşadığım yüksek lisans sürecimde bana kattığı tecrübeler ve kazandırdığı insanlar için şükranlarımı sunmak isterim.

Öncelikle bilgisiyle yoluma ışık olan, çalışmaya başladığımız ilk günden itibaren güveni ve inancıyla beni cesaretlendiren, desteğini her zaman tüm samimiyetiyle hissettiğim çok sevgili danışmanım **Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR**’a; çalışmalarında sergilediği özverisi, pozitif enerjisi ve güleryüzüyle eğitim-öğretim hayatım boyunca örnek aldığım değerli hocam **Prof. Dr. Nazlı ARDA**’ya; tezimde yaşadığım tüm çıkmazlarımda her zaman yardımcı olacağını bilerek çekinmeden kapısını çaldığım sayın hocam **Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ**’e; yanımda fiilen olmasalar da desteklerini her zaman arkamda hissettiğim, benim için değerlerini ne olursa olsun kaybetmeyecek olan burada isimlerini yazamadığım tüm hocalarıma;

Yüksek lisans sürecimde zorluklar karşısında yılmadan yolumda devam etmemi ve deneylerimi başarılı bir şekilde yürütebilmemi mümkün kılan, dostluklarından her zaman büyük mutluluk duyduğum hocam **Arş. Gör. Elif MERTOĞLU** ve **Arş. Gör. Özlem KAPLAN**’a; çalışmalarım süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Proteomik grubu üyelerine ve tüm bölüm arkadaşlarıma;

Yüksek lisans tecrübemi mutlu bir şekilde geçirmem için bana her türlü imkanı yaratan, her zaman ve her koşulda hayatıma neşe katan motivasyon kaynaklarım **Tuğba DÜZAL**, **Berkay ÖZDEMİR** ve **Yağmur ARIKAN**’a;

Son ama en önemlisi bu tezi yapabilmem için birçok fedakarlıkta bulunan, şu an olduğum kişi olmamı sağlayan sevgili babam **Orhan GÜNGÖR**, annem **Nurten GÜNGÖR**, yakın zaman önce kaybettiğim anneannem **Nazmiye DÜZAL** ve başta halam **Sema İSTANBULLU** olmak üzere sevgili aileme en derinden teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2018

Elçin GÜNGÖR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. GLİOMA.....	6
2.1.1. Kökeni ve Gelişimi.....	6
2.1.1.1. Tarihsel Perspektif.....	6
2.1.1.2. Sınıflandırma ve Epidemiyoloji	7
2.1.1.3. Histopatoloji ve Moleküler Patogenez.....	10
2.1.2. Tanı ve Tedavi Standartları	13
2.1.2.1. Teşhis ve Görüntüleme	13
2.1.2.2. Güncel Tedavi Yöntemleri	15
2.2. STRES PROTEİNLERİ	17
2.3. ISI ŞOKU FAKTÖRÜ 1	23
2.4. STRES PROTEİNLERİNİN GLİOMALARLA İLİŞKİSİ	26
2.5. CRISPR/CAS9	27
2.5.1. Gen Düzenleme Mekanizmalarının Temeli.....	27
2.5.2. CRISPR/Cas9 Teknolojisi	29
2.5.3. İnsan Hastalıklarında CRISPR/Cas9 Çalışmaları.....	30
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	32
3.1. HÜCRELER VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	32
3.2. HÜCRELERİN ÇOĞALMA EĞRİSİNİN OLUŞTURULMASI	33
3.3. SİTOTOKSİK ANALİZLER.....	34
3.4. GENETİK SUSTURMA.....	35
3.5. HÜCRELERE KERSETİN UYGULANMASI	38

3.6. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	38
3.7. HÜCRELERİN TOPLANMASI.....	39
3.8. HÜCRE LİZATLARININ HAZIRLANMASI.....	39
3.9. PROTEİN KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ.....	39
3.10. DENATÜRE JEL ELEKTROFOREZİ.....	40
3.11. WESTERN BLOT ANALİZLERİ.....	43
3.12. İSTATİSTİK ANALİZLER.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. U87-MG İNSAN GLİOMA HÜCRELERİNE AİT BÜYÜME EĞRİSİ	46
4.2. SİTOTOKSİK ANALİZLER.....	47
4.2.1. Kersetinin U87-MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	47
4.2.2. CRISPR-Cas9 Uygulamasının U87-MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	48
4.3. HÜCRE LİZATLARININ PROTEİN KONSANTRASYONLARI	49
4.4. ELEKTROFORETİK VE İMMÜNOLOJİK ANALİZLER.....	50
4.4.1. HSF1'in İmmünolojik Analizi.....	52
4.4.2. Hsp27'nin İmmünolojik Analizi.....	52
4.4.3. pHsp27'nin İmmünolojik Analizi.....	53
4.4.4. Hsp70'in İmmünolojik Analizi.....	54
4.4.5. Hsp90'ın İmmünolojik Analizi.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR.....	62
EKLER	Error! Bookmark not defined.
ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Tiplerine göre primer beyin tümörleri (sol) ve subtiplerine göre gliomaların (sağ) dağılımı (Nilsson ve diğ., 2018).	9
Şekil 2.2: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (“International Agency for Research on Cancer”, IACR) ve WHO dataları kullanılarak oluşturulan insidans grafikleri.....	10
Şekil 2.3: Beyin anatomisini gösteren illüstrasyon.	11
Şekil 2.4: İnsan yüksek dereceli gliomalar için önerilen genetik değişiklikler, anormal sinyal yolları ve terapötik modülatörler (Masui ve diğ., 2012).	12
Şekil 2.5: (A) Kafatası kemik erozyonunu gösteren X-ray (B) iç tabaka erozyonunu ve dış tabakanın intraosseöz lezyondan incelmelerini gösteren CT (Kim ve diğ., 2015).	14
Şekil 2.6: Çözünürlüğü artırılmış görüntüleme teknolojileri (A) MRI, (B) Kontrastı artırılmış MRI, (C) 18F-Fluciclovine-PET.....	14
Şekil 2.7: HSP’lerin hücredeki genel şaperon işlevleri (Fung ve Kong, 2017).	17
Şekil 2.8: Isı şoku stresinin ökaryotik hücre organizasyonuna etkileri.....	18
Şekil 2.9: a) HSF aile üyelerinin yapısı (Takii ve Fujimoto, 2016) b) HSF1 proteininin 3-boyutlu şekli (Protein Data Bank).	24
Şekil 2.10: HSF1’in stres indüksiyonlu aktivasyonu (Vihervaara ve Sistonen, 2014).	25
Şekil 2.11: DSB onarımı için kullanılan hücresel tamir yollarının hedefli mutageniz için kullanımı (Maeder and Gersbach, 2016).	28
Şekil 2.12: Ökaryotik gen mühendisliği için tasarlanan Cas9-gRNA nükleaz kompleksi taslağı (https://www.biocat.com/genome-engineering).	30
Şekil 3.1: Başlangıç hücre sayıları 1×10^5 hücre/mL olan 2 günlük U87-MG hücrelerinin 10X merceğe sahip mikroskoptaki görüntüsü.	33
Şekil 4.1: U87-MG hücrelerine ait büyüme grafiği; hücrelerin ekimi 0.5×10^5 ve 1×10^5 hücre/mL olarak gerçekleştirilmiştir; grafik standart sapmaları içermektedir.	46
Şekil 4.2: Kersetinin U87-MG hücrelerinde gösterdiği sitotoksik etki ve IC_{50} değeri.	47
Şekil 4.3: Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kersetinin U87-MG hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi.	48

Şekil 4.4: Gerçekleştirilen CRISPR/Cas9 uygulamasının U87-MG hücrelerine sitotoksik etkisi.	49
Şekil 4.5: Sığır serum albümin (“Bovine Serum Albumin”, BSA) standartları ile çizilen standart grafik.	50
Şekil 4.6: Elektroforez işlemi sonrası Coomassie boya ile boyanmış SDS-poliakrilamid jel görüntüsü.	51
Şekil 4.7: Kontrol ve deney gruplarına ait HSF1 anlatımlarının Western blot analizi.	52
Şekil 4.8: Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp27 anlatımlarının Western blot analizi.	53
Şekil 4.9: Kontrol ve deney gruplarına ait pHsp27 anlatımlarının Western blot analizi.	54
Şekil 4.10: Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp70 anlatımlarının Western blot analizi.	54
Şekil 4.11: Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp90 anlatımlarının Western blot analizi.	55
Şekil 5.1: Kanser biyolojisine bağlı özelliklerin araştırılmasında CRISPR teknolojisinin kullanıldığı temel stratejiler (Moses ve diğ.,2018).	58

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: 2016 yılına ait gliomalarda WHO sınıflandırması (Reifenberger ve diğ., 2017).....	8
Tablo 2.2: HSP aile isimlendirmesi ve bulundukları lokasyonlar (Zorzi, 2011'den revize edilmiştir).	21
Tablo 3.1: Her bir kuyucuk için ekilen hücre miktarı ve kuyucuklardaki son besiyeri hacmi.	35
Tablo 3.2: “Tüp 1” karışımının içeriği.	36
Tablo 3.3: CRISPR/Cas9 ile HSF1 genini susturmak amacıyla tasarlanan sgRNA’lar.	37
Tablo 3.4: “Tüp 2 karışımının içeriği.	37
Tablo 3.5: Çalışmalarda oluşturulan deney grupları ve bu gruplara ait açıklamalar.....	38
Tablo 3.6: SDS-PAGE işlemlerinde kullanılan çözeltiler.	41
Tablo 3.7: SDS-PAGE için kullanılan ayırma ve yükleme jellerinin 1 jele göre içerikleri ve oranları.	42
Tablo 3.8: Western Blotting ve Stripping işlemleri için kullanılan çözeltiler.	43
Tablo 3.9: İmmünojenik analizlerde kullanılan antikorlar ve özellikleri.	45
Tablo 4.1: Hücrel ekstrele ait örnek protein konsantrasyonları.	50

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
L	: Litre
µM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
cm ²	: Santimetrekaare
g	: Gram
°C	: Santigrat Derece
v	: Hacim (“Volume”)
V	: Volt
w	: Ağırlık (“Weight”)

Kısaltmalar	Açıklama
BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Bovin Serum Albumin
Cas9	: CRISPR İlişkili Protein 9 (“CRISPR Associated Protein 9”)
CRISPR	: Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”)
crRNA	: CRISPR RNA
CSC	: Kanser Kök Hücresi (“Cancer Stem Cell”)
CT	: Bilgisayarlı Tomografi (“Computerized Tomography”)
DBD	: DNA Bağlama Domeni (“DNA Binding Domain”)
DMEM	: “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DSB	: Çift Zincir Kırığı (“Double Strand Break”)

EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FBS	: Fetal Bovin Serum
GBM	: Glioblastoma Multiforme
HDR	: Homoloji Yönlendirmeli Tamir (“Homology-Directed Repair”)
HSE	: Isı Şoku Elementi (“Heat Shock Element”)
HSF1	: Isı Şoku Faktörü 1 (“Heat Shock Factor 1”)
HSP	: Isı Şoku Proteini (“Heat Shock Protein”)
HSR	: Isı Şoku Yanıtı (“Heat Shock Response”)
HUGO	: İnsan Genom Organizasyonu (“Human Genome Organisation”)
IACR	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (“International Agency for Research on Cancer”)
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme (“Magnetic Resonance Imaging”)
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)
NEAA	: Esansiyel olmayan amino asitler (“Non-Essential Amino Acids”)
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleşmesi (“Non-Homologous End-Joining”)
PAM	: Protospacer İlişkili Motif (“Protospacer-Adjacent Motif”)
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
PVDF	: Polivinilidin diflorür
RNAi	: RNA interferans
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (“Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)
sgRNA	: Tekli rehber RNA (“single guide RNA”)
TALEN	: Transkripsiyon Aktivatörü Benzeri Efektör Nükleaz (“Transcription Activator-Like Effector Nuclease”)
TMZ	: Temozolomid
tracrRNA	: Trans aktive-edici crRNA
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (“World Health Organization”)
ZFN	: Çinko Parmak Nükleaz (“Zinc Finger Nuclease”)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLİOMA HÜCRELERİNDE STRES PROTEİNLERİNİN ANLATIMINDA HSF1'İN ROLÜ

Elçin GÜNGÖR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR

Primer malignant beyin tümörlerinin insidansı, değişen yaşam şartları ile birlikte son 30 yılda hızla yükselmiştir. Bu tümörler arasında gliomalar, en yaygın görülen ve en kötü huylu tümör tipi olarak kabul edilmektedir. Glial tümörlerin en yüksek prevalansa sahip biçimi olan yüksek-dereceli glioblastoma multiforme (GBM) için prognoz oldukça zayıftır. Cerrahi tekniklerin gelişmesi ve standart olarak radyoterapiyle birlikte uygulanan temozolomid tedavisine rağmen, sağkalım ortalama 15-16 ayla sınırlı kalmaktadır. Merkezi sinir sisteminde gerçekleşen normal gelişim yollarının ve gliomagenезin anlaşılması, bu tümörlerin biyolojisinin daha iyi kavranılmasına ve gliomalı hastalar için daha etkili tedavi yöntemlerinin ortaya konulmasına yardımcı olacaktır.

Isı Şoku Proteinleri ("Heat Shock Proteins", HSPs) veya stres proteinleri olarak bilinen büyük bir moleküler şaperon ailesinin, gliomalarda yüksek oranda eksprese edildiği bilinmektedir. HSP'lerin artmış ekspresyonu ile glial tümörlerin invaziv kapasitesi arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. HSP'lerin aşırı ekspresyonu, gliomada mutasyonel değişikliklere yol açmakta ve sonuçta hücreleri malignite ve invazyona yönlendirmektedir. Glioma hücrelerine sitoproteksiyon sağlayan HSP'lerin aşırı ekspresyonu, aynı zamanda radyo- ve kemo-dirence de katkıda bulunmaktadır. HSP'lerin hem normal hem de stresli hücrelerdeki rolü, doğru ekspresyon paterninin üretilmesini sağlayan kompleks regülatör süreçlerin varlığını gerektirmektedir. HSP'lerin indüksiyonu, transkripsiyon faktörleri ailesinin belirli üyelerinin aktivasyonuna bağlıdır.

Memeli hücrelerinde bu regülasyonun temel mekanizması Isı Şoku Faktörü 1 (“Heat Shock Factor 1”, HSF1) olarak adlandırılan bir protein ve bu proteinin gerçekleştirdiği interaksionlara bağlıdır. Birçok çalışmada post-translasyonel modifikasyonlarla gerçekleştirilen değişimler, proteazomal degradasyon, küçük moleküllu inhibitörlerin kullanımı ve gen düzenleme mekanizmaları gibi çeşitli etmenlerle HSF1’in “down-regülasyonu” amaçlanmaktadır. Çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan doğal bir flavonoid olan kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon), bir HSF1 inhibitörüdür ve tümör hücrelerinin apoptozunu kolaylaştırdığı bilinmektedir. Bununla birlikte HSF1’in gen düzeyinde susturumunun (“knock-out”) etkili bir mekanizma olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada glioma hücrelerinde CRISPR/Cas9 yöntemi ile HSF1 genini en yüksek verimde susturmak ana hedef olarak belirlenmiştir. Çalışmanın amacına bağlı olarak U87-MG insan glioma hücrelerinde hem kersetin uygulaması hem de CRISPR/Cas9 aracılı HSF1 susturumu gerçekleştirilmiş ve çeşitli stres proteinlerinin anlatımları Western Blot tekniğiyle incelenmiştir. HSF1 inhibisyonu amacıyla uygulanan 2, 10 ve 30 µM kersetin konsantrasyonlarından 10 ve 30 µM kersetin dozları için HSF1 anlatımında anlamlı bir azalma saptanmıştır. Yine aynı amaçla gerçekleştirilen CRISPR/Cas9 uygulamasında kullanılan iki farklı sgRNA için de HSF1 anlatımının %50’nin üzerinde azaldığı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen her iki uygulama karşılaştırıldığında, anlamlı değişime sebep olan dozlarda kersetin uygulamasının hücre canlılığı üzerinde gösterdiği yüksek toksisite sebebiyle, CRISPR/Cas9 uygulamasına göre dezavantaja sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanısıra CRISPR/Cas9’un hem düşük sitotoksitesi hem de sergilediği yüksek verimle HSF1 susturumunda etkili bir yol olabileceği ortaya konulmuştur. Kersetin uygulaması yapılmış gruplarda ve CRISPR/Cas9 ile HSF1 susturumu gerçekleştirilmiş gruplarda Hsp27, Hsp70, Hsp90 ve pHsp27 proteinlerinin anlatım seviyelerindeki değişimleri belirlemek üzere yapılan analizlerde alınan sonuçlar her iki uygulamanın da bu proteinlerin anlatım seviyeleri üzerinde farklı etkileri olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak HSF1 glioma hücrelerinde stres proteinlerinin anlatımını tek başına regüle eden bir faktör değildir. Yapılacak ileri çalışmalarla HSP’lerin kanser hücrelerindeki yüksek anlatımına sebep olan yollar tam olarak aydınlatıldıktan sonra, bu proteinlerin hücrelere sağladığı avantajların tamamen ortadan kaldırılması mümkün olabilecektir.

Aralık 2018, 90 sayfa.

Anahtar kelimeler: Glioma, ısı şoku proteinleri, CRISPR/Cas9, HSF1.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE ROLE OF HSF1 ON STRESS PROTEINS EXPRESSIONS IN GLIOMA CELLS

Elçin GÜNGÖR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR

The incidence of primary malignant brain tumors has increased rapidly over the last 30 years, with changing living conditions. Among these tumors, gliomas are considered the most common and most malignant tumor type. The prognosis for high-grade glioblastoma multiforme (GBM), the most common form of glial tumors, is very poor. Despite the development of surgical techniques and temozolomide treatment along with radiotherapy as a standard therapy, survival is limited to an average of 15-16 months. Comprehension the normal developmental pathways and gliomagenesis in the central nervous system will help to better understanding the biology of these tumors and to provide more effective treatment methods for patients with glioma.

A large molecular chaperone family, known as Heat Shock Proteins (HSPs) or stress proteins, is highly expressed in gliomas. There is a positive correlation between the increased expression of HSPs and the invasive capacity of glial tumors. Overexpression of HSPs leads to mutational changes in glioma and ultimately drives the cells to malignancy and invasion. Overexpression of HSPs that provide cytoprotection to glioma cells also contributes to radio- and chemo-resistance. The role of HSPs in both normal and stressed cells requires the existence of complex regulator processes that allow the production of the correct expression pattern. The induction of HSPs depends on the activation of certain members of the transcription factors family.

The main mechanism of this regulation in mammalian cells depends on a protein called Heat Shock Factor 1 (HSF1) and its interactions. In several studies, down-regulation of HSF1 is aimed by various factors such as changes in post-translational modifications, proteasomal degradation, use of small molecule inhibitors and mechanisms of gene regulation. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone), a natural flavonoid found in various fruits and vegetables, is an HSF1 inhibitor and has been reported to facilitate apoptosis of tumor cells. In addition, it is thought that knock-out of HSF1 at gene level may use as an effective mechanism.

In this study, knock-out of the HSF1 gene with the highest yield by the CRISPR/Cas9 method in glioma cells was determined as the main target. Depending on the purpose of the study, both quercetin application and CRISPR / Cas9 mediated HSF1 knock-out were performed in U87-MG human glioma cells and expression of various stress proteins was examined by Western Blot technique. As a result of 2, 10 and 30 μ M quercetin applications performed for the purpose of HSF1 knock-out, a significant reduction in HSF1 expression was detected for 10 and 30 μ M concentrations. For two different sgRNAs used in CRISPR / Cas9 application for the same purpose, HSF1 expression was found to be decreased by more than 50%. When both applications were compared, it was determined that the application of quercetin in doses causing significant changes had a disadvantage over CRISPR / Cas9 application due to the high toxicity on cell viability. In addition, CRISPR / Cas9 has been shown to be an effective pathway in HSF1 knock-out with low cytotoxicity and high efficiency. The results of the analyzes performed to determine the changes in the expression levels of Hsp27, Hsp70, Hsp90, pHsp27 proteins in the groups with applied quercetin and CRISPR / Cas9, showed that both applications have different effects on the expression levels of these proteins. In conclusion, HSF1 is not an unattended factor that regulates the expression of stress proteins in glioma cells. It will be possible to prevent the advantages of HSPs to cancer cells after fully understanding of the pathways that cause high expressions of these proteins in cancer cells with further studies.

December 2018, 90 pages.

Keywords: Glioma, heat shock proteins, CRISPR/Cas9, HSF1.

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmeye başlaması ve metastazla perifere yayılması sonucu ulaştığı doku ve organlarda işlevsel bozukluklara yol açan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Karsinogenez, hücrelerin genomunda gerçekleşen kanser patogenezini ve gelişimini hızlandıran çoklu genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesi ile karakterize edilmektedir. Bu değişiklikler arasında onkogenlerin aktivasyonu (örn; ErbB, RAS), tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu (örn; “tümör protein 53, p53”; “fosfataz ve tensin homolog, PTEN”), epigenetik faktörlerin kontrol lokuslarında (örn; “DNA metiltransferaz 1, DNMT1”) ve kemorezistans sağlayan genlerde gerçekleşen mutasyonlar (örn; “çoklu ilaç direnci 1, MDR1”) bulunmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser, günümüzde toplumun her kesiminden bireyini tehdit edebilecek ve genel biyolojik konseptlere uymayan sorunlarla karşı karşıya kalınmasına sebep olabilecek bir olgu olarak varlığını sürdürmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (“World Health Organization”, WHO)’nün yayınladığı Kanser Raporuna göre 2018 yılında dünyada 9,6 milyon kişi kanserden dolayı hayatını kaybetmiştir. Kanser vakalarının ve nüfus artışının benzer eğilimler göstermesi halinde, 2040 yılına kadar dünya çapında her yıl 27,5 milyon yeni kanser vakasının görüleceği tahmin edilmektedir (Bray, 2018). Bu yükselişi önlemek adına yapılan araştırmalar, moleküler mekanizmaları aydınlatarak, tanı ve tedavide yeni gelişmeleri gündeme getirmektedir.

Gliomalar, nöroglial kök veya progenitör hücrelerden türevlendiği düşünülen primer beyin tümörleridir. Histolojik görünümüne göre, geleneksel olarak astrositik, oligodendrogial veya ependimal tümörler olarak sınıflandırılırlar (Weller ve diğ., 2015). En yaygın ve agresif glioma türü olan glioblastoma multiforme (GBM), hem intra- hem de inter-tümör heterojenite sergileyerek olası tümör rekürrensine ve tedaviye dirence yatkındır. GBM için hayatta kalma süresi kemoterapi ve radyasyon tedavisi alan kişilerde ortalama 15-16 aydır. Gliomaların büyük ölçekli genomik ve proteomik analizi, yüksek mortaliteye sahip bu hastalığın tanı ve tedavisi için potansiyel hedefleri ortaya çıkarmaktadır (Shergalis ve diğ., 2018). Hedeflerden biri olan, ısı şoku yanıtına (“Heat Shock Response”, HSR) dayalı mekanizmalar araştırmacılar tarafından dikkatleri üzerine çekmeye başlamıştır. Çoklu stres faktörlerine tepki olarak belirli proteinlerin ekspresyonlarının transkripsiyon seviyesinde düzenlenmesiyle hızlı bir şekilde gerçekleşen indüksiyonu, ısı şoku yanıtı olarak adlandırılmaktadır (Shamovsky ve Nudler, 2008).

Hücreler hipertermi, iske mi, anoksi, ultraviyole ışık, toksinler, viral partiküller, cerrahi/duygusal/me kanik veya diğ er stres türleri gibi fizyolojik ve çevresel koşullara maruz kaldığında, bir doğal savunma cevabı oluşturmak üzere "ısı şoku proteinleri" (Heat Shock Proteins", HSPs) olarak bilinen protein ailesi üyelerinin sentezini önemli ölçüde artırmaktadır. Bu stres proteinlerinin anlatımındaki artış, hücrelerin letal olabilecek durumlara dayanıklılık kazanmasına neden olmaktadır. HSP'ler, tüm organizmalarda ve farklı subsellüler yapılarda anlatımı yapılmakla birlikte evrimsel olarak korunmuş yapılardır. Ökaryotik hücrelerde çok sayıda role sahip olan HSP'lerin birincil işlevi, moleküler şaperonlar olarak hizmet vermektir (Chatterjee ve Burns, 2017). "Client" proteinlerin doğru şekilde katlanmalarının sağlanması sonucu doğal yapılarını ve fonksiyonlarını sürdürmelerine, HSP'lerin şaperon işlevi aracılık etmektedir. Ek olarak, HSP'ler yeni proteinlerin doğru şekilde katlanması; protein sekresyonu, taşınımı, translokasyonu, degradasyonu; transkripsiyon faktörlerinin regülasyonu ve özellikle yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanması gibi çeşitli önemli hücresel süreçlerde yer almaktadır. Memeli hücrelerine ait HSP'ler moleküler boyutlarına bağlı olarak altı temel gruba ayrılmıştır: HSP100 ailesi, HSP90 ailesi, HSP70 ailesi, şaperonlar olarak da adlandırılan HSP60 ailesi, HSP40 ailesi ve Hsp27 proteinini içeren küçük HSP'ler ("small HSPs", sHSPs) (Wang ve diğ., 2004; Meher ve diğ., 2018).

HSP'lerin kanser, nörodejeneratif bozukluklar (Alzheimer, multipl skleroz) ve bulaşıcı hastalıklar (HIV, periodontal hastalıklar) dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklarda önemli rollere sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde HSP'lerin, hızlı hücre bölünmesini ve metastazı kolaylaştırdığı, hücrelerin anti-neoplastik ilaçlar tarafından indüklenen apoptozdan kaçmasına olanak sağladığı gözlenmiştir. Özellikle son zamanlarda çokça çalışılan Hsp27, Hsp70 ve Hsp90 gibi moleküler şaperonlar, çoğu durumda kötü prognoz gösteren bir dizi kanser türünde yüksek ekspresyona sahiptir. Bu nedenle HSP'ler, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde temel aktörler olarak görülmekte ve tedavide kullanılan başlıca hedefler arasında olduğu kabul edilmektedir (Sherman ve Multhoff, 2007). Bu noktada önem teşkil eden bir bulgu da ısı şoku transkripsiyon faktörü 1 ("Heat Shock Factor 1", HSF1) olarak tanımlanan regülatör bir proteinin stres sırasında hücrede artmış aktivasyonu sonucu, birçok kanser türünde HSP'lerin regülasyonunu indüklemesidir. HSP'lerin bu "up-regülasyonu" ilaç direncine teşvik, apoptozun inhibisyonu, artmış migrasyon ve metastaz, daha agresif tümör davranışı ve kötü hasta prognozu ile ilişkili bulunmuştur (Khalil ve diğ., 2011).

HSF'nin, ısı şoku genlerinin promotör bölgesinde bulunan ısı şoku elementine ("Heat Shock Element", HSE) bağlanarak bu genlerin transkripsiyonlarını başlattığı bilinmektedir (Amin ve diğ., 1988). Maya hücrelerinde HSF, DNA'ya sürekli bağlı olarak bulunmakta ve ısı şokundan sonra fosforillenmektedir. Drosophila ve omurgalılarda yapılan çalışmalar ise HSF'nin inaktif monomerler şeklinde bulunduğunu, ısı şokundan sonra trimer formlar oluşturarak DNA'ya bağlandığını göstermiştir (Sorger ve diğ., 1987). Buna ek olarak insanda bulunan HSF'nin ısı şokuyla fosforillendiği de çalışmalarda ortaya konulmuştur (Jurivich ve diğ., 1994). Tüm bu bilgiler ışığında stres koşuluna maruz bırakılmış hücrelerde HSE'ye bağlanarak HSP'lerin aktivitesini regüle eden temel bileşenin HSF1 olduğu görüşü benimsenmiştir.

Melanom, akciğer, pankreatik, prostat, kolon, meme ve servikal kanserlerde nükleer HSF1'in yüksek düzeyde anlatıma sahip olduğu görülmüştür (Santagata ve diğ., 2011; Mendillo ve diğ., 2012). Ayrıca HSF1 ekspresyonunun, endometrial kanserde metastaz ve düşük sağkalım oranı (Engerud ve diğ., 2014); oral skuamöz hücreli karsinomda tümör boyutu ile de ilişkili olduğu belirlenmiştir (Ishiwata ve diğ., 2012). Bu bulgular HSF1'in aktivasyonunun/ekspresyon düzeyindeki artışın çok çeşitli kanser türleri için değerli bir prognostik belirteç olarak kullanılabileceği fikrini doğurmuştur. HSF1, birçok kanser için HSP'lerin indüksiyonunda önemli bir regülatör olmasından dolayı antikanser terapilerde potansiyel bir hedef olarak düşünülmektedir. Ek olarak, HSF1'in kanser kök hücresi ("Cancer Stem Cell", CSC) benzeri fenotipte yer aldığını gösteren kanıtlar artmaktadır. Wang ve arkadaşları HSF1 anlatımında "knock-out" gerçekleştirilmesi sonucu, HSF70 ve HSP90 anlatımlarında değişiklik gerçekleştirilmeden, meme kanseri hücre hatlarında CSC benzeri fenotipin inhibe edildiğini ve HSF1'in, HSP olmayan genleri hedefleyerek CSC benzeri fenotipi düzenleyebildiğini göstermiştir (Wang ve diğ., 2015). Tüm bu bulgular sonucunda HSF1, sadece HSP indüksiyonunun transkripsiyon seviyesinde bir ana düzenleyicisi olarak değil, aynı zamanda onkogenik uyarılara yanıt olarak hücrel proliferasyon ve sağkalımı artıran güçlü bir karsinogenez düzenleyicisi olarak da işlev göstermesiyle kanser çalışmalarında umut vadetmektedir.

Günümüzde birçok farklı stres koşulunun ve kimyasal ajanın Hsp aktivitesini değiştirebildiği bilinmektedir (Ahmed ve diğ., 2012). Bununla birlikte, genel olarak stres varlığının bulunmadığı koşullar altında Hsp gen ekspresyonunda değişikliğe neden olan uyarıcılar hakkında yeterli bilgi yoktur ve bu stimülatörlerin etki mekanizmaları açık değildir.

Bu ajanlardan biri olan kersetin, stres yanıtını inhibe eden ve çoğunlukla bitkilerden elde edilen flavonoid bir bileşiktir. 1995 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada HSF1 regülasyonunda kersetin molekülünün kullanılabileceğine dair bulgular elde edilmiştir. Kersetin HSF'nin DNA hedefine bağlanmasını inhibe ederek, ısı şoku yanıtına bağlı olarak gerçekleşen Hsp transkripsiyonunu engellemektedir. Bu mekanizmada HSF1'de gerçekleşen değişikliğin oligomerik yapısından ziyade fosforilasyonu ile ilgili olduğu belirlenmiştir. Kersetinin hücrede bulunan HSF1 miktarında inhibisyona neden olduğu bilinmektedir (Nagai ve diğ., 1995). HSF1 üzerindeki etkilerine benzer olarak, kersetin insan meme karsinoma hücrelerindeki p53 seviyesinde translasyonel olarak “down-regülasyona” sebep olmaktadır (Avila ve diğ., 1994).

Kalıtsal hastalıkların genetik temelini anlaşılmaya, genetik bozukluklarda kusurlu DNA'nın ortadan kaldırılması ya da “ekzojen” DNA'yla yer değiştirilmesi gibi gen terapi konseptleri popüler hale gelmiştir. Son yıllarda, kanser hücrelerinin genomunda yer alan belirli bir geni spesifik bir şekilde hedefleyebilen, “knock-in” ve “knock-out” mekanizmalarına dayanan genom mühendisliği teknikleri aracılığıyla birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu terapötik hedeflenmiş gen stratejileri, kanserle ilişkili moleküler hedeflerin uzun süreli aktivasyonuna veya baskılanmasına yol açmakta ve hastaların sayısız tedavi döngüsünden kurtulmalarını amaçlamaktadır. İdeal olarak, bu tür antikanser tedavilerin, hedef dışı toksisite göstermemesi ve genetik değişiklikleri spesifik olarak gerçekleştirmesi beklenmektedir (Yi ve Li, 2016). Bunun dışında gen düzenleme yöntemleri kullanılarak genetik hastalıklarda endojen epitop etiketleme gibi tanıya yardımcı çalışmalar da gerçekleştirilmektedir (Dalvai ve diğ., 2015).

Çinko parmak nükleazları (“Zinc Finger Nucleases”, ZFNs) ve transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (“Transcription Activator-Like Effector Nucleases”, TALENs) gibi geleneksel nükleaz bazlı gen hedefleme teknolojileri, hücreler veya hayvan kanser modelleri üretmek için birçok araştırmada kullanılmıştır. Bununla birlikte bu nükleazların kullanımı, karmaşık yapıları ve uzun süren deneysel tasarım aşamaları nedeniyle sınırlı olarak kalmıştır. Daha sonra geliştirilen RNA interferansı (RNAi), gen ekspresyon mühendisliği için uygun bir yaklaşım olarak kanser araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, RNAi'nin “knock-down” etkisi geçici olarak görülmekte ve kabul edilebilir bir seviyede gen sessizleşmesine ulaşılabilmesi için tekrar tekrar sisteme verilmesi gerekmektedir (Agrawal ve diğ., 2003). Ayrıca, RNAi genellikle spesifiklik açısından öngörülemez hedef dışı (“off-target”) bazı etkiler gösterebilmektedir (Jackson ve Linsley, 2010).

Yakın zamanda, CRISPR/Cas9 sistemi olarak adlandırılan RNA kılavuzluğunda gerçekleşen endonükleaz temelli yeni bir genom düzenleme tekniği geliştirilmiştir. Bu sistem tekli rehber RNA ("single-guide", sgRNA) aracılığıyla Cas9 endonükleazının, DNA çift-kırıkları (DSB'ler) oluşturmasını sağlamaktadır. Oluşan DSB'ler DNA onarım mekanizmalarını aktive ederek, spesifik bir bölgede istenilen değişikliklerin yapılmasını mümkün kılmaktadır. CRISPR/Cas9, genlerde knockout, eksojen DNA knock-in ve nokta mutasyonu gibi özel modifikasyonlara sahip hücre hatları oluşturmak için kullanılmaktadır. Memeli hücrelerinde ve hayvanlarda uygulanabilirliğine yönelik gerçekleştirilen başarılı çalışmalar sonucunda CRISPR/Cas9 sistemi, kanser modelleme ve tedavi araştırmaları için kolay ve çok yönlü bir platform olarak kullanılmaya başlanmıştır (Sánchez-Rivera ve Jacks, 2015).

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında HSF1 regülasyonu üzerinde etkinliği bilinen bir ajan olan kersetinin ve gen düzenleme teknolojileri arasında en güncel yöntem olarak dikkatleri üzerine çeken CRISPR/Cas9 sisteminin U87-MG insan glioma hücrelerine uygulanması sonucunda çeşitli Hsp anlatımları üzerinde gösterdikleri etkiler araştırılmıştır. Bu bağlamda kersetin ve CRISPR/Cas9 aracılı HSF1 susturumu gerçekleştirilerek, uygulamaların etkinlikleri değerlendirilmiştir. Tezin temel amacı HSF1'in regülasyonunu en yüksek verim ve en az sitotoksik etkiyle inhibe ederek, ısı şoku yanıtı üzerinde oluşturduğu alterasyonları ve bu yanıtaki rolünü glioma hücreleri üzerinde ortaya koymaktır.

Çalışma sonucunda alınan veriler, tümöral etkinlik gösteren herhangi bir stres koşulu uygulanmamış hücrelerde HSF1 "down-regülasyonu" ile stres proteinlerinin transkripsiyonlarının azalma gösterdiği, ancak belirli bir düzeyde devam ettiğini göstermektedir. Böylece bu proteinlerin regülasyonlarını düzenleyen HSF1'den bağımsız, farklı mekanizmaların veya yolların olduğu fikri ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda gerçekleştirilecek çalışmalarla stres proteinlerinin regülasyonunda rol oynayan faktörlerin saptanması ve kanser hücrelerinde sebep olduğu değişimlerin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. GLİOMA

Beyin tümörleri, lokalizasyonları ve hızlı invazyon yetenekleri nedeniyle yüksek morbidite ve mortalite ile karakterize olan tümör gruplarıdır. Bu tümör grupları içinde yer alan gliomalar, en basit tanımıyla nöroglial kök hücrelerden veya progenitör hücrelerden türevlendiği düşünülen glial tümörlerdir (Weller ve diğ., 2015) ve primer beyin tümörlerinin en yaygın görülen grubunu oluşturmaktadır (Kleihues, 2000). En sık görülen yetişkin gliomu, primer beyin tümörlerinin %15'ini ve tüm gliomaların %55'ini oluşturan glioblastoma multiformedir (GBM, WHO grade IV astrositom). GBM insidansı 5 yıllık sağkalım oranı <%5 olan hastalar için 3.19/100.000'dir. GBM, astrositik soyunun en agresif diffüz tümörü olup, tüm tedavilere rağmen 12-15 ay arasında değişen medyan sağkalıma sahiptir (Vigneswaran ve diğ., 2015). Hücre canlılığı, proliferasyonu, tümör migrasyonu ve anjiyogeneze rol oynayan çeşitli anahtar hücresel yollarda meydana gelen mutasyonları ve değişiklikleri içeren çok karmaşık bir patogeneze sahip olmasından dolayı, gliomaların anlaşılmasına yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi her geçen gün önem kazanmaktadır (Pearson ve Regad, 2017).

2.1.1. Kökeni ve Gelişimi

2.1.1.1. Tarihsel Perspektif

Nöroşirürji tarihinin başlangıcı kabul edilen trepanasyon işlemi, kafatası kemiğinin bir kısmının kan damarları, meninksler ve beyin gibi yumuşak dokulara zarar verilmeden çıkarılıp alınması olarak tanımlanan antik bir cerrahi müdahale şeklidir. Trepanasyon işlemine ait kanıtlar Anadolu dahil dünyanın birçok noktasından elde edilmiş olup, Mezolitik döneme kadar tarihlenmekle birlikte, bu prosedürün ilk tıbbi açıklaması Hipokrat (MÖ 460–355) tarafından belgelenmiştir (Tsermoulas ve diğ., 2014; Moghaddam ve diğ., 2015). Kafa travmaları, omurga kırıkları, hidrosefali, fonksiyonel cerrahi gibi nöroşirürjik patolojiyle ilgili çok sayıda konuyu ele alan ve El-Zehravi (936-1013) tarafından kaleme alınan Kitab al-Tasrif isimli eserde beyin tümörlerinin trepanasyonla çıkarılmasına yönelik teknik anlatımlara rastlanmaktadır (Ghannaei Arani, 2012). Primer beyin tümörünün ilk kontrollü rezeksiyonu ise 1884 tarihinde Rickman Godlee tarafından gerçekleştirilerek glioma cerrahisinde önemli bir adım atılmıştır (Kirkpatrick, 1984).

Bilimsel yöntemlerin kabulü, klinik çalışmalardaki ilerlemeler ve ışık mikroskobu gibi ekipmanların geliştirilmesi sonucu insan hastalıklarını incelemek için yeni fırsatlar yaratılmasıyla tıp alanında çığır açıcı adımlar atılmaya başlanmıştır. Makroskopik araştırma dönemlerinde gliomalar normal beyin dokularına benzerlikleriyle İngilizler tarafından “medullary sarcoma”, Fransızlar tarafından “encéphaloïde” ve Almanlar tarafından “fungus medullare” olarak adlandırılmıştır (Scherer, 1940a). 1800’lü yılların ortalarında ilk kez Rudolf Virchow, Theodor Schwann ve Robert Remak gibi önde gelen nörobilimciler tarafından glial hücreler tanımlanmıştır (Ndubaku ve De Bellard, 2008). “Glial hücre” ifadesi İngilizce’de “tutkal” anlamına gelen eski Yunanca “glía” kelimesinden türetilmiştir. Patolojik olarak glioma teriminin ortaya çıkışı ise nörogliaların keşfinin ardından gerçekleşmiş ve neoplazmaların mikroskopik araştırmalarına yönelik dönemin başlamasına öncü olmuştur. Ayrıca Virchow çalışmalarıyla gliomaların günümüzde düşük ve yüksek dereceli olarak kabul gören iki gruba ayrımını sağlamıştır (De Angelis ve Mellinghoff, 2011). Daha sonra çalışmalar gliomaların histogenetik konumlarını, genel morfolojilerini ve karakterizasyonlarını saptamak amacıyla hız kazanmıştır. Stroebe, gliomaların ilk gerçek detaylı mikroskopik tasvirini yaparak, glioma ve sarkoma arasındaki temel davranış farklılıklarını doğrulamıştır (Zülch, 1986). 1926 yılında Percival Bailey ve Harvey Cushing’in çıkardığı, glioma grubu tümörlerin prognoz çalışmalarıyla ilişkili histogenetik temeli üzerine sınıflandırılmasını konu alan yayın, önemi ve pratik alanda kullanım başarısı nedeniyle dünya çapında büyük ilgi görmüştür (Bailey ve Cushing, 1926). Nöropatolog Scherer ilk olarak 1938’de primer ve sekonder glioblastoma kavramlarını öne sürmüş ve 1940’lara kadar bu konuyla ilgili bir dizi makale yayınlamıştır (Scherer, 1938, 1940a, 1940b).

2.1.1.2. Sınıflandırma ve Epidemiyoloji

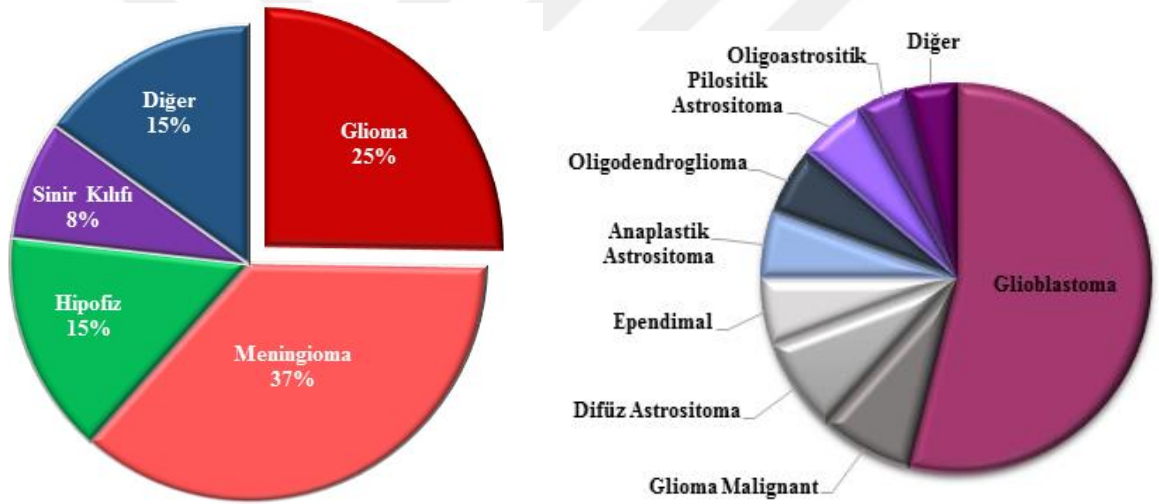
Geçtiğimiz yüzyılda, beyin tümörlerinin sınıflandırılması tümörlerin kökenlendiği varsayılan hücrelere ve bunların farklılaşma düzeyleri ile mikroskopik benzerliklerine göre oluşturulan histogenez konseptine dayanıyordu (Gupta ve Dwivedi, 2017). Ancak bu değerlendirme çoğu zaman kesin sonucu ortaya koyamadığından, gliomaların sınıflandırılmasına yönelik ortak ve net bir görüşe ihtiyaç duyulmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (“World Health Organisation”, WHO) dünya çapında, sınıflandırma için beyin tümörlerinin mikroskopik örneklerini elde etmek üzere yaklaşık 300 patologdan oluşan 23 merkez istihdam etmiş ve 1979 yılında Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Tümörlerinin WHO Sınıflandırmasının ilk baskısını yayınlamıştır.

Ardından 1982, 2000, 2007 ve 2016'da güncellemeler yapılarak sınıflandırma genişletilmiştir (Thawani ve Brem, 2016). Bu güncellemeler son yirmi yılda yapılan çalışmalarda beyin tümörü oluşumunun genetik temelini açıklığa kavuşturulmasıyla mümkün olmuştur (Louis, 2012). 2016 MSS WHO sınıflandırması, Tablo 2.1'de özetlenmiş olup, 2007 yılı 4.Baskı'nın bir güncellemesini sunmaktadır. İlk kez, MSS tümörlerinin WHO sınıflandırmasında, birçok tümör varlığını tanımlamak için histolojiye ek olarak moleküler parametreler kullanılmıştır, böylelikle tümör tanısının molekül düzeyinde nasıl yapılandırılması gerektiğine dair bir konsept formüle edilmiştir (Louis ve diğ., 2016).

Tablo 2.1: 2016 yılına ait gliomalarda WHO sınıflandırması (Reifenberger ve diğ., 2017).

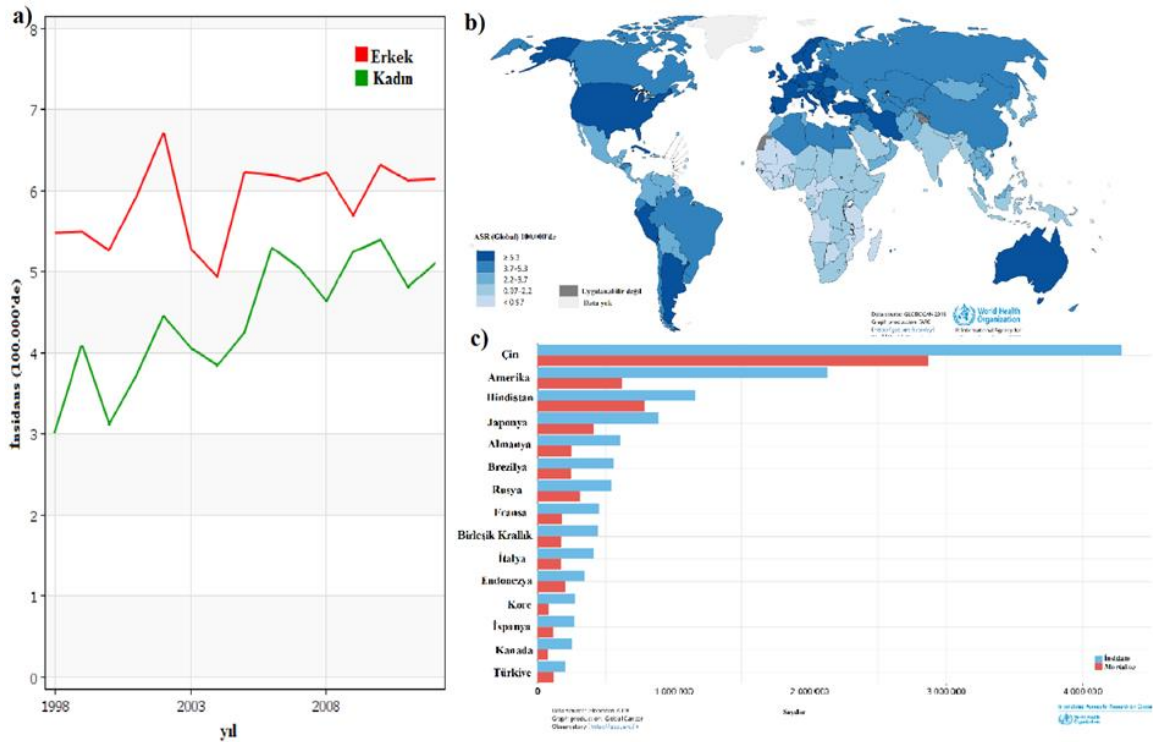
Tümör sınıflandırması	WHO tümör derecesi
Difüz astrositik ve oligodendroglial tümörler	
Difüz astrositom, IDH-mutant Gemistositik astrositom, IDH-mutant	II
Difüz astrositom, IDH-wildtype	II
Difüz astrositom, tanımlanmamış	II
Anaplastik astrositom, IDH-mutant	III
Anaplastik astrositom, IDH-wildtype	III
Anaplastik astrositom, tanımlanmamış	III
Glioblastom, IDH-wildtype Dev hücreli glioblastom Gliosarkom Epitelioid glioblastoma	IV
Glioblastom, IDH-mutant	IV
Glioblastom, tanımlanmamış	IV
Difüz orta hat gliom, H3-K27M mutant	IV
Oligodendrogliom, IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı	II
Oligodendrogliom, tanımlanmamış	II
Anaplastik oligodendrogliom, IDH-mutant ve 1p/19q kayıplı	III
Anaplastik oligodendrogliom, tanımlanmamış	III
Oligoastrositom, tanımlanmamış	II
Anaplastik oligoastrositom, tanımlanmamış	III
Diğer astrositik tümörler	
Pilositik astrositom Pilomiksoid astrocytoma	I
Subependimal dev hücreli astrositom	I
Pleomorfik ksantoastrositom	II
Anaplastik pleomorfik ksantoastrositom	III
Ependimal tümörler	
Subependimom	I
Miksopapiller ependimom	I
Ependimom Berrak hücreli ependimom Papiller ependimom Tanisitik ependimom	II
Ependimom, RELA füzyon gen pozitif	II / III
Anaplastik ependimom	III
Diğer gliomlar	
Kordoid gliom (lokalizasyon-3.ventrikül)	II
Anjiyosentrik gliom	I
Astroblastom	-

Gliomalar, merkezi sinir sisteminde herhangi bir lokasyonda bulunabilmekle birlikte, öncelikle beyinde bulunan glial dokuda ortaya çıkmaktadır. Gliomalar tipik olarak malign karakterde olsa da, bazı türleri sürekli olarak malignite göstermemekte ve bu davranışlarına göre WHO derecelendirmesi I – IV arasında değişiklik göstermektedir. Erişkinlerde en sık görülen gliomalar arasında astrositomalar, oligodendrogliomalar ve oligoastrositomalar sayılabilir (Ostrom ve diğ., 2014). Primer beyin tümörleri ve gliomaların tiplerine göre dağılımı Şekil 2.1’de verilmiştir. Glioblastoma Multiforme (GBM) astrositik soyun en agresif difüz tümörü olup, WHO sınıflamasına dayalı olarak sınıf IV glioma olarak kabul edilir. GBM tüm gliomaların %54’ünü ve tüm primer beyin tümörlerinin %16’sını oluşturan en yaygın malign glioma grubudur. Sadece 15 aylık bir ortalama sağkalım ile tedavi edilmesi zor bir tümör olarak kabul edilmektedir (Tamimi ve Juweid, 2017).



Şekil 2.1: Tiplerine göre primer beyin tümörleri (sol) ve subtiplerine göre gliomaların (sağ) dağılımı (Nilsson ve diğ., 2018).

Beyin tümörlerine ait insidans grafikleri Şekil 2.2’de verilmiştir. Buna göre beyin ve santral sinir sistemi tümörlerinin Türkiye’deki yıllık insidansı, 20 yıl içerisinde yüksek bir artış göstermiştir. Son verilere göre hastalık insidansı kadınlar için 100.000’de 5.1, erkekler için ise 100.000’de 6.1 seviyelerinde seyretmektedir. Dünya genelinde ise beyin tümörlerinin görülme oranı ülkelere göre değişiklik göstermekle birlikte, Çin ve Amerika gibi gelişmiş ekonomilere sahip ülkelerde dikkat çekici bir insidans grafiği sergilemektedir. En yüksek hastalık oranları erkekler ve kadınlar için 85 ila 89 yaş grubu arasında görülmekte ve oldukça düşük sağkalım oranlarıyla dikkat çekmektedir (Flowers, 2000).



Şekil 2.2: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (“International Agency for Research on Cancer”, IACR) ve WHO dataları kullanılarak oluşturulan insidans grafikleri.

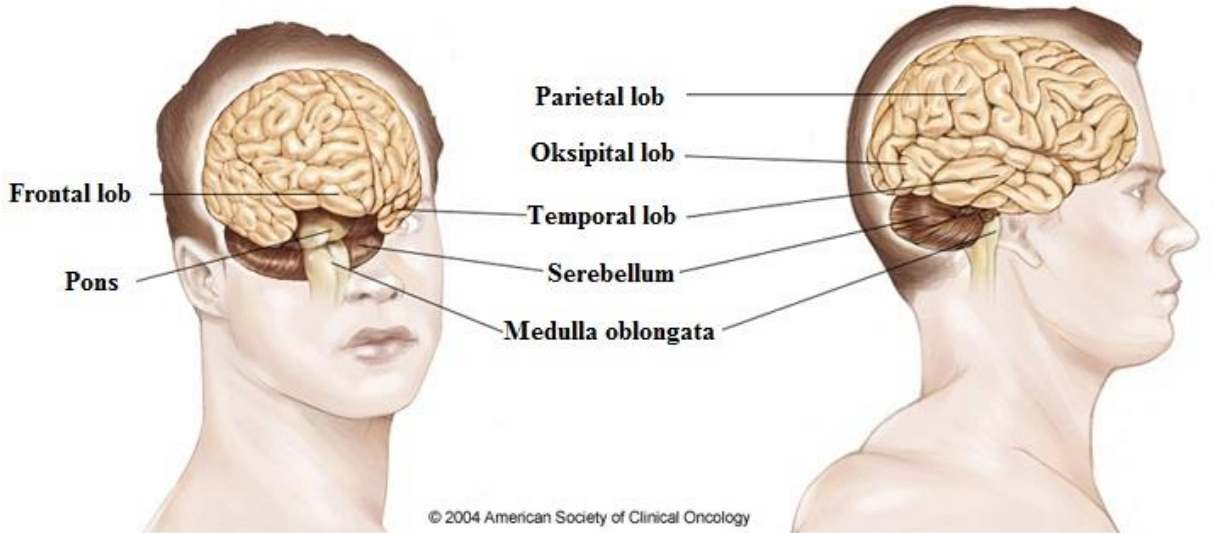
(a) yıllara bağlı primer beyin tümörü insidansı (b) primer beyin tümörü insidansının global haritalaması (c) primer beyin tümörlerinin en çok görüldüğü 15 ülke ve insidansa bağlı sıralamaları

2.1.1.3. Histopatoloji ve Moleküler Patogenez

Temel elemanları mikroglialar, astrositler ve oligodendrosit soyu hücreler olan glial hücreler, memeli beyninin büyük bir bölümünü oluşturur. Başlangıçta nöronlar için birleştiricilikten başka bir işlevi olmadığı kabul edilen glial hücrelerin olası ek rolleri hakkında yapılan araştırmalarla birlikte, beynin gelişiminde ve işlevinde kritik bir fonksiyona sahip olduğu saptanmıştır (Nagelhus ve diğ., 2013; Jäkel ve Dimou, 2017). Glial hücre disfonksiyonunun otizm, şizofreni, ağrı ve nörodejenerasyon gibi çeşitli nörolojik hastalıklara katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Miller, 2004; Ji, 2013; Bernstein, 2015; Petrelli, 2016). İmmünohistokimyasal çalışmalar gliomalar ve beyindeki normal glial hücreler arasında histopatolojik benzerlikler olduğunu göstermiştir. Bu durum bir yüzyıl önce gliomanın bir glial hücre tipinden kaynaklandığı varsayımının ortaya atılmasında sebep olmuştur. Ancak glial kök ve progenitör hücrelerin keşfinin ardından, gliomaların kökenine dair yapılan çalışmalarda olgunlaşmamış glial hücrelerin bunda fonksiyonu olduğu fikri öne çıkmıştır.

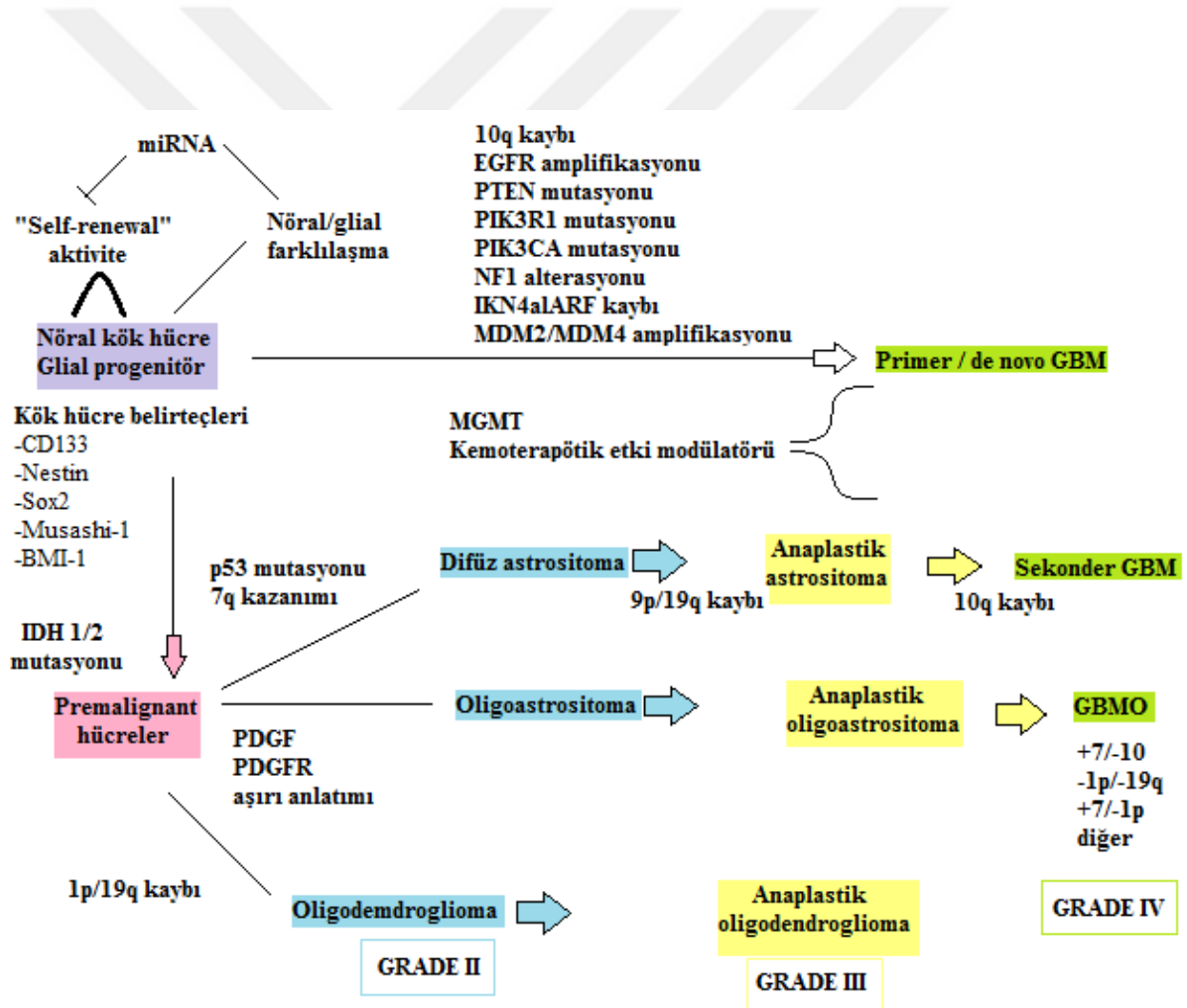
Gliomadan-türevlenen kanser kök hücrelerinin (“glioma-derived cancer stem cells”) veya glioma-başlatıcı hücrelerin (“glioma-initiating cells”) yüksek dereceli gliomalarda tanımlanması, gliomanın kaynağı olarak olgunlaşmamış glial hücrelerin sorumlu olduğunu destekleyici nitelik taşımaktadır (Jiang ve Uhrbom, 2012).

Neoplastik transformasyon, insan sinir sisteminin tüm glial hücre tiplerinde ortaya çıkmakta ve çok çeşitli klinikopatolojik tipler ve morfolojik varyantlar üretmektedir. Tüm gliomalar, özellikle difüz infiltratif astrositomlar, daha az farklılaşmış ve daha malign bir fenotipe doğru doğal bir ilerleme eğilimine sahiptir. Diğer dokularda olduğu gibi, bu başkalaşım genetik değişikliklerin ardışık ve kümülatif birikimini yansıtmaktadır (Kleihues ve diğ., 1995). Farklı loblardaki gliomaların gelişiminin, glial doku hacmiyle ilişkili olduğu ve gliomaların anatomik lokasyonlarındaki farklılıkların açığa çıkarılmasının gliomaların etiyolojisi ve patogenezi hakkında bazı detaylar sağlayabileceği düşünülmektedir. Örnek olarak, travmatik olayların veya cep telefonlarından kaynaklanan elektromanyetik radyo frekansı alanlarına maruz kalmanın, gliomaların belirli lokasyonlarda gelişimine yol açabileceği gösterilmiştir (Yang ve diğ., 2017). 2015 yılında gerçekleştirilen bir çalışma, gliomaların beynin esas olarak ön subkortikal yapılarında, daha sonra parietal, temporal loblarda ve küçük oranda oksipital loblarda (Şekil 2.3) ortaya çıktığını göstermiştir (Oslobanu ve Florian, 2015).



Şekil 2.3: Beyin anatomisini gösteren illüstrasyon.

Moleküler patogeneziyle ilgili yapılan çalışmalarda, gliomalar için genomik yapının geliştirilmesi ve fonksiyonel sonuçlarının daha iyi anlaşılması, içsel olarak tutarlı moleküler sınıflandırma etiketlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu bağlamda, O-6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz (MGMT) promotörünün metilasyonu, İzositrat dehidrogenaz 1/2 (IDH1/2) mutasyonları, 1p/19q delesyonları, anormal epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) yolları, anormal p53/Retinoblastoma (Rb) yolları, kanser kök hücre belirteçleri ve mikroRNA'ların prognostik ve prediktif moleküler belirteçler olarak gliomaların saptanmasında kullanılabileceği gösterilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: İnsan yüksek dereceli gliomalar için önerilen genetik değişiklikler, anormal sinyal yolları ve terapötik modülatörler (Masui ve diğ., 2012).

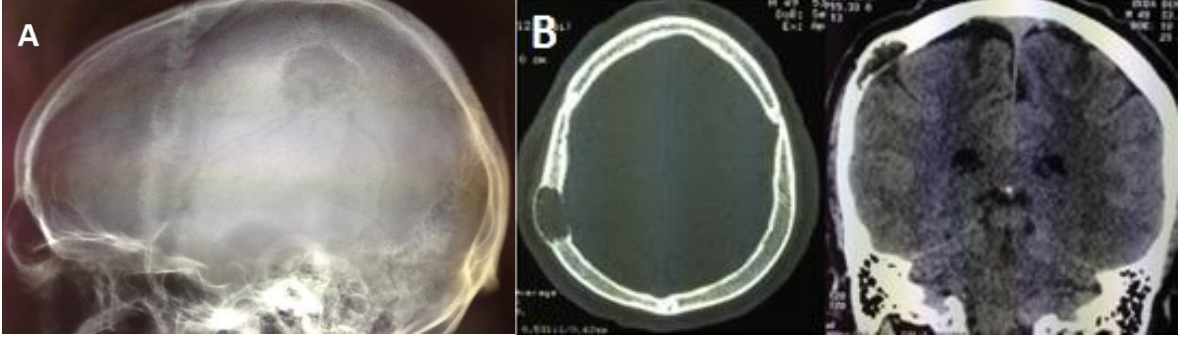
2.1.2. Tanı ve Tedavi Standartları

2.1.2.1. Teşhis ve Görüntüleme

Diğer beyin tümörlerinde olduğu gibi malign gliomaları olan kişiler çok çeşitli nörolojik belirtilere, semptomlara ve fonksiyonel kısıtlılıklara sahiptir. Bunlar hastalığın seyrine, seviyesine ve yapısal özelliklerine göre değişkenlik göstermekle birlikte, çoğu hastada yüksek frekansta meydana gelmektedir (Blakeley ve diğ., 2016). Düşük dereceli gliomalarda en yaygın görülen belirti ve semptomlar: nörolojik muayene bulguları, epilepsi, bölgesel nörolojik kayıplar, nöro-endokrin rahatsızlıklar, papilödem ve beyin tümörüne sahip hastaların neredeyse yarısını etkileyen baş ağrısı durumudur (Whittle, 2004). Nörolojik muayenelerde felç, ekstremitte zayıflığı ya da davranış değişiklikleri gibi bulguların görüldüğü hastalarda, malign glioma gelişimi 3 ayda, yavaş gelişen düşük dereceli tümörler için, 6 aya kadar geçen bir süre içerisinde saptanmaktadır (Hochberg ve diğ., 2014).

Görüntüleme yöntemlerinden biri olarak 1950’lerde kullanılmaya başlanan direkt radyografi, primer tümörlerin değerlendirilmesi için günümüzde sıklıkla kullanılmamaktadır. Sadece kalvaryuma kadar taşınan beyin tümörlerinde, X-ray sonuçları (Şekil 2.5/A) kafatası erozyonuna bağlı değişiklikleri gösterebilmektedir. Ancak hastanın optimal tedavisi için sadece lezyonun tanınması değil, aynı zamanda beyin tümörlerini taklit eden diğer hastalıklardan ayrıştırılması da gereklidir. Son 30 yılda, ileri tıbbi teknolojilerin gelişmesinde büyük bir ilerleme kaydedilmiştir. Bilgisayarlı tomografi (“Computerized Tomography, CT), manyetik rezonans görüntüleme (“Magnetic Resonance Imaging, MRI) ve nöronavigasyon tekniklerinin ortaya çıkması, glioma lokasyonunun ve türünün doğru bir şekilde belirlenmesini sağlayarak uygun tedavinin seçilmesini mümkün kılmaktadır (Kelly, 2010).

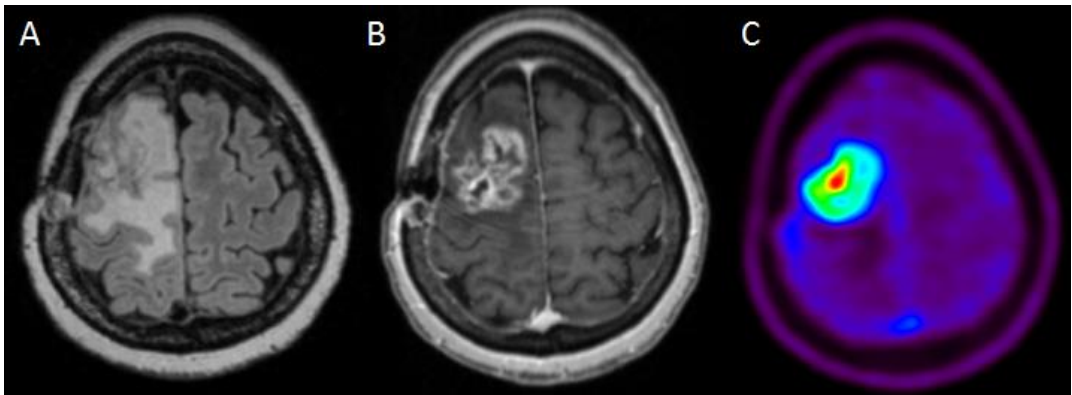
CT akut durumda kullanılan nöro-görüntüleme modalitesidir ve genellikle intrakraniyal bozukluk semptomları olan hastalarda yapılan ilk çalışmadır. Ancak beynin kesitsel görüntülerini (Şekil 2.5/B) yansıtan bir tür X-ışını testi olan CT’nin tümörleri belirlemede yetersiz olduğu, tümör hacimlerini normalden küçük olarak saptadığı ve olası tümörlerin dozajın altında kaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Prabhakar ve diğ., 2007).



Şekil 2.5: (A) Kafatası kemik erozyonunu gösteren X-ray (B) iç tabaka erozyonunu ve dış tabakanın intraosseöz lezyondan incelmesini gösteren CT (Kim ve diğ., 2015).

MRI beynin ayrıntılı görüntülerini (Şekil 2.6) oluşturmak için manyetik alan ve radyo dalgaları kullanan tehlikesiz bir ölçüm metodudur. Malignant gliomaların tanısında yüksek derecede güvenilirlik sağladığı için neoplastik yayılımın tam kapsamının değerlendirilmesinde, yanlış tanı riskinin en aza indirilmesinde ve tümör veya tedavinin potansiyel komplikasyonlarının belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (Ion-Margineanu ve diğ., 2017). Çoğu vakada MRI'ın, bir X-ray, CT taraması ya da ultrason ile görülemeyen beyin bölümlerinin net görüntülerini sağlayabildiği ortaya konmuştur (Runge ve diğ., 2015).

Pozitron emisyon tomografisi (PET) ise, özellikle radyoaktif olarak etiketlenmiş amino asitlerin saptanmasına bağlı olarak görüntüleme yapmasından dolayı yüksek bir afiniteye sahip olan, gliomaların tanısı ve tedavi planlamasında doğru belirlemelere imkan tanıyan bir nükleer tıp yöntemidir (Verger ve Langen, 2017).



Şekil 2.6: Çözünürlüğü artırılmış görüntüleme teknolojileri (A) MRI, (B) Kontrastı artırılmış MRI, (C) 18F-Fluciclovine-PET.

Görüntüleme yöntemlerinin dışında gliomanın histopatolojik tanımı mikroskopik morfolojisine dayanmaktadır. Gliomanın lokasyonuna bağlı olarak, beyin tümörünün küçük bir bölümü bir iğne ile veya biyopsi ile çıkarılarak, malign veya benign olup olmadığı mikroskopik yöntemlerle analiz edilmektedir. Malignant gliomalar tipik olarak büyük tümörlerdir. Genellikle kalın, düzensiz kenarlara ve hemorajik bir bileşene sahip olabilen merkezi bir nekrotik bölgeye sahip olan bu tümörler, neoplastik hücreler tarafından infiltrasyona sahip vazojenik tip ödem ile çevrilidir (Gaillard, 2018). Günümüzde beyin tümörlerini değerlendirmek için klinik uygulamada iki non-invaziv tıbbi görüntüleme tekniği, MRI ve PET-CT, görüntülemenin temel yolu olarak kullanılmaya rağmen, kesin tanı histopatolojik sonuçlara göre konulmaktadır (Diwanji ve diğ., 2017; Gandia ve diğ., 2017).

2.1.2.2. Güncel Tedavi Yöntemleri

Malignant gliomalara yönelik tedavinin seçilmesi birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörler, hastanın pre-operatif işlev düzeyi, performans durumu, yaş ve hasta ile tedavi eden hekimlere sunulan kaynaklar olarak belirtilmektedir. Postoperatif radyasyon terapisinin tek başına uygulanması 2005'e kadar standart tedaviyi oluşturmaktaydı, ancak pivotal faz III denemelerinin sonuçlanmasıyla konkominant temozolomid (TMZ) kemoterapisinin radyasyonla birlikte uygulandığında daha etkili olduğu doğrulanmıştır (Stupp, 2009). Şu an için standart tedavi; tümörün cerrahi rezeksiyonunu takiben oral alkilleyici kemoterapi ajanı TMZ (Temodar®) uygulaması ve eşzamanlı uygulanan radyasyon terapisi ile TMZ adjuvan kemoterapi olarak belirlenmiştir (Davis, 2016).

Gliomalar halen beyin cerrahları için önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Hastalık kontrolü ve tekrar nüksetmesinin önlenmesi, tıbbi ve cerrahi tedaviler ile sağlanmaya çalışılmaktadır. Cerrahi tedavi ile ilgili olarak, daha iyi sonuçlar elde etmek ve sağkalım oranlarını artırmak için neoplazm rezeksiyonunun önemli olduğu vurgulanmaktadır (Barone ve diğ., 2018). Cerrahi müdahalenin amacı tümör rezeksiyonunu maksimize etmek ve nörolojik morbiditeyi en aza indirmek olmaktadır. Bu durum “onko-fonksiyonel denge” olarak tanımlanmakta ve gliomalar için fonksiyonel haritalama destekli rezeksiyon gibi yeni geliştirilen cerrahi işlemlerle uygulanmaktadır (Fernandez Coello ve diğ., 2013). Fonksiyonel haritalama; primer konuşma, motor veya duyu korteksinin rezektif uygulama esnasında zarar görmemesi amacı ile önceden belirlenmesi anlamı taşımaktadır.

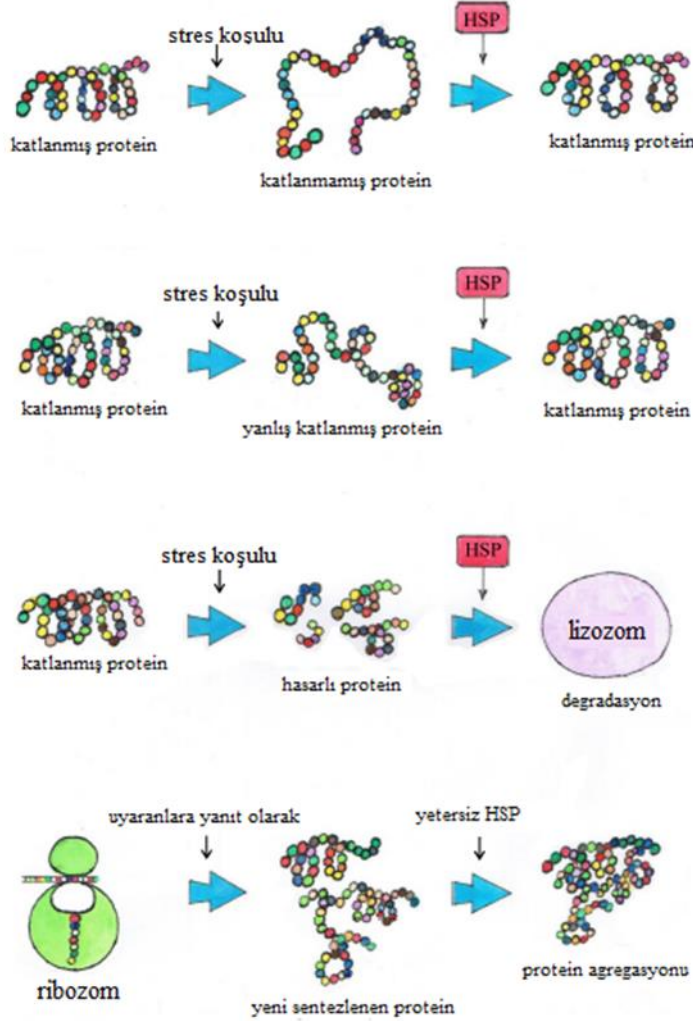
Anti-vasküler endotelyal büyüme faktörü-A antikoru bevasizumab (Avastin®), Amerika Birleşik Devletleri de dahil olmak üzere birçok ülkede rekürren glioblastomlu hastaların tedavisi için onaylanmıştır. Damar yoluna verilen bu ilaç, yeni kan damarlarının oluşumunu durdurmakta, tümöre ulaşan kan akışını kesmekte ve bu sayede tümör hücrelerini öldürmektedir. Glioblastomada, randomize bir faz II çalışması, lomustin ile kombine bevasizumabın tek başına lomustin ile karşılaştırıldığında hayatta kalma oranını arttırdığını göstermiştir (Wenger ve diğ., 2017). Kemoterapötik veya diğer terapilerin lokal olarak verilmesi uzun zamandır ilgi çeken bir araştırma konusu olmuştur. Karmustin ilaç kapsülleri yara iyileşmesi konusunda bir miktar umut vadetse de, kısıtlı etkinliği nedeniyle kullanımı sınırlanmaktadır (Westphal ve diğ., 2003).

GBM için lokal ilaç uygulamasına yeni bir yaklaşım oluşturmak amacıyla Rowland ve arkadaşları, intrakraniyal kemoterapi için potansiyel olarak kullanılacak hidrojel bazlı yeni bir taşıyıcı hazne ortamı üzerinde çalışmışlardır. 2018 mayıs ayında yayınlanan sonuçlarda sistemin güvenilirliği ve avantajları ortaya konarak yeni bir tedavi aracı tanımlanmıştır (Rowland, 2018).

Gliomaların tedavisinde önemli ilerlemeler, medikal ve cerrahi tedaviler ile elde edilmiştir. Günümüzde neoplazmin maksimum rezeksiyonu daha iyi sonuçlar ve hayatta kalma oranları kazanma açısından halen en büyük öneme sahip uygulamadır. Bu nedenle rezeksiyon işlemini daha güvenli hale getirmek ve verimini maksimuma çıkarmak üzere çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle mikrocerrahi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik beyin-haritalama tekniklerinin kullanılması için dünyanın en güçlü MRI makinelerinin geliştirilmesi insan beyninin görüntülenmesinde sınırları zorlamaktadır (De Martino, 2018). Ayrıca glioma tedavisinde tümörü ortadan kaldırdıktan sonra kalan kanser hücrelerine saldıran mikro parçacıkları işlem sırasında implante etmek gibi, verimliliği artırmayı hedefleyen çalışmalarla hedefe yönelik tedaviler gündeme gelmektedir (Shankar ve diğ., 2018).

2.2. STRES PROTEİNLERİ

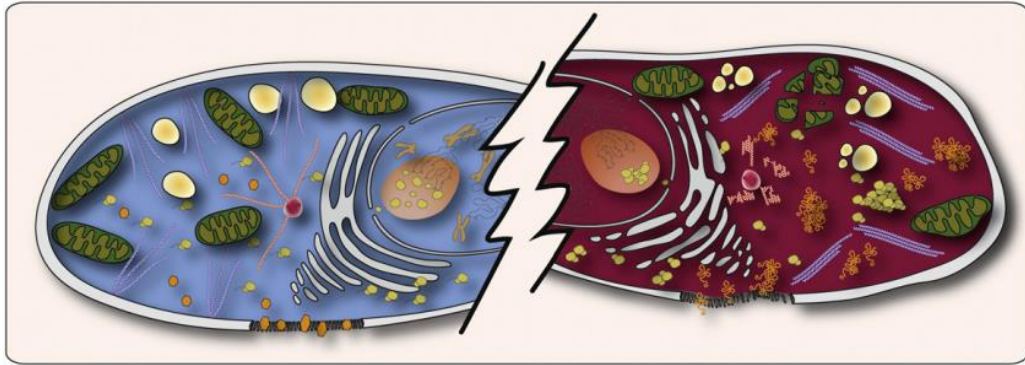
Isı şoku genleri, moleküler şaperonları yani hücrede “house-keeping” fonksiyonuna katılan proteinleri kodlayan büyük bir gen grubunun alt kümesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu proteinler için kullanılan “şaperon” terimi, hücrede istenmeyen protein agregatları oluşmasını önleme işlevlerinden dolayı benimsenmiştir. Bu fonksiyonlarına ek olarak moleküler şaperonlar, çok alt birimli yapıların katlanması, birleştirilmesi, taşınması ve yanlış katlanmış veya agregat oluşturmuş proteinlerin degradasyonu işlemlerinde de rol oynamaktadır. Şekil 2.7’de verilen bu fonksiyonlar normal hücresel koşullar altında önemli olsa da, moleküler şaperonlara olan asıl ihtiyaç hücresel ve moleküler yapılara potansiyel olarak zarar verebilecek stres koşulları altında ortaya çıkmaktadır (Sørensen ve diğ., 2003).



Şekil 2.7: HSP'lerin hücredeki genel şaperon işlevleri (Fung ve Kong, 2017).

1962 yılında, İtalyan genetikçi Ferruccio Ritossa, ısı şoku ve metabolik bir çözücü olan 2,4-dinitrofenol uygulamasının, *Drosophila melanogaster* tükürük bezlerinden elde ettiği politen kromozomlarda, kendisinin "puffing" olarak tanımladığı, karakteristik bir patern oluşturduğunu bildirmiştir. Işık mikroskopuyla yaptığı incelemelerde ısı şoku sırasında bu "puff"ların bazılarının normal regresyonunun da gözlemlendiğine dikkat çekmiştir (Ritossa, 1962). 1974 yılında yapılan araştırmada ısı şokundan sonra sentezlenen bu proteinler incelenmiş ve ısı şoku proteinleri ("Heat Shock Proteins, HSPs) ya da diğer bir adıyla stres proteinleri ilk kez tanımlanmıştır (Tissières, 1974). Bu gözlemlerin üzerine HSP'lerin ısı değişimleri ile selektif indüksiyonunun yalnızca meyve sineklerine özgü olduğu düşünülmüştür. Daha sonra 1978'de, ısı şokunun kuş ve memeli hücre kültürlerinde benzer proteinlerin sentezini indüklediğinin keşfedilmesiyle, bu yanıtın türler arasında gen regülasyonunun korunmuş bir sistemi olduğu fikri ortaya atılmıştır (Kelley ve Schlesinger, 1978). Bu önemli keşifler günümüz biyoloji ve tıp disiplinlerinin birçok alanını etkileyen HSP'lerin yapılarının aydınlatılmasına ve bunun yanı sıra insan hastalıklarıyla olan ilişkilerinin zaman içerisinde anlaşılmasına öncülük etmiştir.

Şekil 2.8'de betimlendiği üzere ısı stresi, aktin filamentlerini (mavi) stres fiberlerine dönüştürerek ve diğer filamentlerin (mikrotüp) agregasyonuna neden olarak hücre iskeletine zarar vermektedir. Golgi ve endoplazmik retikulum (beyaz) gibi organeller parçalanmakta, mitokondri (yeşil) ve lizozomların (sarı-beyaz) sayısı ve bütünlüğü azalmaktadır. Sitoplazmada ribozom (sarı) alt birimleri, protein ve RNA'lardan oluşan büyük granüler birikmeler (altıgen ve spagetti stili, turuncu ve sarı) gözlenmektedir. Son olarak, membran morfolojisinde değişim, zar proteinlerinin agregasyonu ve membran akışkanlığında görülen artışla birlikte hücre döngüsünün durdurulmasına sebep olmaktadır (Richter ve diğ., 2010).



Şekil 2.8: Isı şoku stresinin ökaryotik hücre organizasyonuna etkileri.

Isı şoku uygulaması için; standart koşullarda (37°C'da) tutulan memeli hücrelerinin, 40°C'ın üzerindeki sıcaklıklara maruz kalmasının sıcaklık artışına paralel olarak hücre ölümlerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (Hahn, 1974). Bu çalışmadan sonra izlenen proliferatif kapasite, hücre sağkalımının bir ölçüsü olarak kullanılmış ve çalışmalarda uygulanan ısı şokunun derecesi ve süresi bu faktöre göre belirlenmiştir. Bu fenomen termotolerans olarak adlandırılmaktadır (Henle ve Dethlefsen, 1978). Hücrenin geçici termotolerans kazanmasının, bir dizi HSP'nin indüklenmiş sentezi ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğu ilerleyen zamanlarda ortaya konmuştur (Li ve Werb, 1982).

HSP'ler bugüne kadar çalışılan tüm yaşam formlarında (Bakteriler, Arkeler ve Ökaryotlar) varlıkları kanıtlanmış evrimsel olarak korunmuş bir protein ailesidir (Feder, 1999a). HSP'lerin farklı dokular, organlar, organizmalar veya ekolojik ve evrimsel olarak strese maruz kalan daha yüksek taksonlar arasında nasıl ve neden farklılaştığı uzun yıllar boyunca araştırmacıların dikkatini çekmiştir (Feder, 1999b).

Günümüzde moleküler şaperonlar ve HSP'lerle ilgili yapılan çalışmalar ve araştırmacıların ortak çabaları sayesinde bulgular dikkate değer bir yoğunluğa ulaşmıştır. Bakteriler üzerinde yapılan bir çalışmada, HSP üretimi olan bakterilerin daha zorlu sıcaklıklarda büyüebildiği ve HSP'lerin doğal protein yapısına zarar veren bu sıcaklık koşulunda hücreyi ölümden kurtarabildiği gösterilmiştir. Bu etki sayesinde, bakterinin bulunduğu ortamdan insan vücuduna transferi sırasında hayatta kalmasının mümkün olabildiği düşünülmektedir. Diğer taraftan, insanda bulunan HSP'nin bakteriyel homologunun, bağışıklık hücreleriyle etkileşime girebildiği ve mide kanseri veya lepra gibi lezyona sahip hastalıklara yol açan otoimmün tepkiye neden olabildiği sonucu ortaya konulmuştur (Maleki ve diğ., 2016).

Arkelerde yapılan bir çalışmada, termoasidofilik bir arke olan *Sulfolobus solfataricus* P2'nin HSP20 genini kodlama bölgesi, bir plazmid vektörüne klonlanmış ve *Escherichia coli*'de aşırı anlatımının hücreyi termotresten koruduğu saptanmıştır (Li ve diğ., 2011). Hipertermofilik arkelerde termotolerans ile ilgili yapılan sınırlı sayıda çalışmada, bu ekstremofillerin, ayrı bir filogenetik alanın üyesi olmaları ve ekstrem koşullar altında yaşamak için evrimleşmeleri sebebiyle, HSP'lerle alakalı çalışmalara yeni bir bakış açısı sağlayabilecekleri öne sürülmüştür (Trent, 1996). Ancak arkelerdeki stres genleri hakkında sağlanan güncel bilgiler, henüz bakteri ve ökaryotlarda elde edilenlerden çok daha sınırlıdır.

Ökaryotik ısı şoku tepkisi ise, termal ve diğer çevresel streslerin mevcudiyetinde bir dizi sitoprotektif genlerin sentezi ile sonuçlanan, eski ve oldukça korunmuş bir transkripsiyonel program olarak önem arz etmektedir. *Saccharomyces cerevisiae*, bu temel stres tepkisinin düzenleyici özelliklerinin keşfini gerçekleştirmek için önemli bir model olarak görülmekte ve HSP çalışmalarında çokça kullanılmaktadır (Verghese ve diğ., 2012).

Yeni sentezlenmiş polipeptidlerin katlanması gibi HSP'nin ana işlevleri, sitosolde gerçekleştirilir. Sitosolün yanı sıra HSP'ler endoplazmik retikulum, mitokondri ve nükleus gibi organellerde de yer alarak protein homeostazında dinamik roller oynayabilirler (Tytell, 1986). Hücre stres yanıtının keşfinden, protein katlanmasındaki rolleri ve hücre içi mekanizmalarının anlaşılmasına kadar geçen süre içerisinde, yaygın paradigma stres proteinlerinin hücre içi proteinler olduğuydu. Ancak yapılan çalışmalarda, salgılanan moleküler şaperonların büyük bir işlev yelpazesıyla hücreler arası sinyal molekülleri olarak görev aldığı ortaya çıkarıldı.

Kökenine ve mobilitesine bağlı olarak, bir moleküler şaperon farklı şekillerde tanımlanabilir (Macario ve diğ., 2013):

- Otokton: kökenlendiği yerde bulunuyor ve görev yapıyorsa
- İmport: bulunduğu yer kökeni ile aynı değilse
- Sesil: başka bir yapıya, örneğin hücre zarına, bağlanmışsa
- Mobil: Vücut sıvılarında ya da hücreler arası ortamda hareketliyse

Ek olarak, şaperonlar diğer moleküllerle fonksiyonel kompleksler oluşturma kapasitelerine göre de sınıflandırılabilir. Buna göre şaperon rolünü tek başına yerine getirdiği durumda tek; diğer şaperonlar, ko-şaperonlar ve/veya ko-faktörler ile bir “Şaperon Takım” oluşturmaları durumunda ise sosyal grupta yer alır (Czarnecka ve diğ., 2006).

Ancak HSP'ler için kullanılan temel isimlendirme, büyük ölçüde İnsan Genom Organizasyonu (“Human Genome Organisation”, HUGO) Gen Nomenklatür Komitesinin atadığı terminolojiye dayanmaktadır (Kampinga ve diğ., 2009). Bu genlerin ve ürünlerinin birçoğu, diziliş homolojisine ve tipik moleküler ağırlığına dayalı olarak ailelere atanmıştır: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 ve küçük HSPler (“small HSPs”, sHSPs). Ökaryotlarda her HSP ailesi indüklenebilirlik, hücre içi lokalizasyon ve fonksiyon bakımından farklı olan birden fazla üyeden oluşmaktadır. Bu aileler ve majör üyeleri Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2: HSP aile isimlendirmesi ve bulundukları lokasyonlar (Zorzi, 2011'den revize edilmiştir).

AİLE	ORGANİZMA	ŞAPERONLAR	LOKASYON	
HSP100	<i>E.coli</i> <i>S.cerevisiae</i>	ClpA, B, C Hsp104	Sitosol Sitosol	 6-7mer
HSP90	<i>E.coli</i> <i>S.cerevisiae</i> İnsan	HtpG Hsp83 Hsp90 GRP94 TRAP1	Sitosol Sitosol Sitosol, Nukleus ER Mitokondri	 Dimer
HSC/HSP70	<i>E.coli</i> <i>S.cerevisiae</i> İnsan	DnaK Ssa1-4 Ssb1,2 Kar2, Ssc1 Hsc70, Hsp70 BIP, mHsp70	Sitosol Sitosol ER, Mitokondri Sitosol, Nukleus, ER, Mitokondri	 Monomer
HSP60	<i>E.coli</i> <i>S.cerevisiae</i> Bitki İnsan	GroEL/ES Hsp60 Cpn60 Hsp60	Sitosol Mitokondri Kloroplast Mitokondri	 14-mer
HSP40	<i>E.coli</i> <i>S.cerevisiae</i> İnsan	dnaJ Ydj1 Hdj1, Hdj2	Sitosol Sitosol Nukleus	 Monomer
sHSP	<i>E.coli</i> İnsan	IbpA, IpbB Hsp27, kristalin	Sitosol Sitosol	 8-24mer

sHSP'ler, 12-43 kDa'lık moleküler kütleyle sahiptir ve C-terminal domenlerinde, "α-kristalin domeni" olarak adlandırılan yüksek oranda korunmuş 80-100 amino asitlik bir uzantı ile karakterize edilirler. Hsp27, αA- ve αB-kristalin gibi sHsp ailesinin bazı üyeleri büyük oligomerik yapılar oluştururarak *in vitro* protein agregasyonu ve ısı inaktivasyonunu inhibe eder, anti-apoptotik aktivite gösterir ve aktin mikrofilamentlerinin stabilizasyonu aracılığıyla stres toleransında rol alırlar (Bakthisaran ve diğ., 2015).

Çoğu durumda HSP40'lar, yüksek ölçüde korunmuş J-domeni ile karakterize edilen homodimerik proteinlerdir. HSP40 ailesi üyeleri, katlanmamış ve yeni üretilen polipeptitlerin hidrofobik kalıntılarına kendileri bağlanarak veya ortak substratları HSP70'ler ile birlikte çalışırlar. Ko-şaperon olarak Hsp40 proteinlerinin ana işlevi, Hsp70 proteini aracılığıyla adenosin trifosfat (ATP) bağımlı polipeptit bağlanmasını regüle etmektir (Fan ve diğ., 2003).

HSP60 ailesi proteinlerin yapıları, merkezi simetri düzlemi olan fıçı-benzeri bir kompleks içinde dimerize olan heptamerik halkalardan oluşur. HSP60, mitokondriyal matrisin bir parçası olup, membran translokasyon mekanizması aracılığıyla mitokondriyal matrise taşınan yeni üretilmiş mitokondriyal proteinlerin katlanmasını kolaylaştırır. Ayrıca HSP10 ile oluşturduğu kompleksler, katlanmamış veya yanlış katlanmış protein formlarının kendi doğal konformasyonlarına geri dönmeleri için en uygun ortamı sağlar (Chandra ve diğ., 2007).

Hsp70 şaperonları iki ana domenden oluşmaktadır: N-terminal ATPaz domeni ATP'ye bağlanarak hidrolize olmasını sağlarken, C-terminal domeni polipeptit bağlanması için gereklidir. Bu şaperonlar, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması ve birleştirilmesi, yanlış katlanmış proteinlerin düzenlenmesi, organellerde bulunan veya sekrete edilen proteinlerin membran translokasyonu ve düzenleyici proteinlerin aktivitesinin kontrolü dahil olmak üzere çok çeşitli şaperon işlevlerine sahiptir (Sriram ve diğ., 1997; Mayer ve Bukau, 2005).

HSP90 ailesinin proteinleri üç yapısal domene sahiptir: orta domen, değişken yüklü bir bağlayıcıyla orta domene bağlı olan ATP bağlama bölgesini içeren N-terminal domen ve Hsp90'ın dimer formunu oluşturmaktan sorumlu olan, yüksek oranda korunmuş bir MEEVD motifi ile sonlanan C-terminal domen. Hsp90 şaperonları, steroid hormon reseptörleri, tirozin kinazlar, serin/treonin kinazlarla etkileşerek çeşitli sinyal transdüksiyon yolları için gerekli olan “client” proteinlerin katlanması ve aktivasyonuna aracılık eder (Chiosis ve diğ., 2013; Jackson, 2013).

HSP100 proteinlerinin tümü, belirli bölgelere eklenmiş yapısal ilave domenlere sahip, AAA modülü olarak adlandırılan, korunmuş bir yapısal çekirdeğe sahiptir. Bu çekirdek ATP-bağımlı protein katlama mekanizmasının çalışması için gerekli olan “ATP yakıtlı bir motor” benzeri bir işlev görür. Hsp100 moleküler şaperon ailesi, agregat oluşturmuş proteinleri yeniden yapılandırmak ve yeniden etkinleştirmek için eşsiz bir yetenek sergiler. Hsp100 aracılı protein disagregasyonu, Hsp70 ve Hsp40 ailelerinden gelen diğer şaperonların aktivitesi ile bağlantılı olarak çalışmaktadır (Maurizi ve Xia, 2004; Zolkiewski ve diğ., 2012).

2.3. ISI ŞOKU FAKTÖRÜ 1

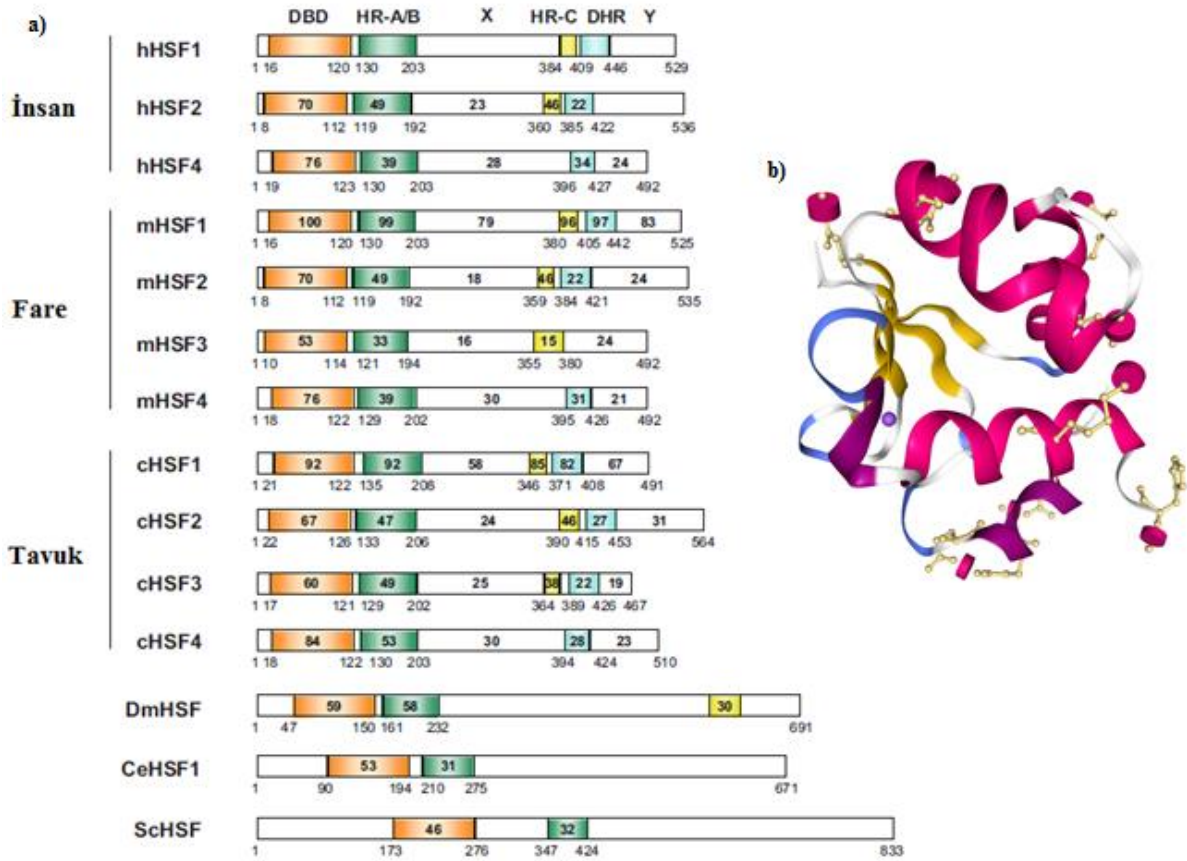
Bakterilerden insanlara kadar tüm organizmalarda evrimsel olarak korunan ve hücrelerde proteostazı sağlayan ısı şoku yanıtı (“Heat Shock Response”, HSR) oksitleyici maddeler, toksinler, ağır metaller, enfektif mikroplar ve ısı şoku gibi hücresel stres faktörleri tarafından indüklenebilmektedir (Åkerfelt, 2010). İlk olarak 1987 yılında mayalarda keşfedilen ısı şoku faktörlerinin (“Heat Shock Factors, HSFs), HSR’yi transkripsiyon düzeyinde gerçekleştiren bir regülasyon mekanizmasıyla kontrol ettiği bulunmuştur (Sorger ve Pelham, 1987).

Bu yüzyılın başlarına kadar, HSF’lerin yalnızca HSP’lerin anlatımını düzenleyen, ısı şokuna bağlı bir transkripsiyon faktörü olduğu düşünülmüştü. Ancak yapılan yeni çalışmalarla, HSF’lerin çeşitli gelişimsel olayları ve hücresel süreçleri etkilediği, ayrıca moleküler stres kaynaklı patolojik durumlarda rol oynadığı ortaya çıkarıldı. Buna ek olarak HSF’lerin maya, *C. elegans* ve *Drosophila*’larda hücre büyümesi ve farklılaşmasında normal yaşam süresi boyunca gerekli olduğu da araştırmalar sonucunda doğrulanarak, konstitütif anlatımlarına dair bulgular elde edildi (Morano ve diğ., 1999; Hsu ve diğ., 2014).

Yapılan immünofloresans mikroskop analizlerinde, memeli HSF proteinlerinin ısı şokuna maruz bırakılmış ve bırakılmamış olmak üzere her iki koşulda, birçok hücre tipi için predominant olarak nükleusta yerleşim gösterdiği bulunmuştur. Ancak bu gözlem stres koşulu uygulanmamış hücrelerin sitoplazmik fraksiyonunda bulunan HSF’lerden alınan sonuçlarda farklılık göstermiştir. Bu da sitoplazmaya taşınan HSF miktarının kullanılan biyokimyasal fraksiyonlama prosedürlerine göre değiştiği sonucunu ortaya koymaktadır. Bu duruma getirilen açıklama monomer HSF’nin fraksiyonlama sırasında nükleustan ayrılırken, trimerik HSF’nin ekstraksiyon sırasında nükleusta bulunan DNA’ya sıkıca bağlı olarak kaldığı şeklindedir (Mercier, 1999).

HSF ailesi güncel sınıflandırmaya göre beş üyeden oluşmaktadır: HSF1, HSF2, HSF3, HSF4 ve HSFY. Bu üyeler arasında HSF1, memeli hücrelerinde HSP genlerinin ekspresyonunun ana düzenleyicisi olarak yer almaktadır, ancak HSP olmayan genlerin de HSF2, HSF3 ve HSF4 tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Jin ve diğ., 2018). HSFY’nin ise, hem hayvanlarda hem de insanlarda spermatogenezde rol oynadığı gösterilmiştir (Tessari ve diğ., 2004).

HSF ailesine üye proteinlerin genel yapısı birçok transkripsiyon faktörüne benzer şekilde, merkezi bir “helix-turn-helix” N-terminal DNA bağlama domeni (DBD); hidrofobik heptat tekrarlarından (“hydrophobic heptad repeat”-A/B, HR-A/B) oluşan bir hidrofobik oligomerizasyon domeni, nüklear “import” ve “export” için gerekli kısa peptid molekülleri (nüklear lokalizasyon sinyalleri) ve AHA motifleri adı verilen aromatik hidrofobik aminoasitlerce zengin C-terminal aktivasyon domeninden (HR-C) oluşmaktadır. HSF ailesi üyelerine ait yapısal şema Şekil 2.9’da verilmiştir. Bu yapıda HSF’ler, oligomerizasyon domenlerini trimerler oluşturmak için kullanmakta ve HSP genlerinin ekspresyonunu aktive etmek için sinyal transdüksiyon yolu aracılığıyla sekansa spesifik trimerik DNA bağlama işlevlerini yerine getirmektedirler (Liao ve diğ., 2016).

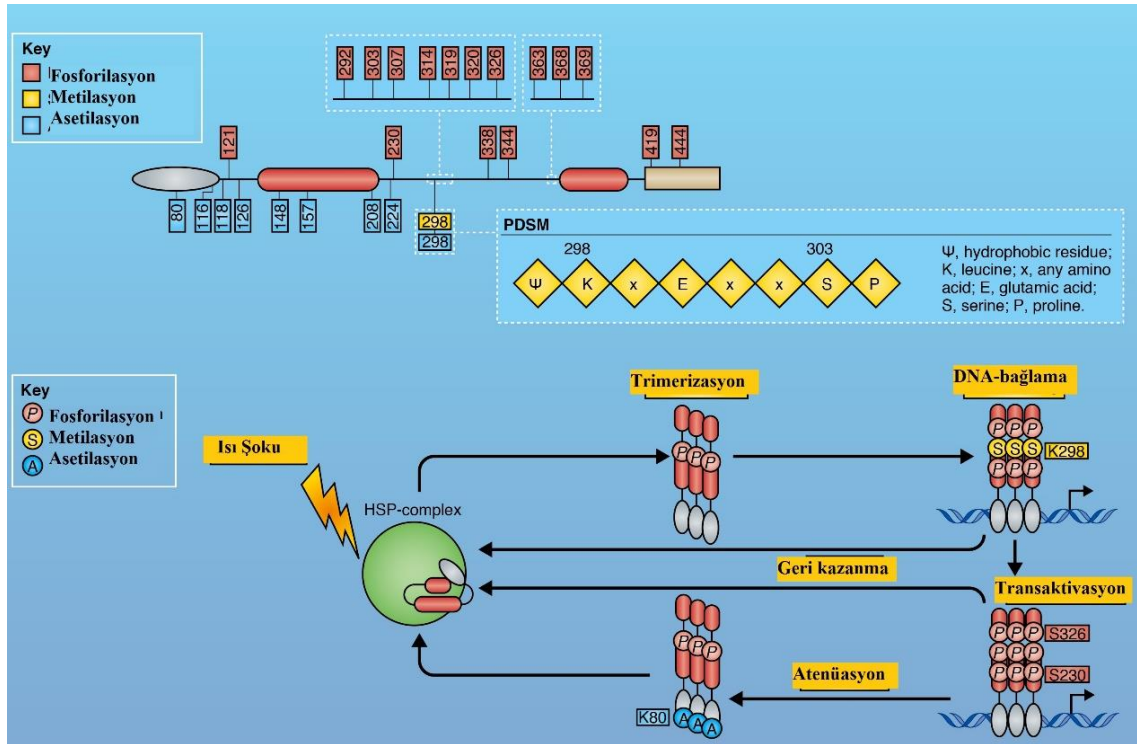


Şekil 2.9: a) HSF aile üyelerinin yapısı (Takii ve Fujimoto, 2016) b) HSF1 proteininin 3-boyutlu şekli (Protein Data Bank).

Her HSF için aminoasit sayıları şemada verilmiştir. Kullanılan kısaltmalar DBD: DNA bağlama domeni; HR: Hidrofobik heptat tekrarları; DHR: HR-C’nin downstream bölümü; h: “human”; m: “mouse”; c: “chicken”; Dm: “*Drosophila melanogaster*”; Ce: “*C. Elegans*”; Sc: “*Saccharomyces cerevisiae*” şeklindedir.

HSF normal hücresel büyüme koşullarında inert bir monomer olarak bulunmaktadır. HSF monomerleri, strese yanıt olarak trimer forma dönüşmekte ve ısı şoku elementi (“Heat Shock Element”, HSE) adı verilen ve HSP’leri kodlayan genlerin promotör bölgelerinde konumlanan, en az üç ters tekrarlı nGAAn pentanükleotid dizilerini içeren, korunmuş dizilere bağlanmaktadır (Lindquist, 1986; Fernandes, 1994). Stres sonucu HSF1’in HSP promotörlerine bağlanmasında görülen artışla birlikte, HSP genlerinin transkripsiyonunda akut bir yükselmeye neden olmaktadır. HSF, transkripsiyonun durdurulmasından birkaç saat sonra HSE’ye bağlanmaya devam ederken transkripsiyon etkinliği hızlı bir şekilde zayıflamaktadır. Hsp70, Hsp90 ve Hsp110 protein ekspresyonunun 43°C’lık bir ısı şokundan 2 ila 6 saat sonra gözlemlendiği ve 100 saate kadar hücrelerde kalabildiği ortaya konmuştur (Subjeck, 1982).

Isı şokunun, HSP genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu düzenlemesi (Şekil 2.10) HSF’nin fosforilasyonunu indüklemesiyle gerçekleşmektedir (Sorger ve diğ., 1987). Bu hiperfosforilasyonun, HSF’lerin aktivasyonuna dahil olmaktan ziyade, onları deaktive etmek için bir düzenleyici mekanizma olarak hizmet ettiği ortaya çıkmıştır (Høj ve Jakobsen, 1994). Bu gözlemler, trimerize HSF’nin ısı şoku sırasında güçlü transkripsiyon aktivitesi gösterebilmesi için modifiye edilmesi gerekliliğini vurgulamaktadır.



Şekil 2.10: HSF1’in stres indüksiyonlu aktivasyonu (Vihervaara ve Sistonen, 2014).

2.4. STRES PROTEİNLERİNİN GLİOMALARLA İLİŞKİSİ

Hsp'lerin sadece strese maruz kalan hücrelerde değil, aynı zamanda farklı kanser hücrelerinde de ekspresyonlarının arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Calderwood ve Gong, 2016). Bu bulgu, kanser ve Hsp'ler arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde ortaya konulması amacıyla birçok çalışmanın yapılmasına da öncü olmuştur. Hsp'lerin protein katlanmasındaki görevleri ve hücre koruyucu özellikleri, malign progresyon boyunca tümör hücrelerinin korunması ve yaşamını devam ettirmesinde büyük rol oynamaktadır.

Malignite açısından kanser progresyonunun ilerlemesi sırasında, hastalar çeşitli terapötik tedavilerden geçmektedir. Uygulanan tedavi, radyasyon veya kemoterapiye dirençli fenotipik hücrelerin hayatta kalarak çoğalmasına yol açmaktadır. İşte bu terapötik direnç ve zayıf prognoz, gliomadaki yüksek HSP anlatım seviyeleri ile yakından ilişkilidir (Sherman ve Multhoff, 2007). İnsan glioblastomunda kemoterapi uygulanmasının HSP'lerin anlatımında artışa yol açtığı bilinmektedir (Scott ve diğ., 2015). HSP üyeleri hücre çoğalmasını uyararak ve ölüm yollarını inhibe ederek tümör büyümesini desteklemektedir (Rajesh, 2017). Özellikle HSP27 ve HSP90'ın GBM büyümesi, invazyonu ve tedaviye direncinde kritik rol oynadığı bulunmuştur. Yapılan çalışmalar Hsp ekspresyonunun azaltılmasının kanser tedavisinde yeni bir hedef olabileceğini ortaya koymuştur. Hsp'ler, kaspaz aktivitesini azaltacak potansiyel bir antiapoptotik gen sınıfı olarak bilinmektedir, dolayısıyla farklı apoptotik uyaranlara karşı direnç kazanılmasında önemli medyatörlerdir.

HSF1, Hsp'lerin ısı şoku cevabının modülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. HSF1 diğer düzenleyici elemanlar ile birlikte sadece HSP'leri değil, aynı zamanda RAS/MAPK ve cAMP/PKA yollarını, ekstraselüler matriks remodülasyonu, epitelyal–mezenşimal tranzisyon ve glikoliz gibi diğer tümörijenik yolları da kontrol etmektedir (Dai ve diğ., 2007). Glioma hücrelerinde yapılan bir çalışmada HSF1 susturumu temozolomid tedavisi ile birleştirildiğinde, apoptozda artış görüldüğü, koloni oluşturma aktivitesi ve SOX2 protein ekspresyonu gibi CSC benzeri özelliklerin azaldığı görülmüştür (Im ve diğ., 2017).

Birçok çalışmada HSP'lerin tümör hücrelerinin korunmasında sahip olduğu roller gösterildikten sonra; HSP aşılari, anti-kanser ilaçları ile HSP inhibitörü kombinasyonları, eksozom yüzeyindeki stimulantlar olarak HSP'ler, gen modifikasyon teknolojileri gibi çeşitli yeni stratejiler, gliomalara kazandırdığı avantajların üstesinden gelmek için kullanılmaktadır.

2.5. CRISPR/CAS9

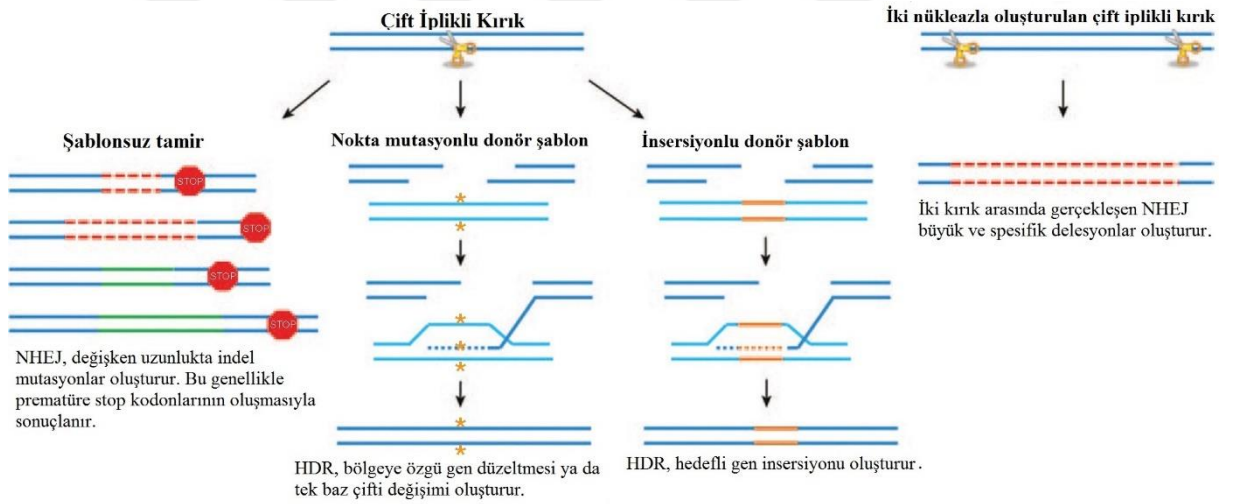
Canlı organizmalarda genomun düzenlenmesi (“Genome Editing”) fikri, endojen hücresel onarım mekanizmalarının hücrenin genomunda yapılan eksojen değişiklikler sonrasında kullanılabileceğinin keşfedilmesiyle ortaya çıkmıştır (Komor ve diğ., 2017). 1960’lı yılların ortalarında restriksiyon ve modifikasyon mekanizmalarının da açıklığa kavuşturulmasıyla bu iki hücresel yolak bir araya getirilerek günümüz genetik mühendisliğinin temelini oluşturmuştur (Arber, 2012). 2018 yılında insan genomundaki yaklaşık 22.000 genden, 3.000’den fazlasının mutasyonu, hastalık fenotipleri ile ilişkilendirilmektedir (<http://www.omim.org/statistics/geneMap>). Bu bulgu, genom düzenlemelerinden yola çıkılarak oluşturulan gen terapilerinin insan hastalıklarında kullanım potansiyelinin incelenmesi düşüncesini beraberinde getirmiştir. Daha sonraları ise gen terapi uygulamaları başlatılmış ve kısa zaman diliminde oldukça büyük bir ilerleme kaydedilmiştir.

2.5.1. Gen Düzenleme Mekanizmalarının Temeli

Söz konusu endojen hücresel onarım mekanizmalarının uyarılmasını sağlayan temel etmen DNA çift iplik kırıklarının ("Double Strand Breaks", DSBs) oluşmasıdır. DSB’ler kendiliğinden gelişebilmekle birlikte, hedefli DNA hasarı ile de indüklenebilmektedir. DNA’da meydana gelen bu kırılmalar genellikle homolog rekombinasyonları da kapsayan homoloji yönlendirmeli tamir ("Homology-directed repair", HDR) veya homolog olmayan uç birleşmesi ("Non-homologous end-joining", NHEJ) olarak adlandırılan iki ana yoldan (Şekil 2.11) biri ile onarılmaktadır (Takata ve diğ., 1998).

NHEJ onarımının hücre döngüsü boyunca meydana geldiği düşünülmekle birlikte, G1 fazı sırasında baskın olarak gözleendiği bildirilmiştir. Birkaç istisna dışında NHEJ’de yer alan enzimlerin çoğu, hücre döngüsüne özgü bir ekspresyon paterni segilememektedir. NHEJ’nin aksine HDR, en çok S ve G2 fazlarında belirgindir. Bu farklılığın, HDR’ye dahil olan enzimlerin hücre döngüsüne bağlı anlatımı sonucu oluştuğu düşünülmektedir. S / erken G2 fazları sırasında, kardeş kromatid onarım için şablon olarak hizmet edebilirken, G1 fazında bir şablon olmamasının onarım mekanizması olarak NHEJ yolağının seçilmesine sebep olduğu öne sürülmüştür (Zaboikin ve diğ., 2017).

HDR, homolog bir sekansın kırılmış ipliğın ucuna invazyonuna ve daha sonra şablona bağılı bir şekilde kopmanın onarılmasına dayanmaktadır. Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışma, memeli hücrelerinde homolog rekombinasyon yoluyla gen hedeflemesinin, hedef bölgede DSB'ler oluşturularak birkaç diziye kadar stimüle edilebileceğini göstermiştir (Szostak ve diğ., 1983; Smih ve diğ., 1995). Ancak NHEJ onarım yolağı genellikle hataya eğilimlidir ve tamir sırasında kırıkların bulunduğu bölgelerde insersiyon ve/veya delesyonlara (indel mutasyonlara) neden olmaktadır. Hedefe özgü DSB'ler tarafından NHEJ'nin uyarılması, bu indellerden yararlanarak gende çerçeve kayması mutasyonlarını oluşturmaktadır. Bu mekanizmadaki hata sonucu oluşan mutasyonlar çeşitli hücre tipleri ve organizmalarda hedef genleri bozmak için kullanılmasına olanak sağlamıştır (Lieber, 2003). Böylece hücrenin endojen DNA tamir mekanizmalarını kullanabilme yeteneğı sayesinde, gen mühendisliğı teknolojileri mümkün hale gelmiştir.



Şekil 2.11: DSB onarımı için kullanılan hücresel tamir yollarının hedefli mutagenез için kullanımı (Maeder and Gersbach, 2016).

Bu gen düzenleme yöntemlerinden herhangi birini uygulamak için gerekli kritik unsur, hedeflenen bir DSB'nin hücreye sunulmasıdır. Günümüzde bölgeye özgü DSB'leri uyarmak için dört ana platform kullanılmaktadır: çinko parmak nükleazları ("Zinc Finger Nucleases", ZFNs), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör ("Transcription Activator-Like Effector", TALE)- nükleazlar (TALENs), meganükleazlar ve son olarak keşfedilen CRISPR / Cas sistemi.

2.5.2. CRISPR/Cas9 Teknolojisi

1987 yılında Ishino ve arkadaşları, *Escherichia coli* bakterisinin genomunda bilinmeyen fonksiyona sahip olağandışı DNA tekrarlarının varlığını keşfettiler (Ishino ve diğ., 1987). Daha sonra, Mojica ve arkadaşları aynı tipteki tekrarları diğer mikroorganizmalarda tanımladılar ve bunları Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”, CRISPR) olarak adlandırdılar (Mojica ve diğ., 2000). Çeşitli mikrobiyal türlerde CRISPR sistemlerini araştıran onlarca yıllık çalışmaların ardından, yabancı nükleik asitlerin kısa dizilerinin CRISPR lokuslarına dahil edildiği bir mekanizma saptandı. 2012 yılında Doudna ve arkadaşlarının yürüttüğü araştırmalarda CRISPR sekanslarının, plazmid ve virüs DNA'larını Cas (“CRISPR Associated”) nükleazları ile keserek viral patojenleri yok eden adaptif bir prokaryotik bağışıklık savunması görevi gördüğü ortaya çıkarıldı. Böylece sistemin Şekil 2.12’de verilen ana bileşenleri açıklığa kavuşturulmuş oldu (Jinek ve diğ., 2012).

CRISPR/Cas9 platformunda; CRISPR RNA’ların (crRNA), trans-aktive edici crRNA’lar (tracrRNA) ile birlikte oluşturduğu RNA dizileri işlendikten sonra, Tip II CRISPR nükleaz sistemi için gerekli olan Cas9 proteini ile birleşerek baz eşleşmesine dayalı spesifik DNA bağlanmasını gerçekleştirmektedir (Han ve She, 2017). Üç bileşenli bu sistem olgun crRNA ve tracrRNA bileşenlerinin tek bir kılavuz RNA (“guide RNA”, gRNA) halinde füzyon hale getirildiği *in vitro* çalışmalar sonucunda iki bileşenli bir versiyona indirgenmiştir. Dahası, Cas9/gRNA kompleksinin yeni bölgelere hedeflenmesinin, gRNA’nın kısa bir kısmının dizisini değiştirerek mümkün olabildiği gösterilmiştir (Cho ve diğ., 2013; Jinek ve diğ., 2013).

Bu sistemde gerçekleşen RNA: DNA hibridizasyonu, crRNA’nın 20 baz çiftlik tamamlayıcı hedef DNA dizisini (“protospacer”) tanımasıyla gerçekleşir (Wiedenheft, 2012). CRISPR/Cas9 sisteminin dizi sınırlaması, hedef bölgeye 3' ucundan yerleştirilmiş bir protospacer ilişkili motif (“Protospacer-Adjacent Motif”, PAM) gerekliliğinden kaynaklanır. PAM dizisi, kullanılan Cas9’un türüne özgüdür. Örneğin, 5'-NGG-3' bazlarını içeren PAM dizisi çalışmalarda yaygın olarak kullanılan *Streptococcus pyogenes*'den elde edilen Cas9’un DNA’ya bağlanması ve kesim aktivitesini gösterebilmesi için gereklidir (Sternberg ve diğ., 2014). crRNA dizisinin başında bulunan çift iplikli yapıdaki tracrRNA dizisi, Cas9 proteinine bağlanarak endonükleazı hedef diziye yönlendirme işlevini üstlenir. Sonuçta Cas9 PAM dizisinin başından çift iplikli hedef DNA’da DSB oluşturarak yarıklanmayı (“cleavage”) gerçekleştirir (Fu ve diğ., 2014).

Başka bir örnekte, Pankowicz ve arkadaşları, CRISPR/Cas9 sisteminin, farelerde kalıtsal tirozinemiği tedavi etmek için tirozin degradasyonunda gerekli bir gen üzerindeki mutasyonu düzeltmede kullanılabileceğini göstermiştir (Pankowicz ve diğ., 2016). Duchenne kas distrofisi araştırmalarında, kas liflerinin rollerine katkıda bulunan proteinleri kodlayan genler üzerindeki mutasyonları düzeltmek için CRISPR/Cas9 kullanılmıştır. Long ve arkadaşları tarafından, mdx fare modellerinde distrofin gen mutasyonunu düzeltmek için bu teknoloji uygulanmıştır (Long ve diğ., 2014). Enfeksiyöz hastalıklarda ise, CRISPR/Cas9 teknolojisi, AIDS'in tedavisi için HIV'i hedeflemede kullanılmıştır. 2014 yılında, Ye ve arkadaşları HIV enfeksiyonunu tedavi etmek için yeni bir kök hücre tedavisi önermek için çalışmıştır. Aynı yıl Hu ve arkadaşlarının, HIV-1 genomunu ortadan kaldırmak için kullandıkları CRISPR/Cas9 sistemini, iki yıl sonra, Kaminski, latent enfekte T hücrelerinden (CD4⁺) HIV-1'in genomunu ortadan kaldırmak için kullanmıştır (Soriano, 2018).

CRISPR'nin ilk uygulamalarından biri günümüzde büyük kitlelere yayılmış olan ve son yılların en çok dikkat çeken hastalıklarından biri olarak karşımıza çıkan kanserde gerçekleştirilmiştir. 2017 yılında yapılan bir çalışmada CRISPR/Cas9 ile modifiye edilmiş insan adipoz mezenşimal kök hücrelerin ("human adipose mesenchymal stem cells", hAMSC), hücre kültürlerinde ve canlı bir glioblastoma tümör modelinde tümör hücrelerinin öldürülmesi için gansiklovir varlığında etkili olduğu keşfedilmiştir (Meca-Cortés ve diğ., 2017). CRISPR/Cas9, kimerik antijen reseptörü T (CAR-T) hücrelerinin ve programlanmış hücre ölüm proteini 1'in genetik susturulması ile terapötik immün hücrelerin üretimine katkıda bulunarak kanser immünoterapisinde yeni bir strateji olarak kabul edilmektedir (Xia ve diğ., 2018). Şu anda Çin'de çalışılmakta olan ilk ve en gelişmiş CRISPR klinik denemelerinden biri, özofagus kanseri hastalarda bu yeni gen düzenleme aracının potansiyelini test etmektedir. Test edilen tedavide hastadan çıkarılan T hücreleri, CRISPR kullanılarak, bazı tümörlerin bağlandığı ve bağışıklık sistemini engelleyici talimat veren programlı hücre ölüm proteini-1 ("Programmed cell death protein-1", PD-1) adlı bir reseptörü kodlayan geni knock-out etmek için modifiye edilmektedir. Daha sonra tedavi, bu hücrelerin hastalara geri verilmesiyle bağışıklık sisteminin güçlendirilmesini hedeflemektedir (Zhao ve diğ., 2018). Pek çok yeni tedavi stratejisi denenmiş olmasına rağmen, gliomaların karmaşıklığı bu çabaları engellemiştir ve bu araştırmacıları hastalığın ortaya çıkardığı zorlukların üstesinden gelen yeni stratejilere başvurmaya itmektedir. CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi gibi yeni nesil terapiler, bu karmaşıklığın üstesinden gelmede bir çözüm sunmaktadır (Cai ve Sughrue, 2017).

3. MALZEME VE YÖNTEM

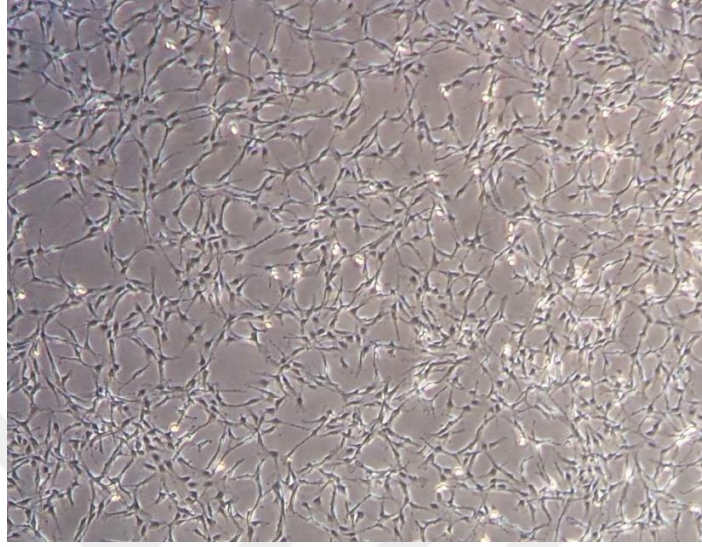
3.1. HÜCRELER VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Tez kapsamında kullanılmak üzere seçilen insan malignant glioma hücre hattı U87-MG, bölümümüz bünyesinde bulunan Hayvan Doku Kültürü laboratuvarı hücre koleksiyonundan sağlandı.

U87-MG hücreleri sodyum pirüvat ve HEPES [4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit] içermeyen, L-Glutamin ve D-glukoz (dekstroz, 4.5 g/L) açısından zengin DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”) / High Glucose (Gibco™) ile kültüre edildi. Hazırlanan besiyeri içeriğinde ek olarak %10 FBS (“Fetal Bovine Serum”), %1 antibiyotik-antimikotik solüsyonu [Penisilin (100 U/mL), Streptomisin (100 µg/mL), Amfoterisin B (0.25 µg/mL)] ve %1 NEAA (“Non-Essential Amino Acids”) bulunmaktadır. Hücreler için gereken optimum inkübasyon koşullarının oluşturulmasında ise %90 bağıl nem ve %5 CO₂ sağlayan 37°C’lık etüv (Heracell™ 150i, Thermo Scientific™) kullanıldı.

Hücrelerin altkültürlemesi için T-25 (25 cm²’lik) steril hücre kültür kapları kullanıldı ve tüm işlemler laminar hava akımlı steril kabinde (HFsafe-1200, Heal Force) gerçekleştirildi. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştığında, kültür kabındaki besiyeri tabana tutunan hücre tabakasına zarar verilmeden uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyini nötralizasyonu engelleyen besiyeri kalıntılarından temizlemek üzere, hücre içi ozmotik dengeyi ve pH’ı koruyan 5 mL (~0.2 mL/cm²) steril PBS (“Phosphate Buffered Saline”, 9.6 g/L, pH 7.2) eklendi. Yıkama işleminden sonra PBS dökülerek hücreleri kültür kabı yüzeyinden kaldırmak ve hücre agregatlarını birbirlerinden ayırmak için 1 mL (~0.05 mL/cm²) Tripsin-EDTA [%0.2 (w/v) Tripsin, %0.04 (w/v) EDTA (etilendiamintetraasetik asit), PBS içerisinde hazırlandı] ilave edildi ve hücreler enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C’lık etüvde yaklaşık 2 dakika bırakıldı. Hücrelerin yüzeyden tamamen ayrılması sağlandıktan sonra 5 mL (~0.2 mL/cm²) besiyeri eklenerek enzim aktivitesi inhibe edildi ve pipetaj ile hücrelerin besiyerinde homojenizasyonu gerçekleştirildi. Kültür kabındaki süspanse hücre sayısı hemositometre yardımıyla belirlendi. Altkültürleme için istenilen miktarda hücre (standart olarak 1x10⁵ hücre/mL seçildi) alınarak yeni bir kültür kabına aktarıldı ve toplam hacim taze besiyeri ile 8 mL’ye tamamlanarak kültür kabı etüve kaldırıldı. Altkültürleme işlemi 3 günde bir tekrar edilerek hücre kültürünün canlı kalması sağlandı.

Başlangıç hücre sayısı 1×10^5 hücre/ml olan 2 günlük U87-MG hücrelerinin invert mikroskoptaki (Eclipse Ti-E, Nikon) görüntüsü Şekil 3.1’de verildi.



Şekil 3.1: Başlangıç hücre sayıları 1×10^5 hücre/mL olan 2 günlük U87-MG hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü (10X büyütme).

3.2. HÜCRELERİN ÇOĞALMA EĞRİSİNİN OLUŞTURULMASI

Tez çalışmasında kullanılacak U87-MG hücre hattının jenerasyon süresini hesaplayabilmek amacıyla hücreye ait çoğalma eğrisi oluşturuldu. Bunun için hücreler başlangıç sayıları 0.5×10^5 ve 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde 24 kuyucuklu steril kültür kaplarına ekildi. Ekimi takip eden 10 gün boyunca her gün, kültürün başlatıldığı saatte hücrelerin sayımı yapıldı. Bunun için altkültürleme prosedürüne benzer şekilde PBS ile yıkanan hücreler, Tripsin-EDTA ile süspanse hale getirildi ve 1:1 (v/v) oranında tripan mavisini (%0.4 w/v, PBS içinde hazırlandı) ile karıştırılarak ölü hücrelerin boyanmaları sağlandı. Hemositometrede tripan mavisini ile boyanmayan hücrelerin sayımı yapılarak 1 mL besiyerinde bulunan canlı hücre sayısı belirlendi (Fershney, 2000). Sayımlar 3 tekrarlı olarak yapıldı. Alınan veriler doğrultusunda oluşturulan, absisin zamanı (gün), ordinatın hücre sayılarını gösterdiği lineer-logaritmik çoğalma eğrisine göre hücrelerin lag fazı, log fazı, durağan faz ve ölüm fazına girdiği zamanlar saptandı. Çoğalma eğrisinin çizimi GraphPad Prism® 7.0 programında gerçekleştirildi ve istatistiksel değerlendirmede tek-yönlü ANOVA testi kullanıldı.

Elde edilen çoğalma eğrilerine ait veriler kullanılarak aşağıda ifade edilen formüllere (Formül 3.1 ve Formül 3.2) göre hücrenin jenerasyon sayısı ve süresi hesaplandı:

$$n = (\log N_2 - \log N_1) / \log 2 \quad (\text{Formül 3.1})$$

$$St = (T_2 - T_1) / n \quad (\text{Formül 3.2})$$

n : Hücrenin jenerasyon sayısı

N1 : Logaritmik bölünme fazının başlangıcındaki hücre sayısı

N2 : Logaritmik bölünme fazının sonundaki hücre sayısı

St : Hücrenin jenerasyon süresi

T1 : Logaritmik bölünme fazının başlangıç zamanı

T2 : Logaritmik bölünme fazının bitiş zamanı

3.3. SİTOTOKSİK ANALİZLER

Yapılan birçok çalışmada HSF1 regülasyonunda etkisi olduğu gösterilen kersetinin (Nagai, Nakai ve Nagata, 1995) U87-MG hücrelerindeki sitotoksik etkileri, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum) yöntemi ile belirlendi. Yöntemin temeli proliferasyona uğrayan hücrelerde artan mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi ile MTT molekülündeki tetrazolyum halkasının kopması sonucu MTT'nin suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşmesi ve oluşan bu kristallerin DMSO'da (dimetil sülfoksit) çözündürülerek 540 nm dalga boyundaki absorbansının spektrofotometrede kolorimetrik ölçülmesine dayanmaktadır.

Kersetinin U87-MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini saptamak amacıyla 96 kuyucuklu steril kültür kaplarına her bir kuyucukta 0.5×10^5 hücre/mL konsantrasyonda hücre bulunacak şekilde 200 μ L hücre süspansiyonundan ekim yapıldı. Kültür kapları 24 saat boyunca standart inkübasyon koşullarında etüve bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklarda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Kersetin (Santa Cruz Biotechnology) stok solüsyonu 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde DMSO (Merck) içinde çözündürülerek hazırlandı. Daha sonra hazırlanan stok solüsyonu besiyeri kullanılarak 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150 ve 200 μ M konsantrasyonlarında dilüe edildi. Kontrol grubu hücrelerine 200 μ L taze besiyeri eklenirken, deney grubu

hücrelerinin üzerine ise seri dilüsyonlar halinde hazırlanan kersetin konuldu. DMSO'dan kaynaklanan sitotoksik etkiyi bertaraf etmek amacıyla %0.25, %0.5, %0.75, %1 (v/v) oranlarında DMSO besiyeri ile karıştırılarak hücrelere uygulandı. Tüm kültür kapları inkübatöre konuldu. Ajanların uygulanmasını takiben 48. saatte hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 30 µL MTT (Serva) stok çözeltisi (5 mg/mL, PBS içinde hazırlandı) eklenip, hücreler 4 saat etüvde bekletildi. İnkübasyon sonunda oluşan formazan kristallerinin çözünmelerini sağlamak amacıyla her bir kuyuya 150 µL DMSO konularak, çözelti homojen hale gelene kadar kültür kabı 37°C'da çalkalandı (150 devir/dakika, Unimax 1010, Heidolph). Oluşan renkli ürünün 540 nm dalga boyundaki absorbansı mikropate okuyucuda (EON, BioTek Instruments Inc.) ölçüldü. Alınan değerler kontrol grubu hücrelerden alınan değerlerle karşılaştırıldı ve hücre proliferasyon hızı aşağıda verilen formüle (Formül 3.3) göre hesaplandı:

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Deney grubu hücrelerin absorbansı}}{\text{Kontrol grubu hücrelerin absorbansı}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.4. GENETİK SUSTURMA

Tez kapsamında seçilen genetik susturma yöntemi CRISPR/Cas9 platformunun optimizasyonu için U87-MG hücrelerinin farklı hücre kültür kaplarında farklı sayılarda ekimi gerçekleştirildi (Tablo 3.1). Hücrelerin ekim işlemleri, kullanılan hücre türüne göre literatürde transfeksiyon etkinliğinin en verimli olduğu belirlenen miktarlarda, transfeksiyondan 1 gün önce yapıldı.

Tablo 3.1: Her bir kuyucuk için ekilen hücre miktarı ve kuyucuklardaki son besiyeri hacmi.

	24 kuyucuklu kültür kabı	6 kuyucuklu kültür kabı
Hücre Yoğunluğu	0.5x10 ⁵ hücre	2x10 ⁵ hücre
Besiyeri Hacmi	0.5 mL	2 mL

Ekim işlemini takiben geçen 24 saat sonunda, hücrelerin transfeksiyon için ihtiyaç duyulan hücre sayısına (%30-70 konfluentliğe) ulaştığı gözlemlendi.

CRISPR/Cas9 tekniği ile genetik susturma işlemi 2 basamaklı olup, aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirildi.

- CRISPR/Cas9 tekniğinin temelini oluşturan ve DNA’da çift iplikli kesim işlemini gerçekleştiren bir endonükleaz olan Cas9 proteini (TrueCut™ Cas9 Protein v2, Invitrogen), sentetik olarak üretilen ve hedeflenen diziye özgü tek iplikli rehber RNA “single guide RNA, sgRNA” (TrueGuide™ Synthetic gRNA Modified, Invitrogen), bileşenlerin hücreye alınmasını sağlayan ve lipid aracılı bir transfeksiyon ajanı Lipofektamin (Lipofectamine™ Cas9 Plus™ Reagent, Invitrogen) besiyeri ortamında (Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium, Gibco) Tablo 3.2’de verilen miktarlarda karıştırılarak “Tüp 1” hazırlandı.

Tablo 3.2: “Tüp 1” karışımının içeriği.

REAKTİFLER	24 kuyucuklu	6 kuyucuklu
Opti-MEM™ I Medium	25 µL	125 µL
Cas9 protein	1250 ng (7.5 pmol)	6250 ng (37.5 pmol)
sgRNA	240 ng (7.5 pmol)	1200 ng (37.5 pmol)
Lipofectamine™ Cas9 Plus™ Reagent	2.5 µL	12.5 µL

- CRISPR/Cas9 ticari ekipmanlarını üreten firmaya sentezlettirilen liyofilize haldeki sgRNA’ların dizi bilgileri Tablo 3.3’te verildi. Rehber RNA’lar kullanılmadan önce 4000xg hızda santrifüj edildi ve üzerine steril 1X TE “Tris-EDTA” Tamponu (1 M Tris, 0.5 M EDTA, dH₂O içinde hazırlandı, pH 8.0) eklenerek 100 µM (100 pmol/µL) konsantrasyonlarında stok sgRNA solüsyonları hazırlandı. Tüp içerisinde bulunan oligolar karıştırılarak (Velp Scientifica) resüspanse edildi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan sgRNA stokları -20°C’lık derin dondurucuda saklandı.

Tablo 3.3: CRISPR/Cas9 ile HSF1 genini susturmak amacıyla tasarlanan sgRNA'lar.

	ID	SEKANS	MİKTAR
sgRNA-1	CRISPR1037863_SGM	AGCTTCCACGTGTTTCGACCA	3 nmol
sgRNA-2	CRISPR1037865_SGM	TATGTCTTCACTCTTCAGGG	3 nmol

- CRISPR/Cas9 işleminin ikinci basamağında Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Transfection Reagent, taze Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium içerisinde Tablo 3.4'te verilen oranlarda dilüe edilerek “Tüp 2” hazırlandı ve mikro tüp oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.4: “Tüp 2 karışımının içeriği.

REAKTİFLER	24 kuyucuklu	6 kuyucuklu
Opti-MEM™ I Medium	25 µL	125 µL
Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Transfection Reagent	1.5 µL	7.5 µL

- Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Transfection Reagent içeren “Tüp2”, sgRNA/Opti-MEM™ I solüsyonunu içeren “Tüp 1”e eklenerek pipetaj yardımıyla karıştırıldı. Hazırlanan transfeksiyon kompleksi 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Son olarak her bir kuyucuktaki hücrelere, 24 kuyucuklu kültür kaplarında 50 µL, 6 kuyucuklu kültür kaplarında 250 µL olacak şekilde Cas9 protein/sgRNA/transfeksiyon reaktifi kompleksi uygulandı. Hücreler optimum kültür koşullarında 2 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon ardından hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücre yüzeyleri 500 µL PBS ile yıkandı. 500 µL Trypsin-EDTA ile hücreler kültür kabı yüzeyinden kaldırıldıktan sonra, yine 500 µL DMEM/High Glucose ile nötralizasyon sağlandı. Hücre agregatları pipetajla ayrıştırıldıktan sonra hücreler 300xg hızda 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen hücre pelleti Bölüm 3.1’de anlatılan rutin kültürlenme işlemlerine ya da Bölüm 3.7’de verilen hücre toplama protokollerine tabi tutuldu (Önay-Uçar, 2009).

3.5. HÜCRELERE KERSETİN UYGULANMASI

Kersetinin hücrelerdeki stres proteinlerinin anlatımı üzerine farklı etkileri olduğu bilinmektedir. U87-MG hücrelerine, sitotoksik analizler sonucu seçilen dozlarda kersetin uygulaması yapıldı. Bu amaçla öncelikle 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 0.5×10^5 hücre/mL olacak şekilde hücre ekimi yapılarak kontrol ve deney grupları oluşturuldu. Kültür kapları 24 saat süreyle normal inkübasyon koşullarında etüvde tutuldu. İnkübasyonu takiben kontrol grubu hücreleri üzerindeki besiyeri tazelendi. Deney grubu hücrelerine ise sitotoksik analizler sonucu %100 hücre canlılığını koruduğu belirlenen 2 μ M kersetin, literatürde stres proteinleri anlatımını anlamlı şekilde değiştirdiği gösterilen %70 hücre canlılığını sağlayan 10 μ M ve %60 hücre canlılığını sağlayan 30 μ M kersetin içeren besiyerleri eklendi. 48 saatlik inkübasyon sonrası hücreler Bölüm 3.7’de anlatıldığı şekilde toplandı.

3.6. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Tez kapsamında U87-MG hücrelerine CRISPR/Cas9 yöntemi ile HSF1 gen susturumu ve HSF1 inhibitörü olarak kersetin uygulaması yapıldı. Bu doğrultuda oluşturulan deney ve kontrol grupları Tablo 3.5’te verildi.

Tablo 3.5: Çalışmalarda oluşturulan deney grupları ve bu gruplara ait açıklamalar

ADLANDIRMA		GRUPLARA AİT AÇIKLAMALAR
Kontrol Grubu	K	Herhangi bir uygulama yapılmayan grup
Deney Grubu 1	1	2 μ M Kersetin uygulanan grup (%100 hücresel canlılık sağlayan doz)
	2	10 μ M Kersetin uygulanan grup (%70 hücresel canlılık sağlayan doz)
	3	30 μ M Kersetin uygulanan grup (%60 hücresel canlılık sağlayan doz)
Deney Grubu 2	4	sgRNA-1 ile CRISPR/Cas9 uygulanan grup
	5	sgRNA-2 ile CRISPR/Cas9 uygulanan grup

3.7. HÜCRELERİN TOPLANMASI

Bölüm 3.4 ve Bölüm 3.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen kersetin ve CRISPR/Cas9 uygulamalarının ardından 6 kuyucuklu kültür kaplarından hücreler toplandı. Öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücre yüzeyi 2 mL PBS (~ 0.2 mL/cm²) ile yıkandı. Ardından hücrelerin üzerine 0.5 mL Tripsin-EDTA (~ 0.05 mL/cm²) çözeltisi eklendikten sonra hücreler 2 dakika 37°C'lık etüvde tutuldu ve pipetaj yardımıyla hücreler süspanse edildi. Tripsinin aktivitesini sonlandırmak için 2 ml DMEM/High Glucose eklenerek (~ 0.2 mL/cm²) tekrar pipetaj yapıldı. Besiyerinde homojen hale getirilen hücreler steril deney tüplerine alındı ve oda sıcaklığında 3000xg hızda 5 dakika santrifüjlenerek (NF 400, Nüve) hücrelerin çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet olarak bulunan hücreler 2 mL soğuk PBS içinde yeniden süspanse edilerek aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi. PBS ile yıkama işlemi toplamda 2 kez tekrarlanarak hücrelerin besiyerinden tamamen arınması sağlandı. Kültür kaplarından toplanan hücreler kullanılıncaya kadar -70°C'da saklandı.

3.8. HÜCRE LİZATLARININ HAZIRLANMASI

Kontrol ve deney grubu hücreler, 150 µL soğuk (4°C) parçalama tamponu [1 mM PMSF (fenilmetilsülfonil florür, AppliChem), %0.04 (w/v) EDTA, %1 (v/v) Triton X-100 (Merck), proteaz inhibitör kokteyli (1 tablet/50 mL, Roche) ve 0.02 M Tris-HCl (pH 6.8, AppliChem)] eklenerek kimyasal parçalamaya; 1 mL'lik steril insülin enjektörü ve ultrasonikatör kullanılarak mekanik parçalamaya tabi tutuldu. Mekanik parçalama işlemi, 5 kez tekrarlanan enjektöre çekip-bırakma, 20 saniye ultrasonik su banyosu (Daihan WUC-D10H, WiseClean) ve 20 saniye buz içinde tutulmayı kapsayan periyotlarla sağlandı. Homojenat 4°C'da 20000xg hızda 20 dakika santrifüj edildi (Sigma 3-30K). Süpernatant fazında bulunan suda çözünebilen proteinler ileri analizlerde kullanılmak üzere -70°C'da saklandı.

3.9. PROTEİN KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ

Çalışmada kullanılan kontrol ve deney grubu hücrelerinden protein izolasyonu sonucu elde edilen total hücresel protein konsantrasyonu BCA (Bikinkoninik Asit) testi ile spektrofotometrik olarak tayin edildi. BCA testinin çalışma prensibi, proteinlerin bir alkali solüsyonda Cu⁺² iyonlarını Cu⁺¹ iyonlarına indirgemesi (biüret reaksiyonu) ve bikinkoninik asit ile mor renkli bir bileşik oluşturmaya dayanır (Smith ve diğ., 1985). Bakırın indirgenmesi

esas olarak protein moleküllerinde bulunan sistein, sistin, tirozin ve triptofan kalıntılarından kaynaklanır. Peptid omurgasını temel almasından dolayı reaksiyondan elde edilen renk kararlıdır ve protein bileşim farklılıklarından kaynaklanan değişkenliği minimize etmeyi sağlamaktadır. Reaksiyonun tek basamaklı gerçekleşmesi de BCA testini benzerlerine göre üstün kılmaktadır.

Protein konsantrasyon tayini ticari bir kit olan SMART™ BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology) protokolüne göre gerçekleştirildi. Tayin işleminden önce kit içeriğinde bulunan stok BSA (“Bovine Serum Albumin”, Sığır Serum Albümini) protein standardı belirlenen oranlarda (25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL) dH₂O ile seyreltilerek hazırlandı. Ardından protein konsantrasyonu belirlenecek örnekler ve örnekleri çözmede kullanılan tampon (“blank”) 5 kat dH₂O ile seyreltildi. Çalışma için gereken toplam belirteç hacmine göre kit içeriğinde bulunan reaktifler (50: 1 v/v, Reaktif A: B) karıştırılarak BCA belirteci hazırlandı. 96 kuyucuklu mikropate ölçümü için her bir kuyucuğa 200 µL BCA belirtecinden konuldu. Örnek ve belirteç oranı 1:8 olacak şekilde seyreltilmiş örneklerden, kör örnekten ve BSA standartlarından 25 µL kuyucuklardaki BCA belirtecinin üzerine eklendi. Örneklerin homojen olarak karışması için mikropate bir dakika çalkalandı (Unimax 1010, Heidolph), ardından 37°C’lık etüvde (Heracell™ 240, Thermo Scientific™) 30 dakika bekletildi. Süre sonunda oluşan renkli ürünün 562 nm dalga boyundaki absorbansı mikropate okuyucuda (EON, BioTek Instruments Inc.) ölçüldü ve kör örnek absorbansı, örnek absorbansından çıkarılarak gerçek absorbans değerleri elde edildi. Tüm örnekler ve standartlar 3 tekrarlı olarak analiz edildi. BSA standartlarına ait absorbans değerleri kullanılarak standart bir grafik oluşturuldu. Standart grafikten elde edilen doğru denklemi ile protein örneklerine ait konsantrasyonlar hesaplandı.

3.10. DENATÜRE JEL ELEKTROFOREZİ

Hücrel proteinlerin denatüre jel elektroforezi (“Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”, SDS-PAGE) ile ayrıştırılmasında Walker (2002) tarafından önerilen yöntem uygulandı. Proteinlerin SDS-PAGE ile analizinde mini jel elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) kullanıldı. Jelin döküleceği elektroforez kaseti hazırlanmadan önce camlar (1.0 mm “spacer plates”, 1.0 mm “short plates”), taraklar (1.0 mm) ve contalar %70’lik etanol ile temizlendi. Jel kaseti sistemin prosedürüne uygun olarak yerleştirilerek hazırlandı. İşlem sırasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.6’da, jellerin hazırlanması sırasında kullanılan çözelti oranları Tablo 3.7’de verildi.

Tablo 3.6: SDS-PAGE işlemlerinde kullanılan çözeltiler.

ÇÖZELTİLER	BİLEŞENLERİ
%30 Akrilamid Çözeltisi	Akrilamid..... 30 g Bis-Akrilamid..... 0.8 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz..... 45.43 g 3 N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH 6.8)	Trizma-Baz..... 14.54 g 3 N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	SDS..... 10 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
%10 Amonyum Persülfat (APS)	APS..... 1 g dH ₂ O ile son hacim 10 mL'ye tamamlandı.
1X Yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3)	Tris..... 3.03 g Glisin..... 14.4 g SDS..... 1 g dH ₂ O ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
2X Örnek yükleme tamponu	0.6 M Tris-HCl (pH 6.8)..... 5 ml SDS..... 0.5 g Sukroz..... 5 g β-Merkaptoetanol..... 0.25 ml Bromofenol mavisi (% 0.5 stok)..... 5 ml dH ₂ O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Tablo 3.7: SDS-PAGE için kullanılan ayırma ve yükleme jellerinin 1 jele göre içerikleri ve oranları.

İÇERİKLERİ	Ayırma Jeli (%10 Akrilamid)	Yükleme Jeli (%5 Akrilamid)
Tris-HCl (1.875 M, pH:8.8)	1 mL	-
Tris-HCl (0.6 M, pH:6.8)	-	250 µL
dH ₂ O	2,262 mL	1,875 mL
%30 Stok Akrilamid Çözeltisi	1,662 mL	337,5 µL
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	50 µL	25 µL
%10 Amonyum persülfat (APS)	25 µL	12,5 µL
TEMED	1,75 µL	3,5 µL

Öncelikle %10'luk ayırma jeli Tablo 3.7'de belirtilen oranlarda tamponlar kullanılarak hazırlandı ve kasetlere döküldü. Polimerizasyonu engelleyen oksijenle jelin temasını kesmek için jel yüzeyi yaklaşık 1 mL dH₂O ile kapatıldı. Polimerizasyonun ardından yüzeydeki su uzaklaştırıldı ve %5'lik yükleme jeli hazırlanarak, polimerize olan ayırma jelinin üzerine döküldü. Kasetin üst kısmına taraklar yerleştirilerek örnek yükleme kuyularının oluşması sağlandı. Polimerizasyon sonunda jel kasetleri elektroforez tankına yerleştirildi ve 1X Yürütme tamponu ile tank üzerinde belirtilen seviyeye kadar dolduruldu.

Örnekler 2:1 (v:v) oranında örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp 3 dakika 95°C'da bekletildikten sonra her bir cepte 40 µg protein olacak şekilde jelin kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez işlemiyle proteinlerin sabit voltajda (200 V) yaklaşık 40 dakika yürütülmesiyle proteinler jel üzerinde ayrıştırıldı.

3.11. WESTERN BLOT ANALİZLERİ

SDS-PAGE ile jelde ayrıştırılan proteinler, Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) aracılığıyla polivinilidin diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Aktarım işleminde kullanılan tamponlar Tablo 3.8’de verildi.

Tablo 3.8: Western Blotting ve Stripping işlemleri için kullanılan çözeltiler.

ÇÖZELTİLER	BİLEŞENLERİ
10X Towbin Transfer Tamponu	Trizma-Baz..... 30.3 g Glisin..... 144 g dH ₂ O ile son hacim 1 L’ye tamamlandı.
1X Towbin Transfer Tamponu	10X Towbin Transfer Tamponu..... 100 mL Metanol..... 200 mL dH ₂ O ile son hacim 1 L’ye tamamlandı.
TBST Tamponu	Trizma-Baz (20 mM, pH 7.5)..... 2.42 g NaCl (150 mM)..... 8.77 g Tween-20 (%0.1)..... 1 mL dH ₂ O ile son hacim 1 L’ye tamamlandı.
Stripping Tamponu	%10 SDS 20 mL 0.5 M Tris-HCl (pH:6.8) 12.5 mL Ultrasaf su 67.5 mL 2-merkaptoetanol 0.8 mL

Transfer sisteminin kullanım kılavuzuna göre izlenen adımlarda öncelikle sisteme ait kasetlere 1X Transfer tamponu ile ıslatılan özel transfer kağıtları (0.2 µm Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs, Bio-Rad) yerleştirildi. Transfer kağıtlarının üstüne sırasıyla metanol ile doyurulan PVDF membran ve jel, hava kabarcıkları kalmamasına dikkat edilerek konuldu. En üste tekrar tampon ile ıslatılan transfer kağıtlarından konulduktan sonra aktarım işlemi başlatıldı. Transfer koşulları 2.5 A ve 25 V elektrik akımında 15 dakika olarak belirlendi.

Proteinlerin transfer edildiği PVDF membranlarda protein bulunmayan alanlar kullanılan primer antikorun protokolünde belirtilen yönergeler göre HSF1 için %3.5 (w/v) BSA (%0.05 Tween-20 içeren PBS içinde hazırlandı) ve diğer antikorlar için %5 (w/v) süt tozu (%0.05 Tween-20 içeren PBS içinde hazırlandı) ile 2 saat oda sıcaklığında bloke edildi.

Bloklamanın ardından membran, kullanılan bloklama tamponu içinde uygun oranlarda hazırlanan primer antikorla +4°C’da gece boyu muamele edildi. Protein analizi için primer antikorlar olarak %3.5 BSA içinde hazırlanan HSF1; %5 süt tozunda hazırlanan HSP27, HSP70, HSP90 ve p-HSP27 kullanıldı (Tablo 3.9). Primer antikorla muamele işleminden sonra istenmeyen bağlanmaları ve antikor kalıntıları uzaklaştırmak için membran 1X yıkama tamponu (%0.05 (v/v) Tween-20 içeren PBS) ile 4 kez 15’er dakika düşük devirde çalkalanarak yıkandı. Yine uygun bloklama tamponu içinde hazırlanan sekonder antikorlar (HSF1 için Goat X Rat IgG HRP sekonder antikor, diğer primer antikorlar için Goat X Mouse IgG HRP sekonder antikor) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Membran 1X yıkama tamponu ile 4 kez 15’er dakika olmak üzere tekrar yıkandı.

Antikorların bağlandığı protein bantlarının görüntülenmesi için “Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)” kiti kullanıldı. Kit içerisindeki solüsyonlar 40:1 (v:v, Reaktif A:Reaktif B) oranında karıştırıldı ve bu karışım membran üzerinde 5 dakika bekletildi. Tüm bu işlemler karanlık ortamda gerçekleştirildi. Solüsyonda ilave edilen substratın sekonder antikorda bulunan enzimle reaksiyona girmesi sonucu oluşan ışımayı ölçmek için membran kemilüminesans görüntüleme cihazına (ChemiDoc MP, Bio-Rad) yerleştirildi. Görüntülenen bantların normalizasyonu için membranlara bağlı bulunan antikorlar “stripping” işlemi ile uzaklaştırıldı. Bunun için Tablo 3.8’de verilen miktarlarda hazırlanan “stripping tamponu” 60°C’ye ısıtıldı. İstenen sıcaklığa ulaşan tampon membranların üzerini kaplayacak şekilde döküldükten sonra 60°C’de 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra membranlar önce suda ve ardından TBST tamponunda 4 kez 15’er dakikada bir değiştirilmek üzere çalkalayıcıda yıkandı. %5 süt tozu ile bloklanan membranlar, HRP konjuge GAPDH antikor ile gece boyun +4°C’de muamele edildi. 4 kez 15’er dakikada bir gerçekleştirilen TBST ile yıkama işleminden sonra doğrudan kemilüminesans görüntüleme işlemine geçildi. Alınan membran görüntüleri ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 3.9: İmmünolojik analizlerde kullanılan antikorlar ve özellikleri.

Antikor	Tür ve Sınıf	Dilüsyon	Firma (Katalog #)
HSF1	Rat / Monoklonal	1:500	Invitrogen (MA5-14622)
HSP27	Mouse / Monoklonal	1:1000	Enzo (ADI-SPA-800-F)
HSP70/HSP72	Mouse / Monoklonal	1:1000	Enzo (ADI-SPA-810-J)
HSP90	Mouse / Monoklonal	1:400	Santa Cruz (sc-69703)
p-HSP27 (Ser82)	Mouse / Monoklonal	1:500	Santa Cruz (sc-12923)
Anti-rat IgG HRP Unkonjuge	Goat / Poliklonal	1:2000	Millipore (AP136P)
Anti-mouse IgG HRP Unkonjuge	Goat / Poliklonal	1:5000	Enzo (ADI-SAB-100-J)
GAPDH HRP Konjuge	Mouse / Monoklonal	1:2000	Invitrogen (MA5-15738-HRP)

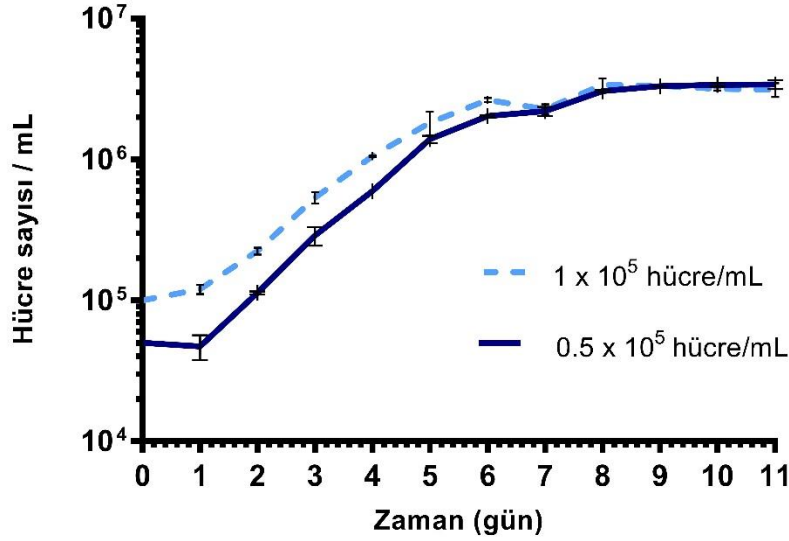
3.12. İSTATİSTİK ANALİZLER

Tez kapsamında yapılan deneyler sonucu alınan sitotoksik ve immünolojik analizlere ait tüm veriler GraphPad Prism® 7.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Grafiklerde gösterilen sonuçlar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığı tek-yönlü ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Anlamlılık sınırı $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. U87-MG İNSAN GLİOMA HÜCRELERİNE AİT BÜYÜME EĞRİSİ

Başlangıç konsantrasyonları 0.5×10^5 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekimi yapılan U87-MG insan glioma hücrelerinin, 11 gün boyunca sayımı gerçekleştirilmiştir. Alınan veriler doğrultusunda oluşturulan büyüme eğrileri Şekil 4.1’de verilen grafikte gösterilmiştir. Elde edilen grafiğe göre her iki hücre için logaritmik faz 1.gün itibariyle başlamış ve 6.güne geçildiğinde sonlanarak, litik evreye geçilmiştir. Bölüm 3.2’de verilen formüller uygulandığında U87-MG insan glioma hücreleri için jenerasyon süresi ortalama 25 saat olarak belirlenmiştir. Hücre popülasyonunun büyüme eğrisi literatürle ve Doğa Bilimleri-Onkoloji Merkezi Biyokaynak Ağı “The Physical Sciences-Oncology Network Bioresource Core Facility (PBCF)” nin belirlediği büyüme grafiğiyle benzer bir profil sergilemektedir.

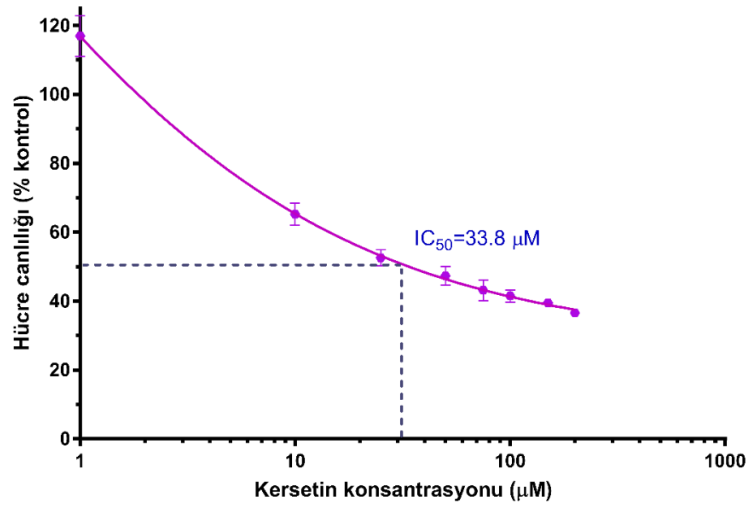


Şekil 4.1: U87-MG hücrelerine ait büyüme grafiği; hücrelerin ekimi 0.5×10^5 ve 1×10^5 hücre/mL olarak gerçekleştirilmiştir; grafik standart sapmaları içermektedir.

4.2. SİTOTOKSİK ANALİZLER

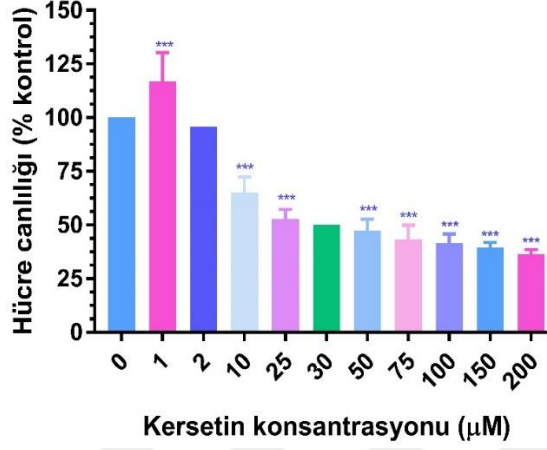
4.2.1. Kersetinin U87-MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Kersetinin U87-MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek ve tez kapsamında uygulanacak dozları seçebilmek amacıyla bir dilüsyon serisi oluşturulmuştur. Bu seri, kersetinin besiyeri kullanılarak 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150 ve 200 μM konsantrasyonlarında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonların 24 saatlik kültüre eklenmesinin ardından geçen 48 saat sonunda MTT protokolü uygulanmıştır. Aynı zamanda kersetini çözmede kullanılan DMSO'nun, sitotoksositeye etkisini elimine etmek için %0.25, %0.5, %0.75 ve %1 oranlarında DMSO ile MTT analizleri gerçekleştirilmiştir. En yüksek dozda kersetin için uygulanan %1 DMSO'nun dahi, hücre canlılığına belirgin bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Tüm veriler GraphPad Prism® 7.0 programında değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda U87-MG hücrelerine uygulanan kersetine ait hücre çoğalmasında %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon (IC_{50} , “the half inhibitory concentration”) değerini gösteren grafik Şekil 4.2’de, konsantrasyonlar bağlı değişimin anlamlılık değerlerini gösteren grafik Şekil 4.3’te verilmiştir. Yapılan tekrarlar arasındaki tutarlılık tek yönlü varyans analizi (“one-way ANOVA”) ile belirlenmiştir.



Şekil 4.2: Kersetinin U87-MG hücrelerinde gösterdiği sitotoksik etki ve IC_{50} değeri.

Yapılan analizler sonucunda, hücre canlılığını %50 oranında azaltan kersetin konsantrasyonunun U87-MG insan glioma hücreleri için 33.8 μM ($\text{IC}_{50} = 33.8 \mu\text{M}$) olduğu belirlenmiştir.

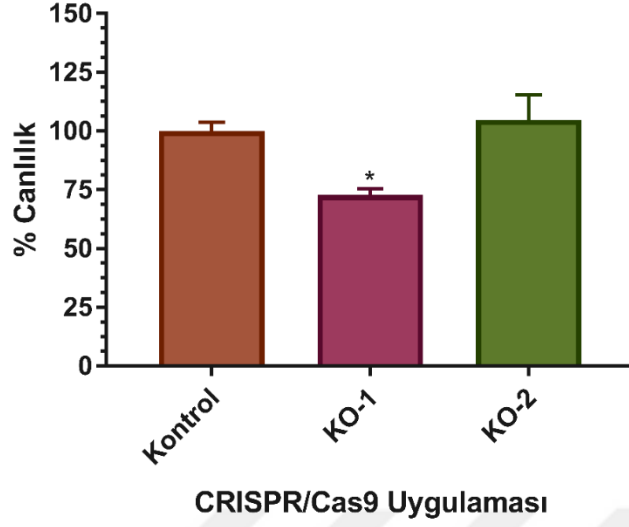


Şekil 4.3: Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kersetinin U87-MG hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi. (“***” ile ifade edilen sonuçlar $P < 0.001$ düzeyinde anlamlılık göstermektedir.)

1 μM konsantrasyonda uygulanan kersetin U87-MG hücreleri üzerinde proliferatif etki göstermiştir. 25, 50, 75, 100, 150 ve 200 μM konsantrasyonlarında kersetin uygulamasının ise hücreler üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır ($***P < 0.001$). Çalışma kapsamında uygulanan 2 μM kersetin uygulamasının hücrelerin canlılığı üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir etkisinin olmadığı ($P > 0.05$); 10 μM kersetin uygulamasının ~%70, 30 μM kersetin uygulamasının ise ~%52 oranlarında canlılığa neden olarak hücreler üzerinde anlamlı bir sitotoksik etkiye sebep olduğu saptanmıştır.

4.2.2. CRISPR-Cas9 Uygulamasının U87-MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

CRISPR/Cas9 uygulamasının ardından HSF1 geni susturulan U87-MG hücrelerinde canlılığın değişimi hücre hattı 4 pasaj ilerletildikten sonra değerlendirilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamış hücreler kontrol grubunu, sgRNA-1 ve sgRNA-2 aracılığıyla CRISPR/Cas9 uygulanan hücreler ise deney gruplarını oluşturmuştur. 5×10^4 hücre/mL yoğunlukta ekimi yapılan gruplar 48 saatin ardından MTT protokolü uygulanarak, % canlılık değerleri belirlenmek üzere 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbanları ölçülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.4’te verilmiştir.



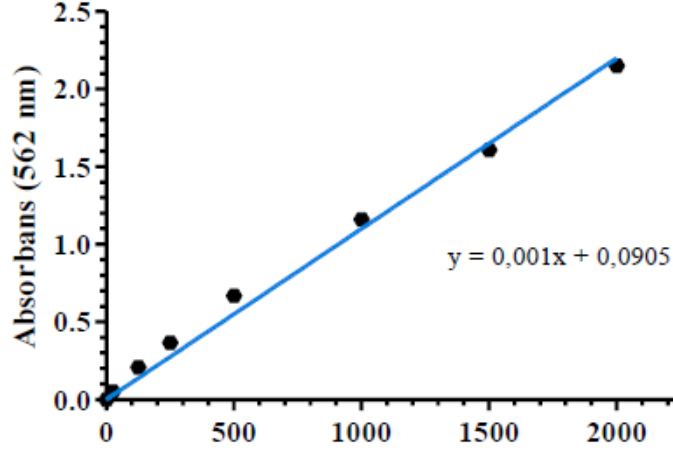
Şekil 4.4: Gerçekleştirilen CRISPR/Cas9 uygulamasının U87-MG hücrelerine sitotoksik etkisi.

CRISPR/Cas9 uygulamasının hücre canlılığına anlamlı bir etkisi olup olmadığına ilişkin elde edilen bulgular, uygulamanın başarısı kapsamında değerlendirilmiştir. HSF1 anlatımının hücrenin canlılığını korumaya yönelik gerçekleştiği ve kanser hücrelerinin apoptoz gibi hücre ölüm yollarından kaçmalarına yardımcı olduğu bilinmektedir (Kumar ve diğ., 2013). Farklı genlerin ekspresyonlarını değiştirmek amacıyla uygulanan genetik düzenlemelerin, elektroporasyon gibi yöntemlerle gerçekleştirildiğinde hücre canlılığını etkileyebileceği literatür bulguları arasındadır (Li ve diğ., 2018). Ancak lipid transfeksiyon aracılı CRISPR/Cas9 uygulamasının hücreler üzerindeki toksik etkisine dair herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Alınan sonuçlarda sgRNA-1 ile gerçekleştirilen susturumda hücre canlılığında %28 azalma olduğu, sgRNA-2 ile gerçekleştirilen susturumun ise istatistiksel açıdan anlamlı bir değişime yol açmadığı görülmüştür.

4.3. HÜCRE LİZATLARININ PROTEİN KONSANTRASYONLARI

Kullanılan ticari kitin (“SMART™ BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology”) içeriğinde bulunan BSA Standardı kit prosedüründe belirtilen konsantrasyonlarda (25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/ml) dH₂O ile seyreltilerek BCA analizi gerçekleştirilmiştir. BSA konsantrasyonları ve elde edilen absorbans sonuçları kullanılarak standart grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.5). Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen kersetin ve CRISPR/Cas9 uygulamalarından sonra toplanan hücrelerden, izolasyon ile total protein eldesi

sağlanmıştır. Hazırlanan izolatların protein konsantrasyonları (Tablo 4.1), standartlar kullanılarak oluşturulan lineer grafiğin verdiği doğru denklemine göre hesaplanmıştır.



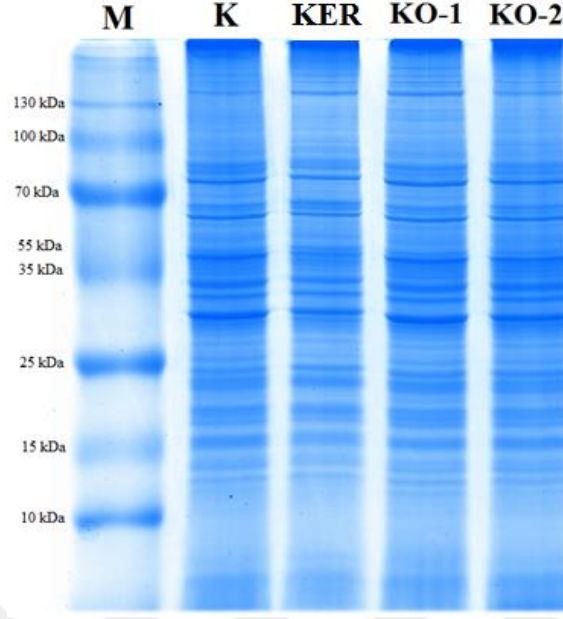
Şekil 4.5: Sığır serum albümin (“Bovine Serum Albumin”, BSA) standartları ile çizilen standart grafik.

Tablo 4.1: Hücresel ekstrele ait örnek protein konsantrasyonları.

Grup	Protein Konsantrasyonu µg/mL
Kontrol	7.310
Kersetin 2 µM	2.931
Kersetin 10 µM	2.938
Kersetin 30 µM	2.324
KO-1	2.245
KO-2	1.881

4.4. ELEKTROFORETİK VE İMMÜNOLOJİK ANALİZLER

Deney ve kontrol gruplarından elde edilen protein örnekleri, BCA ile konsantrasyonları belirlendikten sonra, her bir kuyucukta 30 µg protein olacak şekilde örnek yükleme tamponuyla karıştırılarak jellere yüklenmiştir. Jeldeki bantların hangi protein ağırlığına karşılık geldiğini saptamak amacıyla moleküler ağırlıkları bilinen proteinlerin bir karışımını içeren marker (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Invitrogen #26619) kullanılmıştır. Proteinler elektroforez ile yürütüldükten ve ayrıştırıldıktan sonra jellerden biri Coomassie boya ile boyanarak ChemiDoc MP (Bio-Rad) sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 4.6).



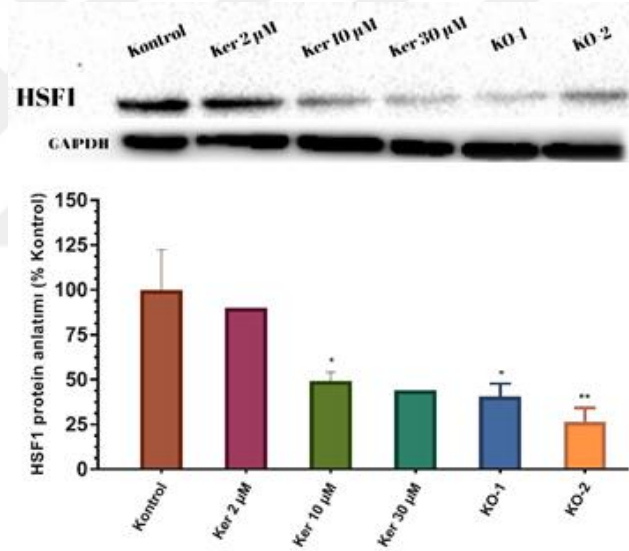
Şekil 4.6: Elektroforez işlemi sonrası Coomassie boya ile boyanmış SDS-poliakrilamid jel görüntüsü. (M: Marker; K: Kontrol grubu hücreler; KER: Kersetin 2 μ M doz uygulanan hücreler; KO-1: sgRNA1 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler; KO-2: sgRNA2 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler)

Elektroforez işleminden sonra immünolojik analizlerde kullanılmak üzere ayrılan diğer jellerdeki proteinler “Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistemi” aracılığıyla PVDF membrana aktarılmıştır. Aktarım sonrası membranlar Bölüm 3.11’de anlatıldığı şekilde önce bloklanmış, daha sonra ilgili antikorlarla muamele edilmiştir. Bu çalışma kapsamında immünolojik analizlerde HSF1, Hsp27, pHsp27, Hsp70 ve Hsp90 antikorları kullanılmıştır. Görüntülemeler ChemiDoc MP (Bio-Rad) sistemiyle gerçekleştirilmiş olup, GAPDH antikoruna ile normalizasyonları yapılan protein bantları ImageLab 6.0.1 programında analiz edilmiştir.

Kersetin ve CRISPR/Cas9 içeren tüm uygulamalar ile, farklı deney setlerinden elde edilen proteinlerle gerçekleştirilen Western Blot analizleri en az 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda oluşturulan deney setleri içerisinde CRISPR/Cas9 uygulaması gerçekleştirilen hücreler farklı pasaj sayılarında toplanarak analiz edilmiştir. Hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubu %100 kabul edilerek, sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri kontrole göre karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiş ve tek yönlü ANOVA ile Dunnett’s testleri kullanılarak doğrulanmıştır.

4.4.1. HSF1'in İmmünolojik Analizi

Öncelikle HSF1 anlatımının susturumuna yönelik gerçekleştirilen CRISPR/Cas9 uygulamaları sonucu “knock-out” verimi değerlendirilmiştir. Kullanılan her iki sgRNA ve 10 μ M kersetin uygulamasının HSF1 geninin anlatımını %50'nin üzerinde azalttığı görülmüştür (Şekil 4.7). Hsp27 anlatımı üzerinde anlamlı bir değişime sebep olduğu saptanan ve hücre canlılığını %30 oranında etkilediği belirlenen 10 μ M kersetin uygulamasının, HSF1 anlatımını %51 oranında düşürdüğü saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar literatürdeki bilgilere benzer profil sergilemektedir (Jego ve diğ., 2014). Kontrol grubundaki HSF1 anlatım düzeyine göre kıyaslandığında sgRNA1 aracılı gerçekleştirilen CRISPR/Cas9 uygulamasının HSF1 geninin anlatımını ~%59 oranında, sgRNA2 aracılı gerçekleştirilen CRISPR/Cas9 uygulamasının ise ~%74 oranında susturduğu belirlenmiştir.



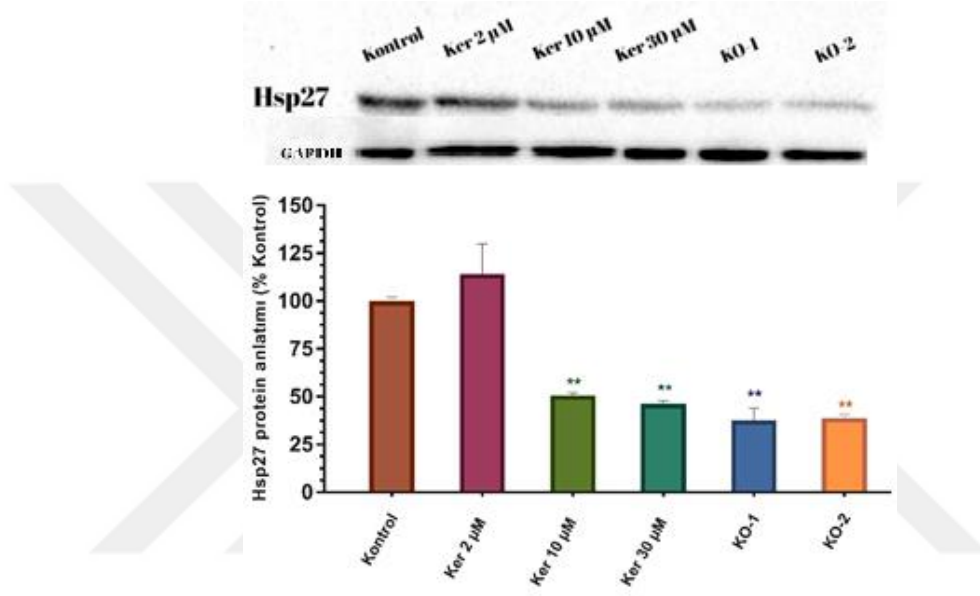
Şekil 4.7: Kontrol ve deney gruplarına ait HSF1 anlatımlarının Western blot analizi.

(Kontrol: Kontrol grubu hücreler; Ker 2: 2 μ M kersetin uygulanan hücreler; Ker 10: 10 μ M kersetin uygulanan hücreler; Ker 30: 30 μ M kersetin uygulanan hücreler; KO-1: sgRNA1 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler; KO-2: sgRNA2 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiş değerlerdir.)

4.4.2. Hsp27'nin İmmünolojik Analizi

Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu, farklı konsantrasyonlarda kersetin uygulaması yapılan deney grupları ve HSF1 susturumu için CRISPR/Cas9 uygulaması yapılan

hücrelerden oluşan deney gruplarına ait proteinleri içeren membranlar, Hsp27 primer antikoru ile muamele edilmiştir. Alınan sonuçlar GAPDH ile normalize edilerek Şekil 4.8’de verilmiştir. Buna göre 2 μ M kersetin uygulamasının hücredeki Hsp27 anlatımını ~%14 arttırdığı; buna karşılık 10 μ M kersetinin Hsp27 anlatımını %50 ve 30 μ M kersetinin ~%54 oranlarında azalttığı bulunmuştur. HSF1 geninde “knock-out” gerçekleştirilen hücrelerde ise Hsp27 anlatımının benzer şekilde ~%62 oranlarında azaldığı belirlenmiştir.

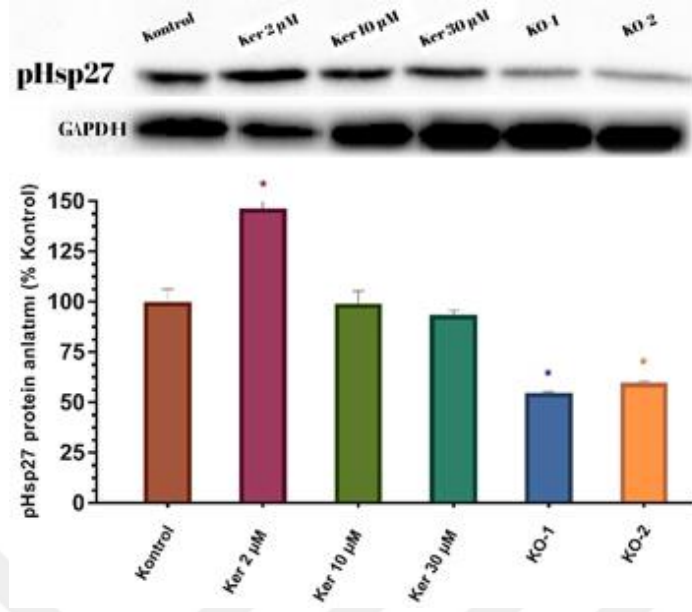


Şekil 4.8: Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp27 anlatımlarının Western blot analizi.

(Kontrol: Kontrol grubu hücreler; Ker 2: 2 μ M kersetin uygulanan hücreler; Ker 10: 10 μ M kersetin uygulanan hücreler; Ker 30: 30 μ M kersetin uygulanan hücreler; KO-1: sgRNA1 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler; KO-2: sgRNA2 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiş değerlerdir.)

4.4.3. pHsp27’nin İmmünolojik Analizi

Aynı kontrol ve deney gruplarına ait proteinleri içeren membranlar, pHsp27 primer antikoru ile muamele edilmiştir. Alınan sonuçlar GAPDH ile normalize edilerek Şekil 4.9’da verilmiştir. Buna göre 2 μ M kersetin uygulamasının hücredeki pHsp27 anlatımını ~%46 arttırdığı; 10 μ M ve 30 μ M kersetinin ise pHsp27 anlatımında kontrol grubuna göre anlamlı oranda bir değişime neden olmadığı bulunmuştur. HSF1 geninde susturum gerçekleştirilen hücrelerde pHsp27 anlatımının sgRNA1 aracılı CRISPR/Cas9 uygulanan hücrelerde ~%45 ve sgRNA2 aracılı CRISPR/Cas9 uygulanan hücrelerde ~%40 oranında azaldığı saptanmıştır.

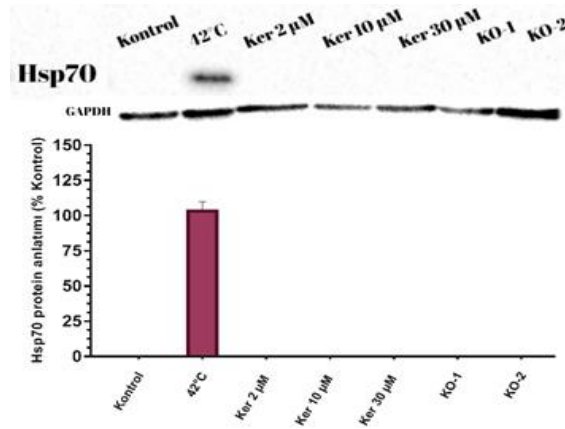


Şekil 4.9: Kontrol ve deney gruplarına ait pHis27 anlatımlarının Western blot analizi.

(Kontrol: Kontrol grubu hücreler; Ker 2: 2 μ M kersetin uygulanan hücreler; Ker 10: 10 μ M kersetin uygulanan hücreler; Ker 30: 30 μ M kersetin uygulanan hücreler; KO-1: sgRNA1 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler; KO-2: sgRNA2 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiş değerlerdir.)

4.4.4. Hsp70'in İmmünolojik Analizi

İndüklenebilir Hsp70'e ait primer antikor ile muamele edilen membranlardan alınan sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan 4 saat 42°C ısı şoku uygulaması yapılan örnek dışında, kersetin ve CRISPR/Cas9 uygulamalarının Hsp70 proteininin anlatımında bir değişime neden olmadığı görülmüştür.

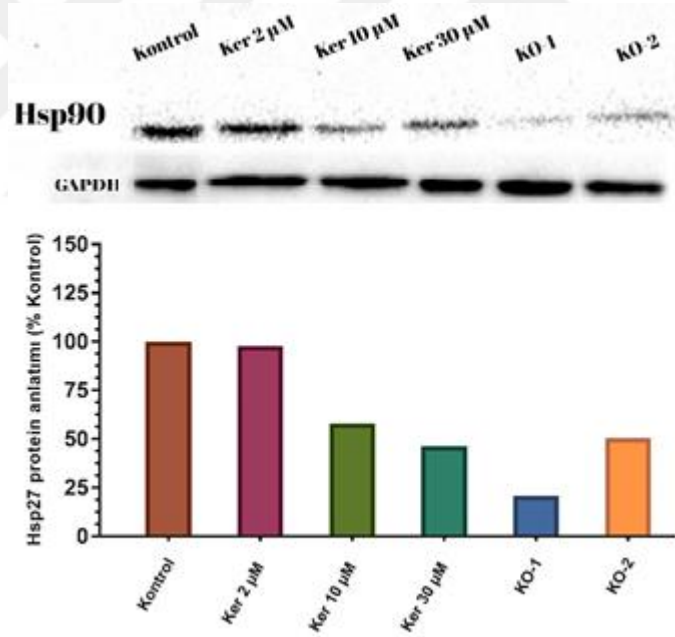


Şekil 4.10: Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp70 anlatımlarının Western blot analizi.

(Kontrol: Kontrol grubu hücreler; 42°C: 42°C ısı şokuna maruz bırakılan hücreler; Ker 2: 2 µM kersetin uygulanan hücreler; Ker 10: 10 µM kersetin uygulanan hücreler; Ker 30: 30 µM kersetin uygulanan hücreler; KO-1: sgRNA1 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler; KO-2: sgRNA2 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiş değerlerdir.)

4.4.5. Hsp90'ın İmmünolojik Analizi

Hsp90 primer antikoru ile muamele edilen membranlardan alınan sonuçlar GAPDH ile normalize edilerek Şekil 4.11'de verilmiştir. Buna göre 2 µM kersetin uygulamasının hücredeki Hsp90 anlatımında belirgin bir değişime sebep olmadığı; 10 µM kersetinin Hsp90 anlatımını kontrol grubuna göre %42 oranında, 30 µM kersetinin ise %54 oranında azalttığı bulunmuştur. HSF1 geninde susturum gerçekleştirilen hücrelerde Hsp90 anlatımının ise sgRNA1 aracılı CRISPR/Cas9 uygulanan hücrelerde ~%80 ve sgRNA2 aracılı CRISPR/Cas9 uygulanan hücrelerde ~%50 oranında azaldığı saptanmıştır.



Şekil 4.11: Kontrol ve deney gruplarına ait Hsp90 anlatımlarının Western blot analizi.

(Kontrol: Kontrol grubu hücreler; Ker 2: 2 µM kersetin uygulanan hücreler; Ker 10: 10 µM kersetin uygulanan hücreler; Ker 30: 30 µM kersetin uygulanan hücreler; KO-1: sgRNA1 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler; KO-2: sgRNA2 aracılı knock-out gerçekleştirilen hücreler. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiş değerlerdir.)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, vücudun herhangi bir noktasındaki anormal hücrelerin kontrolsüz bölünmesinden kaynaklanan bir hastalıktır. Hastalığın ortaya çıkmasının nedenleri, özellikle çocukluk döneminde ortaya çıkan birçok kanser için tam olarak bilinmemekle birlikte; tütün kullanımı, aşırı vücut ağırlığı gibi yaşam tarzı faktörleri ve kalıtsal mutasyonlar, hormonlar ve bağışıklık koşulları gibi genetik faktörler de dahil olmak üzere birçok sebebe dayandırılmaktadır. Gliomalar çok hızlı büyüme gösteren, invazyon yeteneği yüksek, radyoterapi ve kemoterapiye dirençli primer beyin tümörleridir. Gliomalar arasında oldukça yüksek bir insidansa sahip olan GBM, tedavide karşılaşılan zorluklar nedeniyle hastaların yaşam kalitelerini düşürmekte ve medyan sağ kalımı sınırlandırmaktadır.

Genler temel anlamıyla protein kodlayıcı dizilerdir ve canlı hücrelerdeki kimyasal reaksiyonların düzenleyicisi olarak çok önemli roller üstlenmektedir. Bir gende gerçekleşen mutasyon, protein sentezinde ilgili proteinin disfonksiyonuna yol açan değişikliklere neden olabilmektedir. Bu değişiklikler ise organizmada hastalıklarla sonuçlanan doku ve metabolizma bozulmalarına yol açabilmektedir. Moleküler biyoloji ve benzeri disiplinlerde gerçekleşen ilerlemeler, kalıtsal hastalıkların genetik temelini anlamaya yardımcı olmaktadır. Mevcut genomik bilgilerin çerçevesinin genişlemesiyle, araştırma stratejileri daha bilinçli bir yöne ilerlemekte ve araştırmacıların popülasyon düzeyinde genomik paternler tarafından desteklenen anlamlı hipotezler izlemesine olanak sağlamaktadır (Brennan, 2011). Güncel proteomik araçlarla birleştirilen bu genomik veriler, GBM'ye ait tümöral karmaşıklığın giderilmesini sağlayacak değerli bir kaynaktır. Günümüzde bu veriler sayesinde GBM'nin geliştirilmiş moleküler sınıflandırmaları ortaya çıkmasına rağmen, spesifik GBM alt tiplerini tedavi etmek için hedefe yönelik tedaviler henüz hayata geçirilememiştir (Lima ve diğ., 2012).

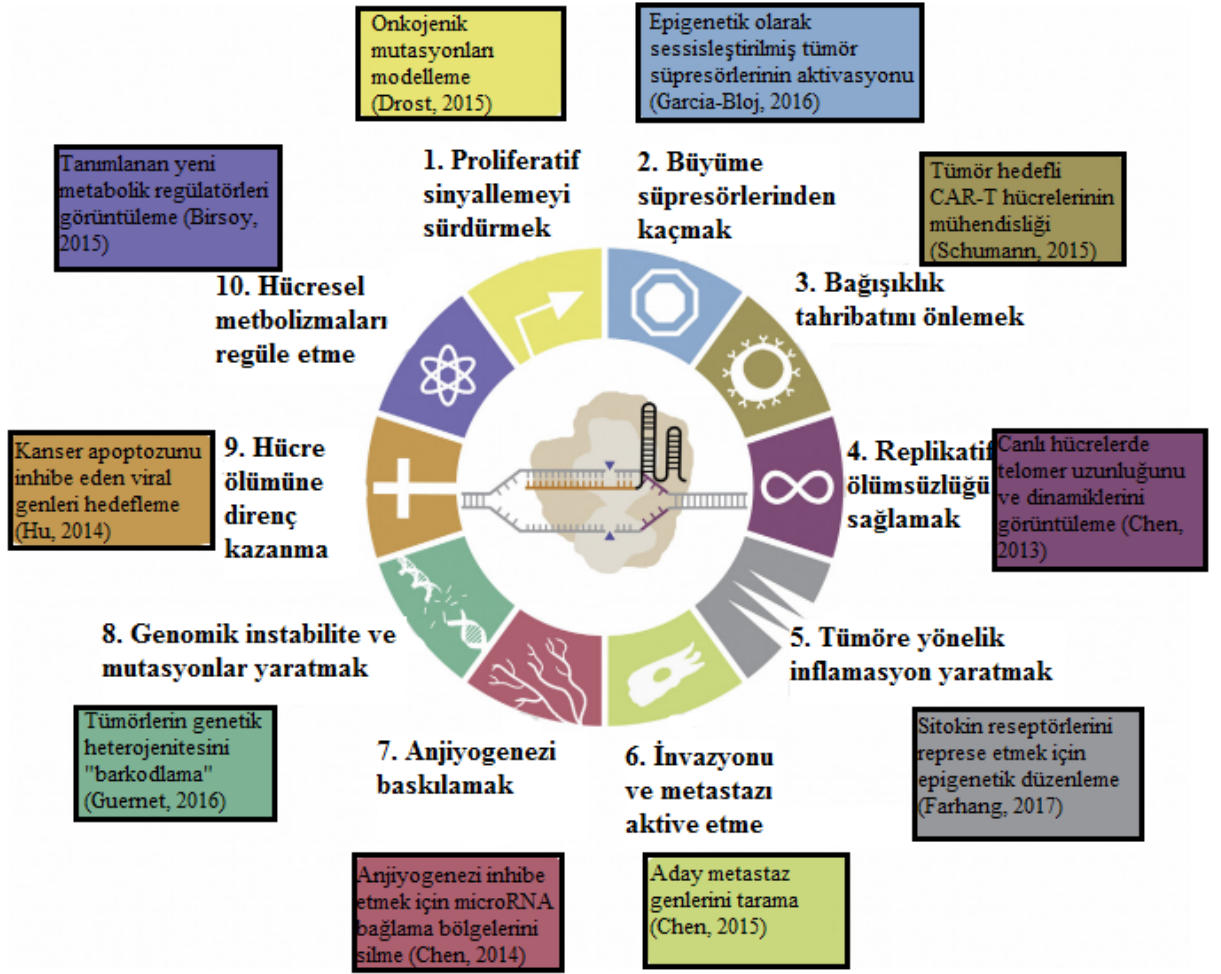
Gen terapisi, hastalık gelişiminden sorumlu olan kusurlu genleri düzeltmek için genleri ilaç olarak kullanan deneysel bir tekniktir. Bu özelliğiyle geleneksel tedavilerin ötesine geçen gen terapilerinin, üçüncü milenyumun en önemli gelişmelerinden biri haline geleceği düşünülmektedir. Gen terapisi, çok çeşitli kalıtsal ve edinilmiş insan hastalıklarını ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir. Çok sayıda klinik çalışma, gen terapilerinin muhtemelen GBM tedavisinin en umut verici yöntemi olacağını ve bu yolla oluşturulan ilaç tasarımlarına vurgu yapılması gerektiğini öne sürmektedir.

Gen terapisiyle gerçekleştirilen bir dizi faz I / II klinik çalışmanın, primer immün yetmezlikler, lökodistrofiler, talasemi, hemofili ve retina distrofisi dahil olmak üzere kan, bağışıklık ve sinir sistemlerinden, B-hücreli maligniteleri gibi kanserlere kadar çok çeşitli kalıtsal hastalığın tedavisi için etkinlik ve güvenliliğe sahip olduğunu bildirmiştir. Son yıllarda artış gösteren kanser gen terapi yaklaşımları T lenfositlerinin, tümör kök hücrelerinin veya doğrudan tümörlü hücrelerin *in vivo* genetik modifikasyonunu içermektedir. Bununla birlikte *in vivo* gen terapi sistemlerinde kullanılan lipozom temelli veya retroviral vektörler gibi taşıyıcıların geliştirilmesi için de çalışmalar, uzun yıllardan beri büyük bir ivme kazanarak devam etmektedir.

Gen terapisinin kanser tedavisi için rutin olarak uygulanmasını engelleyen temel faktör, bu işlem için tam anlamıyla etkili bir yöntemin olmamasıdır. Tümör regresyonu veya genetik hasarların yeniden yapılandırılması, gen terapileri için bir sorun olmaya devam etmektedir. Gen anlatımını ve ürünlerini anlamlı bir düzeyde değiştirebilmek adına bu dizileri, yeterli sayıda tümör hücresine ulaştırmada yüksek verimli stratejiler oluşturulması gerekmektedir. Yapılan çok sayıda araştırma bu engellerin üstesinden gelmeyi amaçlayarak, gen terapisini onkolojinin standart bir parçası haline getirmeye çalışmaktadır.

Temel genetik modifikasyon mekanizmaları, genetik hastalıklarda sorunun kaynağı olan gen aktivasyonu/inaktivasyonu değiştirmek, genleri düzeltmek, yerini değiştirmek ya da silmek; bulaşıcı hastalıklarda patojen genomlarında etkisizleştirici mutasyonlar üretmek; terapötik/koruyucu somatik mutasyonları tetiklemek gibi çeşitli stratejileri benimsemektedir. ZFN ve TALEN gibi programlanabilir nükleazlarla hedeflenen genom düzenlemeleri, bölgeye özgü bir şekilde farklı genom manipülasyonlarına olanak sağlamaktadır. Programlanabilir nükleazlar insersiyonel mutasyonlar ve proteinlerin yanlış anlatımı gibi yan etkilere yol açabilen, hedef hücre çekirdeğine veya genomuna eksojen bir DNA kopyası ekleyen önceki gen terapi araçlarından farklı olarak, bir "kes-yapıştır" stratejisi kullanmaktadır (Kim ve Kim, 2014). Bu strateji basitçe genlerdeki kusurları giderme ve doğru olanı yerleştirme anlamı taşımaktadır. Son zamanlarda, programlanabilir nükleazlar listesine eklenen CRISPR-Cas9 olarak adlandırılan bir RNA kılavuzlu genom düzenleme aracı, diğer örneklerine göre çeşitli avantajlar sunmakta ve terapötik potansiyel sergilemektedir.

Doudna ve Charpentier'ın güçlü bir RNA programlı genom düzenleme platformu olarak CRISPR/Cas9 sisteminin potansiyelini göstermesinden beri, genom mühendisliği alanı, temel biyolojik ve biyomedikal araştırmaların neredeyse her yönüne ulaşmayı vaat eden bir bilimsel devrim olarak ortaya çıkmaktadır. Bu teknolojinin, temel araştırmalardan klinik ve translasyonel uygulamalara kadar, kanser biyolojisinin çeşitli alanlarına uygulanması (Şekil 5.1), bu kompleks hastalığı daha iyi anlamak ve tedavi etmek için çok sayıda heyecan verici fırsat sunmaktadır. sgRNA'ların deneysel tasarlama ve klonlamada sağladığı kolaylık CRISPR sistemini "high-throughput" taramalar için çok uygun hale getirmektedir. Ayrıca Cas9'un genleri multipleks olarak hedefleme yeteneği, kromoleksiden kaynaklanan kanser genomlarında daha karmaşık gen düzenleme kombinasyonlarını çalışma olanağı sunmaktadır (Choi ve Meyerson, 2014).



Şekil 5.1: Kanser biyolojisine bağlı özelliklerin araştırılmasında CRISPR teknolojisinin kullanıldığı temel stratejiler (Moses ve diğ.,2018).

HSP'ler hücrede moleküler şaperonlar olarak işlev gören ve hücresel stresle birlikte aktivasyonlarında artış gözlenen proteinlerdir. Çoğu HSP, çeşitli kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilmekte, bu sayede kanser teşhisi ve prognoz tahmini için biyobelirteç olarak kullanılabilir. HSP'ler moleküler ağırlıklarına göre farklı sınıflandırılmalarına sahip olmalarına rağmen, çoğunlukla karsinogeneze, apoptozun önlenmesinde ve ilaç direnci gelişmesinde benzer fonksiyonlar üstlenmektedir. Son yıllarda HSP'lerin kanser tedavisi için yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesini sağlayan terapötik hedefler olarak kullanılabileceği fikri benimsenmiştir. HSP'lerin hedeflendiği çeşitli antikanser ilaçlar, FDA tarafından onaylanmıştır. Örneğin, kanser hücrelerinde GRP78 ekspresyonunu azaltan bir kinaz inhibitörü olan sorafenib (Nexavar), renal hücre karsinoması (2005), hepatosellüler karsinom (2007) ve metastatik tiroid karsinoması (2013) için FDA tarafından onaylanmıştır (Roberts ve diğ., 2015). Ruxolitinib (Jakafi), kanser hücrelerinde ve hayvan modellerinde HSP70 ve HSP90 ekspresyonunu azaltan bir Janus kinaz (JAK) inhibitörüdür. FDA tarafından orta veya yüksek riskli miyelofibrozis (2011) ve polisitemi vera (2014) tedavisi için onaylanmıştır (Tavallai ve diğ., 2016). HSP'lerin inhibisyonu, hücresel fonksiyonları düzenleme görevleri nedeniyle normal hücreleri etkilemektedir. HSP'ler normal hücrelerle kıyaslandığında kanser hücrelerinde daha yüksek oranda eksprese edildiğinden, kanser hücrelerinin hücresel işlevlerini gerçekleştirebilmeleri ve ölümden kaçınmaları için, HSP up-regülasyonunun gerekli olduğu fikri oluşmuştur. Kanser hücreleri ve normal hücreler arasındaki HSP anlatımı için farklı gereksinim olması, antikanser ilaçların geliştirilmesi için yeni bir pencere açmaktadır. Bu durumda belli kanser hücrelerinde artmış ekspresyon seviyelerine göre HSP'leri seçici olarak hedef alan yeni kemoterapötik ilaçlar geliştirmek mümkün gözükmemektedir (Wu ve diğ., 2017).

Isı şoku tepkisinin ana düzenleyicisi olan HSF1, stres karşısında organizmanın hayatta kalmasını sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. Yaygın olarak pozitif kabul edilen etkilerinin aksine, HSF1'in malign transformasyonu destekleyerek organizmaların zararına etki edebileceği gösterilmiştir. Farelerde HSF1 eksikliğinin, p53 tümör baskılayıcı geninin negatif bir mutasyonuyla başlatılan spontan tümör oluşumunu önemli ölçüde sınırlandırdığı gözlenmiştir. H-Ras protoonkogenin aktive edici mutasyonları ile ilişkili kimyasal kaynaklı cilt karsinogenezi üzerinde HSF1 fonksiyon eksikliğinin benzer bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bazı insan kanser hücre hatlarında HSF1'in kaybı, normal hücreler üzerinde çok az bir etkiye sahip olmakla birlikte, kanser hücrelerinin büyümelerini ve hayatta kalmalarını önemli ölçüde hasara uğratmıştır (Dai, 2007)

Bu tez kapsamında HSF1 geninin U87-MG insan glioma hücrelerinde CRISPR/Cas9 tekniğiyle susturulmasının (“knock-out”), hücredeki Hsp27, p_{Hsp27}, Hsp90 ve indüklenbilir formdaki Hsp70 stres proteinlerinin anlatımları üzerine etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışma kapsamında sgRNA’lar ile hedeflenen bölgelerde rastgele mutasyonlara sebep olan DSB’ler, Cas9 aracılığıyla gerçekleştirilen kesimlerle oluşturulmuştur. Bu kırıkların tamiri, homolog olmayan uçların birleştirilmesi temeline dayanan NHEJ yoluyla meydana gelmektedir. Bu noktada meydana gelen indel mutasyonlar gen dizisinde çerçeve kaymalarına neden olarak genin anlatımını susturmaktadır. Ayrıca HSF1 anlatımının ana regülatörü olduğu bilinen kersetinin farklı dozlarda uygulanmasıyla da aynı stres proteinlerindeki anlatım değişimleri incelenmiş ve genetik susturma ile aralarındaki etkinlik farkları karşılaştırılmıştır.

Bu bağlamda öncelikle kersetin ve CRISPR/Cas9 uygulaması yapılan deney grupları oluşturulmadan, ajanların ya da uygulamaların hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizleri ile incelenmiştir. U87-MG hücrelerine uygulanan kersetin için IC₅₀ değeri 33.8 µM olarak belirlenmiştir. Deney gruplarında kullanılmak üzere seçilen 2 µM kersetinin proliferasyon üzerinde anlamlı bir değişime sebep olmadığı, 10 µM kersetinin %30, 30 µM kersetinin ise %48 oranlarında hücre ölümüne sebep olduğu görülmüştür. Daha sonra farklı dozlarda kersetin uygulaması yapılan hücreler toplanarak protein izolasyonları gerçekleştirilmiş ve stres proteinlerinin anlatımlarında meydana getirdiği değişimler araştırılmıştır. Bu işlemlere paralel olarak yürütülen CRISPR/Cas9 yönteminin ardından gerçekleştirilen MTT analizlerinde sgRNA-1 aracılı olarak susturumu gerçekleştirilen KO-1 grubunda hücre canlılığının %25 oranında azaldığı belirlenmiştir. Ancak sgRNA-2 aracılı gerçekleştirilen susturumun, KO-2 grubunda herhangi bir toksik etkiye sebep olmadığı saptamıştır. Kontrol ve deney gruplarından toplanan hücrelerden daha sonra protein izolasyonları gerçekleştirilerek, total protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Stres proteinlerinde sebep oldukları anlatım değişikliklerini saptamak amacıyla Western-blot tekniği uygulanmıştır. Yapılan immünolojik analizlerde HSF1 anlatımının KO-1 grubunda %59, KO-2 grubunda %74 oranlarında susturulduğu saptanmıştır. Bununla birlikte kersetinin 10 µM uygulandığı grupta HSF1 anlatımı %51 oranında azalmıştır. Elde edilen bulgular literatürdeki verilerle uyum göstermektedir. Yapılan çalışmalarda kersetin uygulaması sonucunda Hsp anlatımlarının down-regülasyonunda benzer sonuçlar elde edilmiştir (Li ve diğ, 2016). Ancak sağladıkları hücresel canlılık ve deneysel verim karşılaştırıldığında, CRISPR/Cas9 uygulaması deneysel olarak daha avantajlıdır.

Hücredeki Hsp27 anlatımındaki değişimlerin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen immünolojik analizlerde 2 μ M kersetinin Hsp27 anlatımını %27 artırdığı, buna karşılık 10 μ M kersetinin %50 ve 30 μ M kersetinin ~%54 oranlarında Hsp27 anlatımını azalttığı bulunmuştur. CRISPR/Cas9 uygulamasının KO gruplarında benzer olarak Hsp27 anlatımında %62 oranında azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Hücrelerdeki pHsp27 proteinlerinin anlatım seviyelerin incelendiğinde 2 μ M kersetinin anlatımı %46 oranında artırdığı, 10 μ M ve 30 μ M kersetinin ise anlamlı bir değişime sebep olmadığı görülmüştür. KO-1 uygulanan grupta pHsp27 anlatımı %45 oranında azalırken, KO-2 grubunda %45 oranında azaldığı belirlenmiştir. Aynı deney gruplarında indüklenabilir formdaki Hsp70 incelendiğinde yalnızca ısı şoku uygulanan (42°C) hücrelerde anlatım seviyesinin değiştiği gözlenmiştir. Hsp90 anlatımındaki değişimlerin analiz sonuçları ise 2 μ M kersetin uygulamasının hücredeki Hsp90 anlatımında belirgin bir değişime sebep olmadığını; 10 μ M kersetinin %42 oranında, 30 μ M kersetinin %54 oranında, KO-1 uygulamasının %80 ve KO-2 uygulamasının %50 oranında Hsp90 anlatımında azalmaya sebep oldukları saptanmıştır. Hsp27 ve pHsp27 anlatımları HSF1'in susturulması sonucunda kontrole göre belirgin oranda azalmakla birlikte, devam etmiştir. Sonuç olarak değerlendirilen stres proteinlerinin ekspresyonlarının regülasyonlarında HSF1 dışında farklı mekanizmaların rol oynayabileceği görülmüştür. Ayrıca gerçekleştirilen genetik modifikasyon, ajan uygulamasına göre canlılığa çok daha minimal bir etki göstererek, daha yüksek bir verim elde edilebildiğini ortaya koymuştur. Ancak gerçekleştirilen modifikasyon yolunun devamlılığının sağlanabilirliği göz önünde bulundurulmalıdır. Kullanılan CRISPR/Cas9 tekniğinde ticari kitin sergilediği devamlılık, jenerasyonlar boyu kalıcı olamamıştır. Bu nedenle farklı transfeksiyon yolları aracılığıyla CRISPR/Cas9 etkinliği yüksek hücrelerin seçilmesi ve istenilen modifikasyonu içeren hücrelerin sayısının yüksek olduğu bir popülasyonun oluşturulması öncelik olmalıdır. Bu bağlamda kombine terapilerde alınan veriler, susturum sonrası pasajlanan hücrelerden dolayı farklı bir profil sergileyerek sonuçların doğru bir şekilde değerlendirilmesini kısıtlamaktadır.

Sonuç olarak HSF1 stres proteinlerinin ana regülatörü olarak rolünü korumakla birlikte, düzenlenmelerinde farklı mekanizmalar ve yollar devreye girmektedir. Genetik modifikasyon yöntemleri kullanmak hem bu tarz yollar araştırmalarında hem de genetik hastalıkların tanı ve tedavilerinde sahip olduğu avantajlarla moleküler biyoloji çalışmalarına yeni bir boyut kazandırmaktadır.

KAYNAKLAR

- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., & Mukherjee, S.K., 2003, RNA interference: biology, mechanism, and applications, *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 657-85.
- Ahmed, K., Furusawa, Y., Tabuchi, Y., Emam, H.F., Piao, J.L., Hassan, M.A., ... Kadowaki, M., 2012, Chemical inducers of heat shock proteins derived from medicinal plants and cytoprotective genes response, *International Journal of Hyperthermia*, 28(1), 1-8.
- Akerfelt, M., Morimoto, R.I., & Sistonen, L., 2010, Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(8), 545-55.
- Amin, J., Ananthan, J., & Voellmy, R., 1988, Key features of heat shock regulatory elements, *Molecular and cellular biology*, 8(9), 3761-9.
- Arber W., 2012, Restriction enzymes: From their discovery to their applications Genetically Modified Organisms and Genetic Engineering in Research and Therapy, In: Piguet, P. (ed.), Karger, Basel, 3: 33-38.
- Avila, M.A., Velasco, J.A., Cansado, J. and Notario, V., 1994, Quercetin Mediates the Down-Regulation of Mutant p53 in the Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB468, *American Association for Cancer Research*, 54(9), 2424-8.
- Bailey, P. and Cushing, H., 1926, A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis, *British Journal of Surgery*, 14, 554-55.
- Bakthisaran, R., Tangirala, R. and Rao, C.M., 2015, Small heat shock proteins: role in cellular functions and pathology, *BBA - Proteins and Proteomics*, 1854(4), 291-319.
- Barone, D.G., Lawrie, T.A., & Hart, M., 2014, Image guided surgery for the resection of brain tumours, *The Cochrane database of systematic reviews*, 1, CD009685.
- Bauer, D.E., Canver, M.C., & Orkin, S.H., 2014, Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9, *Journal of visualized experiments*, (95), e52118.
- Baylis, F. and McLeod, M., 2017, First-in-human phase 1 CRISPR gene editing cancer trials: are we ready?, *Current gene therapy*, 17(4), 309-19.
- Bernstein, H.G., Steiner, J., Guest, P.C., Dobrowolny, H. & Bogerts B., 2015, Glial cells as key players in schizophrenia pathology: recent insights and concepts of therapy, *Schizophrenia Research*, 161(1), 4-18.
- Blakeley, J.O., Coons, S. J., Corboy, J.R., Kline Leidy, N., Mendoza, T.R., Wefel, J.S., 2016, Clinical outcome assessment in malignant glioma trials: measuring signs, symptoms, and functional limitations, *Neuro-oncology*, 18 Suppl 2(Suppl 2), ii13-ii20.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A., 2018, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *Cancer Journal for Clinicians*, 68, 394-424.

Brennan, C., 2011, Genomic Profiles of Glioma, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 11(3), 291–97.

Cai, X. and Sughrue, M.E., 2017, Glioblastoma: new therapeutic strategies to address cellular and genomic complexity, *Oncotarget*, 9(10), 9540-54.

Calderwood, S.K., & Gong, J., 2016, Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket, *Trends in biochemical sciences*, 41(4), 311-23.

Chandra, D., Choy, G. and Tang, D.G., 2007, Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3, *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31289-301.

Chatterjee, S., & Burns, T.F., 2017, Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach, *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1978.

Chiosis, G., Dickey, C.A. and Johnson, J. L., 2013, A global view of Hsp90 functions, *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(1), 1-4.

Cho, S. W., Kim, S, Kim, J. M. and Kim, J. S., 2013, Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease, *Nature Biotechnology*, 31, 230-2.

Choi, P. S., & Meyerson, M., 2014, Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology, *Nature Communications*, 5(1).

Czarnecka, A.M., Campanella, C., Zummo, G. and Cappello, F., 2006, Mitochondrial chaperones in cancer: from molecular biology to clinical diagnostics, *Cancer biology & therapy*, 5(7), 714-20.

Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A.B. and Lindquist, S., 2007, Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis, *Cell*, 130(6), 1005-18.

Dalvai, M., Loehr, J., Jacquet, K., Huard, C. C., Roques, C., Herst, P., ... Doyon, Y., 2015, A Scalable Genome-Editing-Based Approach for Mapping Multiprotein Complexes in Human Cells, *Cell Reports*, 13(3), 621–633.

Davis, M.E., 2016, Glioblastoma: Overview of disease and treatment, *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 20(5 Suppl), 2-8.

DeAngelis, L.M. and Mellinghoff, I.K., 2011, Virchow 2011 or how to ID(H) human glioblastoma, *Journal of Clinical Oncology*, 29(34), 4473-4.

De Martino, F., Yacoub, E., Kemper, V., Moerel, M., Uludağ, K., De Weerd, P., Ugurbil, K., Goebel, R., Formisano, E., 2018, The impact of ultra-high field MRI on cognitive and computational neuroimaging, *NeuroImage*, 168, 366-82.

Diwanji, T.P., Engelman, A., Snider, J.W. and Mohindra, P., 2017, Epidemiology, diagnosis, and optimal management of glioma in adolescents and young adults, *Adolescent health, medicine and therapeutics*, 8, 99-113.

Engerud, H., Tangen, I. L., Berg, A., Kusonmano, K., Halle, M. K., Oyan, A. M., Kalland, K. H., Stefansson, I., Trovik, J., Salvesen, H. B., ... Krakstad, C., 2014, High level of HSF1 associates with aggressive endometrial carcinoma and suggests potential for HSP90 inhibitors, *British journal of cancer*, 111(1), 78-84.

Fan, C.Y., Lee, S. and Cyr, D.M., 2003, Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40, *Cell Stress and Chaperones*, 8(4), 309-16.

Feder, M.E., 1999a, Organismal, ecological, and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: Established conclusions and unresolved issues, *American Zoologist*, 39(6), 857-864.

Feder, M.E. and Hofmann, G.E., 1999b, Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, And The Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology, *Annual Review of Physiology*, 61, 243-82.

Fernandes, M., Xiao, H., & Lis, J.T., 1994, Fine structure analyses of the Drosophila and Saccharomyces heat shock factor--heat shock element interactions, *Nucleic acids research*, 22(2), 167-73.

Fernandez Coello, A., Moritz-Gasser, S., Martino, J., Martinoni, M., Matsuda, R., and Duffau, H., 2013, Selection of intraoperative tasks for awake mapping based on relationships between tumor location and functional networks, *Journal of Neurosurgery*, 119(6), 1380-94.

Flowers, A., 2000, Brain tumors in the older person, *Cancer Control*, 7(6), 523-38.

Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M. and Joung, J.K., 2014, Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs, *Nature Biotechnology*, 32(3), 279-84.

Fung, P. and Kong, R., 2017, The Heat Shock Protein Story—From Taking mTORC1,2 and Heat Shock Protein Inhibitors as Therapeutic Measures for Treating Cancers to Development of Cancer Vaccines, *Journal of Cancer Therapy*, 8, 962-1029.

Gaillard, F., Lasocki, A., Gorelik, A., & Gonzales, M., 2018, MRI Features Can Predict 1p/19q Status in Intracranial Gliomas, *American Journal of Neuroradiology*, 39(4), 687–692.

Gandia, P., Jaudet, C., Everaert, H., 2017, Population Pharmacokinetic Approach Applied to Positron Emission Tomography: Computed Tomography for Tumor Tissue Identification in Patients with Glioma, *Clinical Pharmacokinetics*, 56(8), 953-61.

Ghannaei Arani, M., Fakharian, E., & Sarbandi, F., 2012, Ancient legacy of cranial surgery, *Archives of trauma research*, 1(2), 72-4.

Gupta, A. and Dwivedi, T., 2017, A simplified overview of World Health Organization classification update of central nervous system tumors 2016, *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 8(4), 629-41.

- Hahn, G.M., 1974, Metabolic Aspects of the Role of Hyperthermia in Mammalian Cell Inactivation and Their Possible Relevance to Cancer Treatment, *Cancer Research*, 34(11), 3117-23.
- Han, W. and She, Q., 2017, CRISPR History: Discovery, Characterization, and Prosperity, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 152, 1-21.
- Han, X., Liu, Z., Jo, M. C., Zhang, K., Li, Y., Zeng, Z., Qin, L., 2015, CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation, *Science Advances*, 1(7), e1500454.
- Hanahan D., Weinberg, R.A., 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144(5), 646-74.
- Henle, K. J. and Dethlefsen, L. A., 1978, Heat Fractionation and Thermotolerance: A Review, *Cancer Research*, 38(7), 1843-51.
- Hochberg, F.H., Atai, N.A., Gonda, D., Hughes, M.S., Mawejje, B., Balaj, L. and Carter, R.S., 2014, Glioma diagnostics and biomarkers: An ongoing challenge in the field of medicine and science, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 14(4), 439-52.
- Høj, A. and Jakobsen, B.K., 1994, A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation, *The EMBO journal*, 13(11), 2617-24.
- Horii, T., Arai, Y., Yamazaki, M., Morita, S., Kimura, M., Itoh, M., Abe, Y., ... Hatada, I., 2014, Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering, *Scientific reports*, 4, 4513.
- Hsu, P.D., Lander, E.S. and Zhang, F., 2014, Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering, *Cell*, 157(6), 1262-78.
- Im, C.N., Yun, H.H., & Lee, J.H., 2017, Heat Shock Factor 1 Depletion Sensitizes A172 Glioblastoma Cells to Temozolomide via Suppression of Cancer Stem Cell-Like Properties, *International journal of molecular sciences*, 18(2), 468.
- Ion-Mărgineanu, A., Van Cauter, S., Sima, D. M., Maes, F., Sunaert, S., Himmelreich, U. & Van Huffel, S., 2017, Classifying Glioblastoma Multiforme Follow-Up Progressive vs. Responsive Forms Using Multi-Parametric MRI Features, *Frontiers in Neuroscience*, 10, 615.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A., 1987, Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product, *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-33.
- Ishiwata, T., Matsuda, Y., Yamamoto, T., Uchida, E., Korc, M., & Naito, Z., 2012, Enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc promotes human pancreatic cancer cell proliferation, *The American journal of pathology*, 180(5), 1928-41.
- Jackson, A. L., & Linsley, P. S., 2010, Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(1), 57–67.

- Jackson, S.E., 2013, Hsp90:Structure and function, *Topics in Current Chemistry*, 328, 155-240.
- Jäkel, S. and Dimou, L., 2017, Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 24.
- Jego, G., Lanneau, D., De Thonel, A., Berthenet, K., Hazoumé, A., ... , Garrido C., 2014, Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes, *Leukemia*, 28(8), 1676-86.
- Ji, R.R., Berta, T. and Nedergaard, M., 2013, Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?, *Pain*, 154 Suppl 1, 10-28.
- Jiang, Y., & Uhrbom, L., 2012, On the origin of glioma, *Upsala journal of medical sciences*, 117(2), 113-21.
- Jin, X., Eroglu, B., Moskophidis, D., & Mivechi, N.F., 2018, Targeted deletion of Hsf1, 2, and 4 genes in mice, *Methods in molecular biology*, 1709, 1-22.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., & Charpentier, E., 2012, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 337(6096), 816-21.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J., 2013, RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2, e00471.
- Jurivich, D. A., Sistonen, L., Sarge, K. D., & Morimoto, R. I., 1994, Arachidonate is a potent modulator of human heat shock gene transcription, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), 2280-4.
- Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., ... Hightower, L.E., 2008, Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins, *Cell stress & chaperones*, 14(1), 105-11.
- Kelley, P.M. and Schlesinger, M.J., 1978, The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts, *Cell*, 15(4), 1277-86.
- Kelly, P., 2010, Gliomas: Survival, origin and early detection, *Surgical Neurology International*, 1, 96.
- Khalil, A. A., Kabapy, N. F., Deraz, S. F., & Smith, C., 2011, Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1816(2), 89–104.
- Kim, L., Huang, C., Morey, A.L. and Winder, M.J., 2015, Intraosseous Lipomatous Meningioma, *Case Reports in Neurological Medicine*, 2015, 482140.
- Kirkpatrick, D.B., 1984, The first primary brain-tumor operation, *Journal of Neurosurgery*, 61(5), 809-13.

- Kleihues, P., Cavanee, W.K., 2000, World Health Organisation classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the nervous system, *IARC Press*, 1(3), 314.
- Kleihues, P., Soylemezoglu, F., Schäuble, B., Scheithauer, B.W. and Burger, P.C., 1995, Histopathology, classification, and grading of gliomas, *Glia*, 15, 211-21.
- Komor, A.C., Badran, A.H. and Liu, D.R., 2017, CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes, *Cell*, 168(1-2), 20-36.
- Kumar, S., Tomar, M.S. and Acharya, A., 2013, HSF1-mediated regulation of tumor cell apoptosis: A novel target for cancer therapeutics, *Future Oncology*, 9(10), 1573-86.
- Li, D.C., Yang, F., Lu, B., Chen, D.F., & Yang, W.J., 2011, Thermotolerance and molecular chaperone function of the small heat shock protein HSP20 from hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* P2, *Cell stress & chaperones*, 17(1), 103-8.
- Li, G.C. and Werb, Z., 1982, Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(10), 3218-22.
- Li, J., Tang, C., Li, L., Li, R., Fan, Y., 2016, Quercetin blocks t-AUCB-induced autophagy by Hsp27 and Atg7 inhibition in glioblastoma cells in vitro, *Journal of neuro-oncology*, 129 (1), 39-45.
- Li, L., He, Z.Y., Wei, X.W., Gao, G.P. and Wei, Y.Q., 2015, Challenges in CRISPR/CAS9 Delivery: Potential Roles of Nonviral Vectors, *Human Gene Therapy*, 26(7), 452-62.
- Li, X.L., Li, G.H., Fu, J., Fu, Y.W., Zhang, L., Chen, W., Arakaki, C., Zhang, J.P., Wen, W., Cheng, T., ... Zhang, X.B., 2018, Highly efficient genome editing via CRISPR-Cas9 in human pluripotent stem cells is achieved by transient BCL-XL overexpression, *Nucleic acids research*, 46(19), 10195-215.
- Liao, W.Y., Lin, L.F., Jheng, J.L., Wang, C.C., Yang, J.H., & Chou, M.L., 2016, Identification of heat shock transcription factor genes involved in thermotolerance of octoploid cultivated strawberry, *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2130.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., 2003, Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(9), 712-20.
- Lima, F.R.S., Kahn, S.A., Soletti, R.C., Biasoli, D., Alves, T., da Fonseca, A.C.C., ... Moura-Neto, V., 2012, Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826(2), 338-349.
- Lindquist, S., 1986, The Heat-Shock Response, *Annual Review of Biochemistry*, 55, 1151-91.
- Long, C., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Mireault, A.A., Bassel-Duby, R., & Olson, E.N., 2014, Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA, *Science*, 345(6201), 1184-88.

- Louis, D.N., 2012, The next step in brain tumor classification: “let us now praise famous men” or molecules?, *Acta Neuropathologica*, 124(6), 761-2.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., 2016, The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary, *Acta Neuropathol*, 131, 803.
- Macario, J. L., Conway de Macario, E. and Cappello, F., 2013, The Chaperonopathies: Diseases with defective molecular chaperones, *Springer Briefs in Biochemistry and Molecular Biology*.
- Maeder, M.L. and Gersbach, C.A., 2016, Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy, *Molecular Therapy*, 24(3), 430-46.
- Maleki, F., Khosravi, A., Nasser, A., Taghinejad, H., & Azizian, M., 2016, Bacterial Heat Shock Protein Activity, *Journal of clinical and diagnostic research*, 10(3), 1-3.
- Masui, K., Cloughesy, T. F. and Mischel, P. S., 2012, Molecular pathology in adult high-grade gliomas: From molecular diagnostics to target therapies, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 38(3), 271-91.
- Maurizi, M. R. and Xia, D., 2004, Protein Binding and Disruption by Clp/Hsp100 Chaperones, *Structure*, 12(2), 175-83.
- Mayer, M. P. and Bukau, B., 2005, Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 670-84.
- Meca-Cortés, O., Guerra-Rebollo, M., Garrido, C., Borrós, S., Rubio, N., & Blanco, J., 2017, CRISPR/Cas9-Mediated Knockin Application in Cell Therapy: A Non-viral Procedure for Bystander Treatment of Glioma in Mice, *Molecular therapy Nucleic acids*, 8, 395-403.
- Meher, P. K., Sahu, T. K., Gahoi, S., & Rao, A. R., 2018, ir-HSP: Improved Recognition of Heat Shock Proteins, Their Families and Sub-types Based On g-Spaced Di-peptide Features and Support Vector Machine, *Frontiers in genetics*, 8, 235.
- Mendillo, M. L., Santagata, S., Koeva, M., Bell, G. W., Hu, R., Tamimi, R. M., ... Lindquist, S., 2012, HSF1 Drives a Transcriptional Program Distinct from Heat Shock to Support Highly Malignant Human Cancers, *Cell*, 150(3), 549–562.
- Mercier, P.A, Winegarden, N.A and Westwood, J.T., 1999, Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress, *Journal of cell science*, 112(16), 2765-74.
- Miller, D.W., Cookson, M.R. and Dickson, D.W., 2004, Glial cell inclusions and the pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Neuron Glia Biology*, 1(1), 13-21.
- Moghaddam, N., Mailler-Burch, S., Kara, L., Kanz, F., Jackowski, C., Lösch, S., 2015, Survival after trepanation-Early cranial surgery from Late Iron Age Switzerland, *International Journal of Paleopathology*, 11, 56-65.

- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. and Juez, G., 2000, Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria, *Molecular Microbiology*, 36, 244-6.
- Morano, K.A., Santoro, N., Koch, K.A., & Thiele, D.J., 1999, A trans-activation domain in yeast heat shock transcription factor is essential for cell cycle progression during stress, *Molecular and cellular biology*, 19(1), 402-11.
- Moses, C., Garcia-Bloj, B., Harvey, A. R., & Blancafort, P., 2018, Hallmarks of cancer: The CRISPR generation, *European Journal of Cancer*, 93, 10–18.
- Nagai, N., Nakai, A., Nagata, K., 1995, Quercetin suppresses heat shock response by down regulation of HSF1, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208(3), 1099-105.
- Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bergersen, L.H., Bjaalie, J.G., Eriksson, J., Gundersen, V., Leergaard, T.B., Morth, J.P., Storm-Mathisen, J., Torp, R., Walhovd, K.B., Tønjum T., 2013, The glia doctrine: addressing the role of glial cells in healthy brain ageing, *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(10), 449-59.
- Ndubaku, U. and de Bellard, M.E., 2008, Glial cells: Old cells with new twists, *Acta Histochemica*, 110(3), 182-95.
- Nilsson, M., Englund, E., Szczepankiewicz, F., van Westen, D., Sundgren, P.C., 2018, Imaging brain tumour microstructure, *NeuroImage*, 182, 232-50.
- Oslobanu, A. and Florian, S.I., 2015, Anatomic locations in high grade glioma, *Romanian Neurosurgery*, 29(3), 271-77.
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., Wrensch, M.R., ... Barnholtz-Sloan, J.S., 2014, The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review, *Neuro-oncology*, 16(7), 896-913.
- Önay-Uçar, E., 2009, Viscum album ekstrisinin C6 sıçan glioma hücrelerinde stres proteinlerinin anlatımı üzerine etkisi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Pankowicz, F.P. *et al.*, 2016, Reprogramming metabolic pathways in vivo with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia, *Nature Communications*, 7, 12642.
- Pearson, J.R.D. and Regad, T., 2017, Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17040.
- Petrelli, F., Pucci, L. and Bezzi, P., 2016, Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 21.
- Prabhakar, R., Haresh, K.P., Ganesh, T., Joshi, R.C., Julka, P.K., Rath, G.K., 2007, Comparison of computed tomography and magnetic resonance based target volume in brain tumors, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 3, 121-3.

Rajesh, Y., Biswas, A. and Mandal, M., 2017, Glioma progression through the prism of heat shock protein mediated extracellular matrix remodeling and epithelial to mesenchymal transition, *Experimental Cell Research*, 359(2), 299-311.

Reifenberger, G., Wirsching, H.G., Knobbe-Thomsen, C.B., Weller, M., 2017, Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(7), 434-52.

Richter, K., Haslbeck, M. and Buchner, J., 2010, The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death, *Molecular Cell*, 40(2), 253-66.

Ritossa, F., 1962, A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila, *Experientia*, 18(12), 571-3.

Roberts, J. L., Tavallai, M., Nourbakhsh, A., Fidanza, A., Cruz-Luna, T., Smith, E., Siembida, P., Plamondon, P., Cycon, K. A., Doern, C. D., Booth, L., ... Dent, P., 2015, GRP78/Dna K Is a Target for Nexavar/Stivarga/Votrient in the Treatment of Human Malignancies, *Viral Infections and Bacterial Diseases, Journal of cellular physiology*, 230(10), 2552-78.

Rowland, M. J. *et al.*, 2018, 'An adherent tissue-inspired hydrogel delivery vehicle utilised in primary human glioma models', *Biomaterials*, 179, 199-208.

Runge, V.M., Aoki, S., Bradley Jr, W.G., Chang, K.H., Essig, M., Ma, L., Ross, J.S., Valavanis, A., 2015, Magnetic resonance imaging and computed tomography of the brain - 50 years of innovation, with a focus on the future, *Investigative Radiology*, 50(9), 551-6.

Sánchez-Rivera, F. J., & Jacks, T., 2015, Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nature reviews, Cancer*, 15(7), 387-95.

Santagata, S., Hu, R., Lin, N. U., Mendillo, M. L., Collins, L. C., Hankinson, S. E., Schnitt, S. J., Whitesell, L., Tamimi, R. M., Lindquist, S., ... Ince, T. A., 2011, High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), 18378-83.

Scherer, H.J., 1938, Structural Development in Gliomas, *The American Journal of Cancer*, 34(3), 333-51.

Scherer, H. J., 1940a, A Critical Review: The Pathology Of Cerebral Gliomas, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 3(2), 147-77.

Scherer, H. J., 1940b, The forms of growth in gliomas and their practical significance, *Brain*, 63(1), 1-35.

Scott, K.A., Dennis, J.L., Dalglish, A.G., Liu, W.M., 2015, Inhibiting heat shock proteins can potentiate the cytotoxic effect of cannabidiol in human glioma cells, *Anticancer Research*, 35(11), 5827-37.

Shankar, G.M. *et al.*, 2018, Genotype-targeted local therapy of glioma, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(36), 8388-94.

- Shamovsky, I. & Nudler, E., 2008, New insights into the mechanism of heat shock response activation, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 855.
- Shergalis, A., Bankhead, A., Luesakul, U., Muangsin, N., 2018, Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma, *Pharmacological reviews*, 70(3), 412-45.
- Sherman, M., & Multhoff, G., 2007, Heat Shock Proteins in Cancer, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113(1), 192–201.
- Shui, B., Hernandez Matias, L., Guo, Y., & Peng, Y., 2016, The Rise of CRISPR/Cas for Genome Editing in Stem Cells, *Stem cells international*, 2016, 8140168.
- Smih, F., Rouet, P., Romanienko, P., & Jasin, M., 1995, Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells, *Nucleic acids research*, 23(24), 5012-9.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N. and Loeschcke, V., 2003, The evolutionary and ecological role of heat shock proteins, *Ecology Letters*, 6, 1025-37.
- Sorger, P.K., Lewis, M.J. and Pelham, H.R.B., 1987, Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells, *Nature*, 329(6134), 81-4.
- Sorger, P. K. and Pelham, H. R., 1987, Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast, *The EMBO journal*, 6(10), 3035-41.
- Soriano, V., 2018, Hot News: Hepatitis B Gene Therapy Coming to Age, *AIDS reviews*, 20(2), 125-7.
- Sriram, M., Osipiuk, J., Freeman, B., Morimoto, R., 1997, Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain, *Structure*, 5(3), 403-14.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C. & Doudna, J.A., 2014, DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9, *Nature*, 507(7490), 62-7.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., ... Mirimanoff, R.O., 2009, Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial, *The Lancet Oncology*, 10(5), 459-66.
- Subjectek, J. R., Sciandra, J. J. and Johnson, R. J., 198, Heat shock proteins and thermotolerance; A comparison of induction kinetics, *British Journal of Radiology*, 55(656), 579-84.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., Stahl, F.W., 1983, The double-strand-break repair model for recombination, *Cell*, 33(1), 25-35.
- Takata, M., Sasaki, M., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi Iwai, Y., Shinohara, A., ...Takeda, S., 1998, Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *The EMBO journal*, 17(18), 5497-508.

- Takii, R. and Fujimoto, M., 2016, Structure and Function of the HSF Family Members, *Heat Shock Factor*.
- Tamimi, A.F. and Juweid, M., 2017, Epidemiology and Outcome of Glioblastoma, *Glioblastoma*, 8.
- Tavallai, M., Booth, L., Roberts, J.L., Poklepovic, A. & Dent, P., 2016, Rationally Repurposing Ruxolitinib (Jakafi (®)) as a Solid Tumor Therapeutic, *Frontiers in oncology*, 6, 142.
- Tessari A., Salata E., Ferlin A., Bartoloni L., Slongo M.L., Foresta C., 2004, Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis, *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 10(4), 253-8.
- Thawani, J.P. and Brem, S., 2016, The Story of Glioblastoma: History and Modern Correlates, *Glioblastoma*, 1-9.
- Tissi res, A., Mitchell, H.K. and Tracy, U.M., 1974, Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs, *Journal of Molecular Biology*, 84, 389-98.
- Trent, J. D., 1996, A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea, *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 249-58.
- Tr der, S.E., Ebert, L.K., Butt, L., Assenmacher, S., Schermer, B., & Zevnik, B., 2018, An optimized electroporation approach for efficient CRISPR/Cas9 genome editing in murine zygotes, *PloS one*, 13(5), e0196891.
- Tsermoulas, G., Aidonis, A. and Flint, G., 2014, The skull of Chios: trepanation in Hippocratic medicine, *Journal of Neurosurgery*, 121(2), 328-32.
- Tytell, M., Greenberg, S. G., & Lasek, R. J., 1986, Heat shock-like protein is transferred from glia to axon, *Brain Research*, 363(1), 161–164.
- Verger, A. and Langen, K.J., 2017, PET Imaging in Glioblastoma: Use in Clinical Practice, *Glioblastoma*, 9.
- Vergheese, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K.A., 2012, Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiology and molecular biology reviews*, 76(2), 115-58.
- Vigneswaran, K., Neill, S. and Hadjipanayis, C.G., 2015, Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification, *Ann Transl Med*, 3(7), 95.
- Vihervaara, A., Sistonen, L., 2014, HSF1 at a glance, *Journal of Cell Science*, 127(2), 261-6.
- Wang, T., Shigdar, S., Gantier, M. P., Hou, Y., Wang, L., Li, Y., Shamaileh, H. A., Yin, W., Zhou, S. F., Zhao, X., ... Duan, W., 2015, Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies, *Oncotarget*, 6(42), 44191-206.

- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A., 2004, Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response, *Trends in Plant Science*, 9(5), 244-52.
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S.M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P.Y., Stupp, R., Reifenberger, G., 2015, Glioma, *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15017.
- Wenger, K.J., Wagner, M., You, S., Franz, K., Harter, P.N., Burger, M.C., Voss, M.H., Ronellenfitsch, M.W., Fokas, E., Steinbach, J.P. and Bähr, O., 2017, Bevacizumab as a last-line treatment for glioblastoma following failure of radiotherapy, temozolomide and lomustine, *Oncology letters*, 14(1), 1141-6.
- Westphal, M., Hilt, D.C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P.C., Whittle, I.R., Jääskeläinen, J., Ram, Z., 2003, A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma, *Neuro-Oncology*, 5(2), 79-88.
- Whittle, I. R., 2004, The dilemma of low grade glioma, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 75, 31-6.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H. and Doudna, J.A., 2012, RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea, *Nature*, 482(7385), 331-8.
- Wu, J., Liu, T., Rios, Z., Mei, Q., Lin, X., & Cao, S., 2017, Heat Shock Proteins and Cancer, *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(3), 226–256.
- Wu, Y., Liang D., Wang, Y., Bai, M., Tang, W., Li, J., 2013, Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9, *Cell Stem Cell*, 13(6), 659-62.
- Xia, A., He, Q., Wang, J., 2018, Applications and advances of CRISPR-Cas9 in cancer immunotherapy, *Journal of Medical Genetics*, 56, 4-9.
- Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N.S., Cai, W., Yang, G., Bronson, R., Crowley, D.G., Zhang, F., Anderson, D., Sharp, P., Jacks, T., 2014, CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver, *Nature*, 514(7522), 380-4.
- Yi, L., & Li, J., 2016, CRISPR-Cas9 therapeutics in cancer: promising strategies and present challenges, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1866(2), 197-207.
- Yang, M., Guo, W., Yang, C., Tang, J., Huang, Q., Feng, S., Jiang, A., Xu, X., Jiang, G., 2017, Mobile phone use and glioma risk: A systematic review and meta-analysis, *PloS one*, 12(5).
- Zaboikin, M., Zaboikina, T., Freter, C. and Srinivasakumar, N., 2017, Non-Homologous End Joining and Homology Directed DNA Repair Frequency of Double-Stranded Breaks Introduced by Genome Editing Reagents, *PloS one*, 12(1): e0169931.
- Zhao, Z., Shi, L., Zhang, W., Han, J., Zhang, S., Fu, Z. and Cai, J., 2017, CRISPR knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes, *Oncotarget*, 9(4), 5208-15.

Zolkiewski, M., Zhang, T. and Nagy, M., 2012, Aggregate reactivation mediated by the Hsp100 chaperones, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 520(1), 1-6.

Zorzi, E. and Bonvini, P., 2011, Inducible Hsp70 in the regulation of cancer cell survival: Analysis of chaperone induction, expression and activity, *Cancers*, 3(4), 3921-56.

Zülch, K.J., 1986, Brain Tumors: Their Biology and Pathology, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 3, 706.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Elçin GÜNGÖR
Doğum Yeri	BURSA
Doğum Tarihi	20.05.1994
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05384964100
E-Posta Adresi	gungorelcin@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	26.05.2016

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı