

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI**

**TRABECTEDİN'İN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDEKİ APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Emir BOZKURT

**Danışman
Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT**



MANİSA-2017

**Emir
BOZKURT**

**TRABECTEDİN'İN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEKİ APOPTOTİK VE OTOFAJİK
ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

2017

TEZ ONAYI

Emir BOZKURT tarafından hazırlanan "TRABECTEDİN'İN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEKİ APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması 17/04/2017 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak savunulmuş ve ~~oybirliği~~ oybirliği ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman **Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT**
Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi **Prof. Dr. Erdal BALCAN**
Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi **Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU**
Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi **Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ**
Ege Üniversitesi



Jüri Üyesi **Yard. Doç. Dr. Sultan GÜLÇE İZ**
Ege Üniversitesi



TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Emir BOZKURT



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	I
TABLO DİZİNİ	I
TEŞEKKÜR.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Glioblastoma Multiforme	7
2.2. p53 Ailesi ve GBM.....	9
2.3. p53 Ailesi ve Hücre Döngüsü	10
2.4 Programlı Hücre Ölümü	12
2.4.1. Apoptozis	12
2.4.1.1. İç Apoptotik Yolak.....	14
2.4.1.2. Dış Apoptotik Yolak	15
2.4.1.3. İç ve Dış Apoptotik Yolaklar Arasındaki Etkileşim	17
2.4.2. p53 Ailesi ve Apoptozis.....	18
2.4.3. Otofaji	19
2.4.3.1. p53 Ailesi ve Otofaji	23
2.4.4. Apoptozis ve Otofaji Arasındaki Bağlantılar.....	24
2.5. GBM’de Apoptozis ve Otofajiye Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları.....	26
2.6. Trabectedin	28
2.7. Tezin Amacı	30
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	32
3.1. Hücre Hatlarının Temini ve İdamesi	32
3.2. Stok Solüsyonların Hazırlanması	33
3.3. Hücrelerin Sayımı.....	34
3.4. Apoptozis’in Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler.....	34
3.4.1. Histon-İlişkili DNA Fragmentlerinin Ölçümü.....	35
3.4.2 Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Belirlenmesi	36
3.4.3. TMRE/HOECHST İkili Boyaması ile Apoptotik Hücrelerin Görüntülenmesi.....	36

3.4.4. Annexin V/7-AAD İkili Boyamasının Flowsitometrik Analizi ile Erken ve Geç Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi	37
3.4.5. Kaspaz 8 ve 9 İnhibitörleri ile İç ve Dış Apoptotik Yolakların Analizi ...	38
3.5. Otofaji Ölçülmesinde Kullanılan Yöntemler.....	39
3.5.1. Monodansylcadaverine (MDC) Boyaması ile Otofajik Vakuollerin Görüntülenmesi.....	39
3.6. Western Blot.....	39
3.7. Trabectedin - p53 İlişkisinin Pifithrin- α ile Araştırılması	41
3.8. siRNA Uygulamaları	41
3.9. Co – Immunoprecipitasyon.....	42
3.10. Hücre Döngüsü Faz Dağılımının Belirlenmesi	43
3.11. İstatistiksel Analiz	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	45
4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1.1. Trabectedin T98G Hücre Kültürlerinde Apoptozisi İndüklemektedir.....	45
4.1.1.2. Trabectedin ile İndüklenen Apoptoziste Hem İç Hem De Dış Yolak Aktive Olmaktadır.....	47
4.1.1.3. Trabectedin ile İndüklenen Apoptozis P63 Aracılı Olarak Gerçekleşmektedir.....	49
4.1.2. Trabectedin U-87 MG Hücre Kültürlerinde Otofajiyi İndüklemektedir ..	52
4.1.3. Trabectedin ile İndüklenen Otofaji P53 Aracılı Olarak Gerçekleşmektedir	53
4.1.4. Trabectedin BCL-2/Beclin-1 Heterodimerizasyonunda Ayrılmaya Yol Açarak Etki Göstermektedir	55
4.1.5. Trabectedin Etkisiyle Hücre Döngüsü S ve G2/M Fazlarında Durmaktadır	56
4.2. TARTIŞMA	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
6. KAYNAKLAR	70
7. ÖZGEÇMİŞ	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A1	Bcl-2-related protein A1 (Bcl-2-ilişkili Protein A1)
ANOVA	Analysis of variance (Varyans Analizi)
APAF1	Apoptotic Protein Activation Factor 1 (Apoptotik Protein Aktivasyon Faktörü 1)
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu)
ATG	Autophagy-related Genes (Otofaji-ilişkili Genler)
ATM	Ataxia-telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine Triphosphate (Adenozin Tri Fosfat)
ATR	Ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein
BAK	BCL2 Antagonist/Killer (Bcl-2 Antagonisti/Öldürücü)
BCL-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2 (B hücreli CLL/Lenfoma 2)
BCL-W	Bcl-2-like protein 2 (Bcl-2 Benzeri Protein 2)
BCL-XL	B-Cell CLL/Lymphoma 2 - Extra Large
Beclin1	Moesin-Like BCL2 Interacting Protein (Moezin-benzeri Bcl-2 ile Etkileşen Protein)
BH	Bcl-2 Homolog Domain
BID	BH3 Interacting Domain Death Agonist (BH3 ile Etkileşen Ölüm Agonisti Domain)
BIK	BCL2 Interacting Killer (Bcl-2 ile Etkileşen Öldürücü Protein)
BIM	Bcl-2-like protein 11 (Bcl-2 Benzeri Protein 11)
BIR	Baculoviral IAP Repeat (Baculoviral IAP Tekrarı)
CAD	Caspase-activated DNase (Kaspazlar ile Aktive Edilen DNaz)
CARD	Caspase Recruiting Domain (Kaspaz Toplayıcı Domain)
Caspase	Cysteine-Aspartic Acid Protease (Kaspaz, Sistein Aspartik Asit Proteaz)
CCL	C-C Motif Chemokine Ligand (C-C Motif Kemokin Ligandı)

CD95	Cluster of Differentiation (Farklılaşma Kümesi 95)
CDC	Cell Division Cycle (Hücre bölünme döngüsü)
CDK	Cyclin Dependent Kinase (Siklin Bağımlı Kinaz)
C-IAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis (Hücrel Apoptozis İnhibitörü)
CQ	Chloroquine (Kloroquin)
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand (C-X-C Motif Kemokin Ligandı)
DAPK	Death Associated Protein Kinase (Ölüm İlişkili Protein Kinaz)
DBD	DNA bağlanma Domaini
DED	Death Effector Domain (Ölüm Efektörü Domain)
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with Low PL (Düşük PL’de doğrudan IAP’a Bağlanan Protein)
DISC	Death-inducing Signaling Complex (Ölüm-indükleyici Sinyalizasyon Kompleksi)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DRAM	Damage-regulated Autophagy Modulator (Hasar ile Düzenlenen Otofaji Modülatörü)
E2F	E2 Factor (E2 Faktör)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzim-bağlı İmmünosorbent Test)
FADD	Fas-associated death domain (Fas-ilişkili Ölüm Domaini)
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötal Sığır Serumu)
FDA	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death (Bcl-2 İlişkili Hücre Ölümü Agonisti)
FDA	Food and Drug (Gıda ve İlaç Dairesi)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (Floresan İzotiyosiyanat)

FLIP	FADD-like IL-1 β -converting Enzyme Inhibitory Protein (FADD Benzeri IL-1 β -dönüştürücü Enzim Baskılayıcı Protein)
FMK	Fluoromethyl Ketone (Florometil Keton)
FoxO3	Forkhead Box O3
GADD45A	Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha (Büyüme Durması ve DNA Hasarı ile İndüklenebilen Alfa)
GBM	Glioblastoma Multiforme
HCQ	Hydroxychloroquine (Hidroksikloroquin)
HSP	Heat Shock Protein (Isı Şok Protein)
IAP	Inhibitor of Apoptosis (Apoptosis İnhibitörü)
IDH	İzositrat Dehidrogenaz
JNK	c-Jun N-terminal kinase 1
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KTB	Kan Tümör Bariyeri
LC3	Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 (Mikrotübül İlişkili Protein 1 Hafif Zincir 3)
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia 1 (Miyeloid Hücreli Lösemi 1)
MDC	Monodansylcadaverine (Monodansilkadaverin)
MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog
MDR	Multidrug resistance-associated Protein (Çoklu İlaç Direnci İlişkili Protein)
MEM	Minimum Essential Medium
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (Mitokondri Dış Membranının Permeabilizasyonu)
M-PER	Mammalian Protein Extraction Reagent (Memeli Protein Ekstraksiyon Solüsyonu)
MPF	Maturation Promoting Factor
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin (Rapamisin'in Memelilerdeki Hedefi)
NER	Nucleotide Excision Repair (Nükleotid Kesip-Çıkarma Tamiri)

NF-Y	Nuclear Transcription Factor Y (Nüklear Transkripsiyon Faktörü Y)
NOXA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
OD	Oligomerizasyon Domaini
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Poliakrilamid Jel Elektroforezi)
PBS	Phosphate-buffered saline (Fosfat ile tamponlanmış tuz solüsyonu)
PCD	Programmed Cell Death (Programlı hücre ölümü)
PE	Phosphatidylethanolamine (PE, Fosfatidiletanolamin)
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase (Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfonat 3-Kinaz)
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog (Fosfataz ve Tensin Homolog)
PTX3	Pentraxin 3
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis (p53 ile Sentezi Arttırılan Apoptozis Modülatörü)
RIPK	Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1 (Reseptörle Etkileşen Serin/Treonin Kinaz 1)
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases (Kaspazların Mitokondri Kaynaklı İkinci Aktivatörü)
SQSTM	Sequestosome 1
SRF	Serum Response Factor (Serum Yanıt Faktörü)
TAD	Transaktivasyon Domaini
TBP	TATA Binding Protein (TATA'ya Bağlanan Protein)
TBS	Tris Buffered Saline (Tris ile tamponlanmış Tuz solüsyonu)
TMRE	Tetramethylrhodamine Ethyl Ester (Tetrametilrodamin Etil Ester)
TMZ	Temozolomide (Temozolomid)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü 1)

TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor (TNF-ilişkili Apoptozis-indükleyici Ligand-Reseptörü)
ULK1	Unc51-like autophagy-activating kinase 1 (Unc51-benzeri Otofaji-aktive edici Kinaz 1)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
XPD	Xeroderma Pigmentosum



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Apoptozis sırasında gözlenen morfolojik değişiklikler	13
Şekil 2.2. Apoptotik sinyal yolları	18
Şekil 2.3. Otofajik sinyal yolları	22
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının faz kontrast mikroskopunda çekilen görüntüleri	33
Şekil 4.1. Trabectedin'in artan konsantrasyonlarıyla 24 ve 48 saat muamele edilen T98G hücre kültürlerinde histon-iliskili DNA fragmentasyonu (A ve B) ve kaspaz 3/7 aktivitesi (C ve D) ile apoptozisin gösterilmesi (PK: Pozitif Kontrol, K: Kontrol).	45
Şekil 4.2. 13 nM Trabectedin ile 48 saat muamele edilen T98G hücre kültürlerinde nuklear morfoloji ve mitokondriyal membran potansiyelinin Hoechst/TMRE boyaması ile floresan mikroskopta analizi.....	46
Şekil 4.3. 13 nM Trabectedin ile 48 saat muamele edilen ve edilmeyen T98G hücre kültürlerinde erken ve geç apoptotik hücreleri belirlemek için Annexin V/7-AAD boyamasının flow sitometrik analizi	47
Şekil 4.4. : Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen T98G hücre kültürlerinde kaspaz 8 ve kaspaz 9 inhibitörleri varlığında/yokluğunda histon-iliskili DNA fragmentasyonu ölçümü (A ve C), dış ve iç apoptotik yollar ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve verilerin kantifikasyonu (B ve D)	48
Şekil 4.5. Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen T98G hücre kültürlerinde p53, p63 ve p73 protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması (A ve B). p63 ekspresyonunun siRNA ile baskılanması (B ve C).....	50
Şekil 4.6. Trabectedin'in p63 ekspresyonu baskılanan ve baskılanmayan T98G hücre kültürlerinde Annexin V/7-AAD değişimi ve histon-iliskili DNA fragmentasyonu üzerindeki etkileri.....	51
Şekil 4.7. 5 nM Trabectedin ile 48 saat muamele edilen ve edilmeyen U-87 MG hücre kültürlerinde otofajik vakuollerin görüntülenmesi (A) ve LC3-I, LC3-II ve SQSTM1/P62 protein ekspresyon düzeylerinin ölçümü (B ve C)	52
Şekil 4.8. p53 inhibitörü varlığında ve yokluğunda Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen U-87 MG hücre kültürlerinde otofajik vakuollerin floresan mikroskop ile görüntülenmesi (A) ve görüntülerin kantifikasyonu (B).....	54
Şekil 4.9. p53 inhibitörü varlığında ve yokluğunda Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen U-87 MG hücre kültürlerinde LC3-I, LC3-II ve SQSTM1/P62, DAPK1, DRAM1 ve JNK 1-2-3 protein ekspresyon düzeylerinin ölçümü ve verilerin kantifikasyonu.....	55

Şekil 4.10. U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde p53 inhibitorü veya p63 siRNA'sı varlığında ve yokluğunda Beclin-1/BCL-2 hetero-dimerizasyonunun Trabectedin aracılı olarak ayrılıp ayrılmadığının CO-IP ve western blot yöntemleriyle araştırılması	56
Şekil 4.11. Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde propidyum iyodid boyaması ile hücre döngüsü faz dağılımının belirlenmesi.....	57



TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Western blot deneylerinde kullanılan antikorlar	Sayfa 40
---	--------------------



TEŐEKKÖR

Lisansüstü eğitimin başta olma üzere hayatımın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren Harika Atmaca ve Burçak Karaca'ya; çalışmanın gerçekleştirilmesi için gerekli laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren Rüçhan Uslu'ya; doktora eğitimin son döneminde bana danışmanlık yaparak tezimin bitmesine olanak sağlayan Feyzan Özdal Kurt'a, bu tez çalışmasına maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a (proje numarası: 114Z545) ve sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Emir BOZKURT
Manisa, 2017



ÖZET

Doktora Tezi

TRABECTEDİN'İN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEKİ APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

EMİR BOZKURT

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT

Glioblastoma yetişkinlerde en sık rastlanan beyin tümörüdür. Tümörün aşırı invazif karakteri, beyindeki lokalizasyonu, kan beyin bariyeri ve hücrelerin kemoterapi/radyoterapiye karşı doğal direnci, standart tedavi seçeneklerine yanıt oluşumunu engellemekte ve kötü prognoza neden olmaktadır. Bu nedenle, glioblastoma tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Günümüzde kanser tedavisi için klinik kullanım onayı almış yalnızca 4 adet denizel kaynaklı antikanser ilaç bulunmaktadır. Bunlar arasında en umut vadeci olarak bilinen Trabectedin, yumurtalık ve sarkoma tümörlerinin klinik tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, glioblastoma hücre kültürlerinde Trabectedin ile indüklenen hücre ölüm mekanizmalarının detaylı olarak aydınlatılmasıdır.

Apoptozis'in gösterilmesinde DNA fragmentasyonu, kaspaz 3/7 aktivitesi, TMRE/Hoechst ve Annexin V/7-AAD boyamaları, Kaspaz 8 / 9 inhibitörleri ve iç/dış apoptotik yolda rol oynayan proteinlerin ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Otofajinin araştırılması için MDC boyaması, LC3-I/II dönüşümü, SQSTM1/p62 ve Beclin1 ekspresyon düzeyleri ölçüldü. p53 ailesi üyelerinin Trabectedin aracılı hücre ölümü üzerindeki rolleri siRNA ve spesifik inhibitörler ile araştırıldı. Trabectedin'in apoptozis ve otofaji arasındaki önemli etkileşimlerden biri olan Bcl-2/Beclin-1 dimerizasyonu üzerindeki etkisi co-immunopresipitasyon yöntemiyle araştırıldı.

Trabectedin'in T98G hücre kültürlerinde hem iç hem de dış yolağı aktive ederek apoptozisi indüklediği belirlendi. Bu apoptotik etkinin p63 aracılı olarak gerçekleştiği saptandı. U-87 MG hücrelerinde ise, otofajinin indüklendiği ve otofajinin p53 aracılı olarak gerçekleştiği belirlendi. Bcl-2/Beclin-1 dimerizasyonunun Trabectedin etkisiyle her iki hücre kültüründe de ayrıldığı gösterildi. Sonuç olarak, bu preliminar çalışma Trabectedin'in GBM tedavisi için umut vadeci bir aday olabileceğini göstermektedir. Trabectedin'in apoptotik ve otofajik etkilerinin in vivo GBM modellerinde araştırılacağı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Glioblastoma, Otofaji, p53 ailesi, Trabectedin.

2017, 91 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF APOPTOTIC AND AUTOPHAGIC EFFECTS OF TRABECTEDIN ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINES

EMIR BOZKURT

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT

Glioblastoma is the most common brain tumor in adults. Features of the tumor such as invasiveness, localization, natural resistance against chemo/radiotherapy and blood brain barrier prevent the response to standard treatment options and lead to poor prognosis. Therefore, new treatment options are urgently needed.

Today, there are only 4 marine-derived drugs approved for clinical cancer treatment. Probably the most promising one among them, Trabectedin, is currently in use for treatment of ovarian and sarcoma tumors. The aim of this study was to investigate Trabectedin-induced cell death mechanisms in glioblastoma cell cultures.

DNA fragmentation, caspase 3/7 activity, TMRE/Hoechst and Annexin V/7-AAD staining, caspase 8/9 inhibitors and expression levels of key proteins in both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways were investigated to show apoptosis. To investigate autophagy, MDC staining, LC3-I to II conversion and expression levels of SQSTM1/p62 and Beclin-1 proteins were measured. The role of p53 family proteins in Trabectedin-induced cell death was investigated by using siRNAs and specific inhibitors. The effect of Trabectedin on Bcl-2/Beclin-1 dimerization, which is one of the important crosstalks between apoptosis and autophagy, was measured by using co-immunoprecipitation.

Trabectedin induced both intrinsic and extrinsic apoptosis in T98G cell cultures. Moreover, it was found that apoptotic effect of Trabectedin is mediated by p63. On the other hand, in U-87 MG cell line, Trabectedin induced autophagy and this induction was found to be mediated by p53. In conclusion, this preliminary study indicates that Trabectedin might be a good candidate for the treatment of GBM. Further studies are needed to evaluate apoptotic and autophagic effects of Trabectedin on in vivo GBM models.

Keywords: Apoptosis, Autophagy, Glioblastoma, p53 family, Trabectedin.

2017, 91 pages.

1. GİRİŞ

İç ve/veya dış stres koşulları nedeniyle hücre çoğalmasını doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyen mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar, hücrelerin bulundukları dokudan farklılaşmasını ve çoğalma kontrollerini kaybetmesiyle sonuçlanabilir. Bu anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve dolaşım (kan ve lenf) sistemlerini kullanarak vücudun diğer bölgelerine yayılması özelliklerini gösteren hastalıklara genel olarak kanser adı verilir. Kanserler köken aldıkları dokulara göre isimlendirilir ve 100'ün üzerinde kanser çeşidi tanımlanmıştır. Örneğin, epitelial hücrelerinden köken alan kanserler “karsinom”, mezoderm hücrelerinden köken alan kanserler “sarkom”, salgı bezi hücrelerinden köken alanlar ise “adenokarsinom” adını alırlar.

Douglas Hanahan ve Robert A. Weinberg, 2000 yılında kanserin altı karakteristik özelliğini; (1) çoğalma sinyalizasyonunu sürdürebilme, (2) çoğalmayı baskılayıcı etkenlerden kaçabilme, (3) invazyon ve metastazı aktive edebilme, (4) sınırsız bölünebilme, (5) anjiyogenezi indüklemeye ve (6) hücre ölümüne karşı direnç geliştirme olarak tanımlamıştır. 2011 yılında yaptıkları güncellemede ise (7) hücre metabolizmasını yeniden düzenleyebilme ve (8) bağışıklık sisteminden kaçabilmeyi eklemiştir [1].

Kanser hücrelerinin aşırı çoğalmasıyla dokularda meydana gelen ve büyüme eğilimi gösteren kitlelere malign (kötü huylu) tümör adı verilir. Merkezi sinir sisteminde nöronların çevresinde bulunan ve onlara destek sağlayan glial hücrelerin (çoğunlukla astrositler veya oligodendrositlerin) kanserleşmesiyle oluşan tümörler glial tümörler veya gliomalar adını alır. Son 10 yıllık dönemde gliomaları sınıflandırma alanında yaşanan gelişmeler sonucunda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2016 yılında merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılmasını güncellemiştir [2]. WHO sınıflandırması tümörün histolojik seviyesini I ile IV arasında derecelendirmektedir ve bu derecelendirmeyi baskın olan sitolojik tipi temel alarak yapmaktadır. Sınıflandırma yapılırken hücre yoğunluğu, nükleer atipi, vasküler hiperplazi ve nekroz seviyesindeki artış tümörün histolojik seviyesini belirlemede kullanılan kriterlerdir. Seviye I ve II gliomalar bulundukları dokudan farklılaşmıştır ve genellikle tedaviye iyi cevap verdiklerinden “düşük seviye” olarak tanımlanırlar.

Seviye III gliomalar, düşük seviye gliomalara göre daha hızlı gelişir ve daha agresiftir. Ayrıca çevredeki beyin dokusunu tentakül benzeri yapılarla istila ederek ameliyatla tümörün kesilip alınmasını oldukça zor hale getirirler. III. seviye gliomalar genellikle tekrar etme eğilimindedir ve tekrar ettiklerinde seviye IV'e dönüşürler [2].



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glioblastoma Multiforme

Dördüncü seviye bir glioma olan Glioblastoma veya diğer ismiyle Glioblastoma multiforme (GBM), en sık görülen beyin tümörü olup tüm kanser tipleri arasında en agresif ve kemoterapi/radyoterapiye karşı en dirençli tümör olarak tanımlanmıştır. GBM'nin köken aldığı hücre tipi henüz tam olarak tanımlanamasa da çoğunlukla astrosit ve oligodendrositlerden köken aldığı bilinmektedir. Tüm glial tümörlerin %70'ini oluşturan GBM'nin insidansı yılda 100.000'de 3-4'tür. Palyatif tedavi 6-9 ay ortalama sağkalım olasılığı sunmaktadır ve bu sağkalım radyoterapi ile 12 aya, radyo-kemoterapi ile ise 16 aya kadar çıkarılabilmektedir. Operasyon sonrası sağkalım 12 (%50) - 24 (%20) ay arasındadır ve vakaların %2'sinde 36 aya kadar ulaşabilir. GBM her yaşta görülebilir, ancak en sık (%70) 45 ve 70 yaşlar arasında gözlenmektedir. Lösemiden sonra çocuklarda ikinci, yetişkinlerde ise üçüncü en sık kansere bağlı ölüm sebebidir. Ölüm genel olarak serebral ödem sonucunda kafatası içerisindeki basıncın artması ve dikkat eksikliği nedeniyle gerçekleşmektedir [3]. Tümörün bulunduğu yere bağlı olarak; baş ağrısı, nöbet, kavrama yeteneğinde ve kişilikte değişiklikler, yürüyüşte denge kaybı, duyu kaybı ve idrarını tutamama glioblastomanın başlıca belirtileridir [4].

GBM herhangi bir belirti oluşturmada bir anda "de novo" hızlıca ortaya çıkabilir ve bu tip tümörler primer GBM adını alır. Buna karşın düşük seviye gliomalardan yavaş yavaş (5-10 yılda) da gelişebilir ve bunlar ise sekonder GBM olarak isimlendirilir. Primer GBM'ler tüm tümörlerin %90'ını kapsar ve genellikle 60 yaşın üzerindeki kişilerde tanıdan sonraki bir yıl içerisinde ortaya çıkar. Sekonder GBM'ler ise daha enderdir (%10) ve daha genç bireylerde gözlenir (ortalama 45 yaş). Bu tümörler daha uzun klinik geçmiş içerirler ve primer GBM'ye göre tedaviye daha duyarlıdır. Bu iki tip GBM morfolojik olarak benzer olsa da farklı genetik özelliklere sahiptir. Primer GBM'ler özellikle EGFR (epidermal çoğalma faktörü reseptörü) amplifikasyonu (%36), p16INK4a (p16 siklin bağımlı kinaz inhibitör 4a) delesyonu (%31), PTEN (fosfataz ve tensin homolog) mutasyonu (%25) ve p53 mutasyonu (%30) ile karakterizedir. Buna karşın sekonder GBM'lerde daha yüksek p53 mutasyonu (%65) gözlenirken, EGFR amplifikasyonu (%8), p16INK4a

delesyonu (%19) ve PTEN mutasyonun (%4) daha düşüktür. Hem primer hem de sekonder GBM'lerde monozomi 10 gözlenir (toplamda yaklaşık %70). Bu monozomi tüm kromozom 10'u etkileyebileceği gibi, özellikle primer GBM'lerde yalnızca kromozomun uzun kolunu da (10q' da heterozigosite kaybı) etkileyebilir [3].

Son dönemde izositrat dehidrogenaz 1 ve 2'yi kodlayan gende (IDH) belirlenen değişiklikler GBM'nin tanı ve tedavisinde önemli gelişmelere yol açmıştır. IDH1 değişiklikleri genelde sekonder GBM'de gözlenirken, primer GBM'de neredeyse hiç gözlenmez. Bu farklılık bu iki tümör tipinin ayrıştırılmasına olanak sağlamaktadır. IDH1/IDH2 genlerindeki mutasyonlar ayrıca tümörün glial tümör olduğunu doğrulamakta ve seviye II gliomalarla seviye I gliomaların (pilositik astrositoma) ayrıştırılmasında kullanılır (bu mutasyonlar pilositik astrositomada gözlenmez). Düşük seviye gliomaların %70'inden fazlasında IDH1 veya IDH2 mutasyonu gözlenirken, primer GBM'lerin %5'inde ve sekonder GBM'lerin %80'inde IDH1 mutasyonu görülür [3].

WHO 2016 sınıflandırmasına göre glioblastomalar:

1- IDH sağlam tip glioblastomalar: Hastaların yaklaşık %90'ını içerir ve çoğunlukla 55 yaşın üzerindeki kişilerde gözlenen ve klinikte primer veya de novo olarak tanımlanan tümörleri kapsar.

2- IDH mutant (R132H) glioblastomalar: Hastaların yaklaşık %10'unda gözlenen bu tip, primer düşük seviyeli gliomaların nüks etmesiyle oluşur ve daha genç kişilerde rastlanır.

3- IDH durumu tam olarak tanımlanamayan NOS (not otherwise specified – kategorize edilemeyen, spesifik olarak tanımlanamayan) glioblastomalar: Bu grup IDH'nin genetik ölçümünün tam olarak yapılamadığı hastaları içerir.

2016 yılı WHO sınıflandırmasında yeni bir glioblastoma tipi de "Epiteloid glioblastomalar (Ep-GBM)" adı verilerek tanımlanmıştır. Bu grup, IDH sağlam tip glioblastomalar altında dev hücreli glioblastoma ve gliosarkomayı sınıflandırmaya eklemiştir. Ep-GBM'ler, bolca eozinofilik sitoplazma içeren, veziküler kromatin ve göze çarpan (melanoma benzeri) nukleoluslara (nucleoli) sahip olup çeşitli görünüşte rabdoid hücre bulundurmalarıyla karakterize edilmiştir. Ep-GBM'lerin genel olarak çocuklarda ve genç yetişkinlerde görüldüğü, tipik olarak yüzeysel serebral bölge

veya diensefalon (ara beyin) bölgesinde bulunduğu ve BRAF V600E mutasyonu (immunohistokimya ile belirlenebilir) taşıdığı bilinmektedir [2]. Ep-GBM'ler, IDH sağlam tip glioblastomalarda gözlenen EGFR amplifikasyonu ve kromozom 10 kaybı gibi moleküler özellikleri taşımazlar. Bunun yerine, ODZ3'te sıklıkla hemizigot delesyonlar gözlenir [2].

2.2. p53 Ailesi ve GBM

Tümör baskılayıcı p53 (kısaca p53), hücrede genomik bütünlüğün korunmasında ve hücre döngüsünün kontrolünde en kilit moleküllerden biridir. Bu nedenle p53'ün hücredeki düzeyi çok sıkı bir şekilde kontrol altındadır. p53 proteininin yarı ömrü çok kısadır ve genellikle hücrede aşırı derecede düşük seviyede bulunur. Strese, DNA hasarına veya mutajenik stimulasyona cevap olarak, p53 aktive ve stabilize edilerek sinyalizasyonun başlatılmasını sağlar. p53 aktivasyonu genellikle hücre döngüsünde duraksamaya, sinyalizasyonda kontrole ve takiben hücre ölümüne neden olur. p53'ün tanımlanmasından yaklaşık 10 yıl sonra p63 ve p73 olmak üzere 2 adet daha p53 ailesi üyesi keşfedilmiştir. p53'e benzer olarak hem p63 hem de p73, bir amino-terminal transaktivasyon domaini (TAD), bir DNA bağlanma domaini (DBD) ve bir karboksil-terminal oligomerizasyon domaini (OD) içermektedir. p63 ve p73 DBD'lerinin, p53 ile % 60'ın üzerinde benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu benzerlik p63 ve p73'e, p53'ün hedef genlerini düzenleyebilme, p53'e benzer olarak hücre döngüsünü durdurabilme ve apoptozisi indükleyebilme gibi özellikler göstermelerine olanak sağlamaktadır. Bu üç proteinin benzer yapı ve fonksiyon göstermelerine karşın, birbirlerinden ayrı görevleri olduğu da ortaya çıkarılmıştır. Örneğin p53 ekspresyonu engellenmiş farelerin embriyonik olarak sorunsuz bir şekilde gelişebildiği gösterilirken, p63 ekspresyonu engellenmiş farelerde dudak, deri ve diğer epitel dokularda birçok gelişimsel defekt olduğu, bunun sonucunda da doğumdan sonraki birkaç gün içinde farelerin öldüğü gözlenmiştir. p73 ekspresyonu engellenmiş farelerin ise sinir sisteminde ve inflamasyonda defektler gösterdiği gözlenmiştir [5].

p53, p63 ve p73 genleri kromozom 17 (17p13.1), 3 (3q27-29) ve 1 (1q36)'de lokalize olmakta ve her üç gen de çok sayıda henüz görevleri tam olarak anlaşılamamış farklı izoformlar halinde sentezlenmektedir. p53 geninin tüm

kanserlerde yaklaşık %50 oranında biallelik mutasyon veya delesyon gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca p53 sentezi baskılanmış farelerin erken dönemde tümör geliştirdiği gösterilmiştir. p63 ve p73 üzerinde yapılan çalışmalar onların da çoğunlukla kanserlerde mutasyona veya delesyona uğradığını ortaya koymuştur. Bu gözlemin ardından, p63 ve p73'ün, p53'ün etkisini hücre kültürlerinde taklit ettikleri bulunmuş ve gerçekten de p53 gibi tümör baskılayıcı etki gösterdikleri ortaya çıkarılmıştır [5]. Hücrede normal durumda p53, MDM2 (mouse double minute 2 homolog) olarak bilinen ve p53'ü hedefleyen bir E3 ubiquitin-protein ligaz tarafından sürekli olarak yıkılır. Bu yıkım N-terminal domain ile bağlanma yoluyla gerçekleşir ve MDM2 mutasyonu olsa dahi bu bağlanmayla p53 inaktif formda tutulur. MDM2'nin ayrıca p73 ve p63'le etkileştiği de gösterilmişse de, MDM2 bu proteinlerin ubiquitinasyonu veya yıkımına neden olmaz [6].

Hem primer hem de sekonder GBM'de p53 geninde değişiklikler önemli belirteçlerden biridir. p53 mutasyonlarının, GBM'nin özellikle düşük seviye astrositom veya anaplastik astrositomların progresyonu üzerinde etkisi olduğu ortaya çıkarılmıştır. GBM'lerde p53 mutasyonunun primerlere kıyasla (<%35) sekonderlerde daha fazla gözlemlendiği (>90%) rapor edilmiştir. Gözlenen p53 aktivite kaybının ya ekzon 5-8'de gözlenen mutasyona ya da kromozom 17'nin homozigot veya heterozigot kısmı (partial) delesyonu sonucu ortaya çıktığı bulunmuştur [7]. p53'ün GBM'deki rolü birçok çalışmayla ortaya koyulmuştur. Buna karşın p63 ve p73'ün rollerinin araştırıldığı çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Yamaki ve ark, p63 ekspresyonunun GBM'de iyi prognozla ilişkili olduğunu ve temozolomide karşı cevapta p63'ün MYC transkripsiyonunu doğrudan baskıladığını göstermiştir [8]. Landre ve ark ise p73'ün GBM'nin *in vitro* modellerinde hücre migrasyonu ve invazyonunu arttırdığını rapor etmiştir [9].

2.3. p53 Ailesi ve Hücre Döngüsü

p53'ün dizi spesifik bir transkripsiyon düzenleyicisi olması ve hem DNA'ya hem de proteinlere doğrudan bağlanma özelliği göstererek stres koşullarında hücrede apoptozis, yaşlanma, farklılaşma, DNA tamiri ve anjiyogenezin baskılanması gibi çok sayıda hücresel cevap oluşmasında başlatıcı protein olması, onu kanser için en önemli hedeflerden biri yapmaktadır. p53 gösterdiği bu özelliklerle stres durumunda

hücrenin akıbetine karar vermedeki en kritik moleküldür. Ancak bu kararın verilebilmesi için hücrenin, bölünme sürecinde belli aşamalarda duraksaması ve gerekli kontrollerin yapılması gerekir. Memeli hücrelerinde hücre döngüsü G1, S, G2 ve M olmak üzere 4 ana fazdan oluşur. Bu 4 ana faz G1/S, S ve G2/M faz geçişlerinde kontrol edilerek hücre sağkalımı için olası bir risk durumunda döngü durdurulup, tamir veya hücre ölümü kararı verilir. Hücre döngüsünde bir fazdan diğerine geçiş siklin bağımlı kinazların (Cdks) fosforilasyonu ve/veya defosforilasyonu ile düzenlenir. G1/S faz geçişi, hücre DNA'sı hasarlı ise DNA replikasyonu başlamadan önce döngünün durdurulduğu evredir. Siklin D/cdk4, siklin E/cdk2 ve siklin A/cdk2 kompleksleri sırasıyla tümör baskılayıcı pRb ailesi proteinlerini fosforiller ve sonuçta DNA replikasyonu ile ilişkili E2F transkripsiyon faktörü ailesi üyelerinin transaktivasyonu gerçekleşir. DNA hasarı sonucu p53 aktivasyonu, cdk inhibitörü p21 ekspresyonunun artmasını sağlar. p21 aktive olup nukleusa transloke olur ve burada cdk'ları baskılayıp E2F ailesi aracılı gerçekleşen transkripsiyonu engelleyerek hücre döngüsünün durmasını sağlar [10]. S fazı sırasında gerçekleşen kontrol, siklin bağımlı kinazlar (özellikle cdk7), ATM/ATR gibi DNA hasarını belirleyen proteinler, p53 ve p21 ile birlikte yürütülen ancak küçük farklılıklar içeren 3 değişik aşama içerir. Birinci aşama, polimeraz inhibisyonu ve nükleotid azaltma yoluyla replikasyon çatalının ileri kaydırılması (ertelenmesi) ile replikasyon kontrolü; ikinci aşama intra-S-fazı kontrolü olarak da bilinen, DNA hasarı saptandığında replikonun dışında replikasyondan bağımsız olarak gerçekleşem kontrol; üçüncüsü de hücre DNA'sı doğru bir şekilde ikilendikten sonra oluşan hasarlarda bölünmenin durdurulmasını sağlayan S/M kontrolüdür. G2/M faz geçişinin kontrolü ise bir siklin B1/cdc2 kompleksi olan maturation promoting factor (MPF) ile düzenlenir. Siklin B1 ve cdc2 G2 fazı sürecinde sitoplazmada birikir ancak bu kompleks cdc2'nin fosforilasyonu ile inaktif durumda bulunur. Bu kompleksin nukleusa transloke olup Cdc25 fosfataz tarafından defosforile olması mitozun başlayacağı anlamına gelir. DNA hasarı durumunda siklin B1/cdc2 kompleksi, ATM ve ATR ile bunların downstream substratları Chk1 ve Chk2'yi içeren sinyalizasyonla baskılanır. Chk1 ve Chk2 DNA hasarı tanınmasının ardından Cdc25C'yi fosforile eder. Bu modifikasyon 14-3-3 proteinler için bağlanma bölgesi oluşturur ve bu ilişki Cdc25C'nin sitoplazmaya çıkmasını ve fosfataz aktivitesi göstermesini engeller [10, 11]. p53 ailesi diğer üyeleri olan p63 ve p73'ün de, gösterdikleri yapısal benzerlikten

dolayı p53 ile benzer mekanizmalar üzerinden hücre döngüsünü etkilediği bilinmektedir [12].

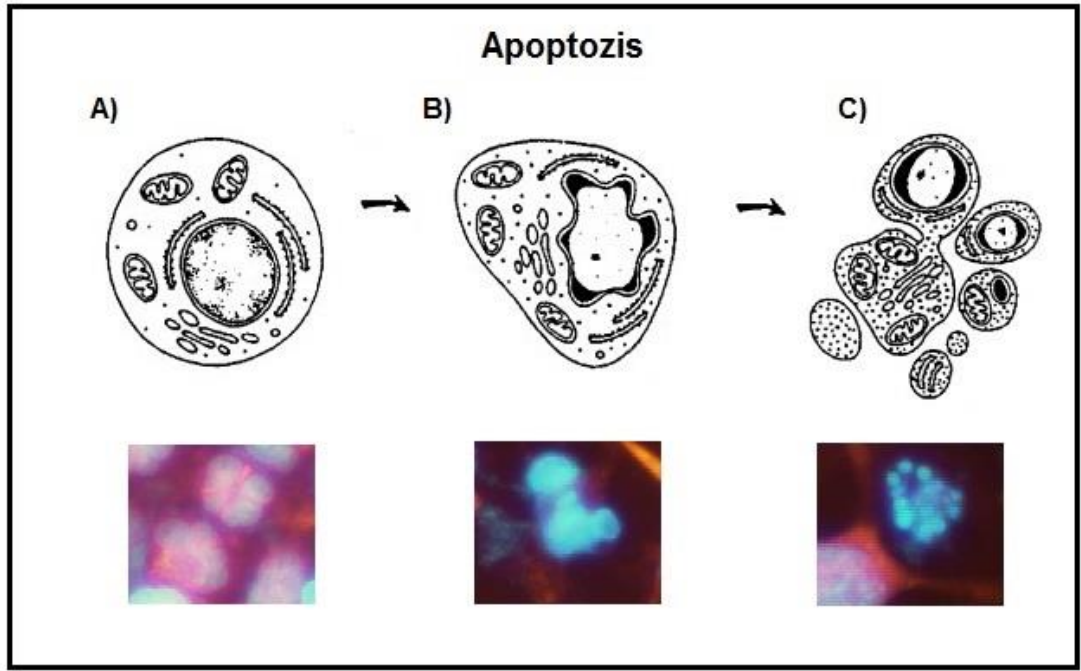
2.4 Programlı Hücre Ölümü

Çok hücreli organizmalar, anormal, fazla üretilmiş (bazı durumlarda hücreler fazla sayıda üretilir ve yalnızca fonksiyonel olanlar sağkalır – örn: sinir sistemi) ve potansiyel tehlike içeren hücreleri ortadan kaldırmaya olanak sağlayan hücre içi mekanizmalara sahiptir. Evrimsel süreçte korunmuş olan ve oldukça sıkı düzenlenen bu mekanizmalar, hücre içi sensörler veya hücre dışı uyarıcılar ile başlatılabilen spesifik programlı hücre ölümü (PHÖ, PCD - programmed cell death) sinyal yollarıyla düzenlenir. Apoptozis ve otofaji programlı hücre ölümünün en iyi anlaşılmış iki tipidir. Son yıllarda, apoptozisin dış yolağıyla ilişkili olarak aktive olabilen ve “nekroptosis” olarak adlandırılan bir hücre ölüm mekanizması da ortaya çıkmaktadır [13].

2.4.1. Apoptozis

Doğal olarak gerçekleşen hücre ölümünün ilk defa gözlenişi, 1842 yılında Karl Vogt'un kara kurbağasında notokordun metamorfoz sırasında hücre ölümüyle ortadan kaldırılmasını rapor etmesi ile olmuştur. Ancak bu gözlemin önemi 1965 yılında John Foxten Ross Kerr'in kontrollü hücre ölümü ile travmatik hücre ölümünü ayırt etmesine kadar anlaşılamamıştır. 1972 yılında, Kerr, Whyllie ve Currie elektron mikroskobu ile yaptıkları deneylerle saptama olanağı buldukları bu kontrollü hücre ölümünü “apoptozis” olarak adlandırmıştır. Hücrelerin apoptozisle uzaklaştırılması organizmanın yaşamı için genellikle avantaj oluşturmaktadır. Örneğin, hücre proliferasyonu sırasında mutasyon sonucunda veya patojen enfeksiyonu nedeniyle anormal hale gelerek potansiyel tehlike oluşturan hücreler, çevre dokunun ve organizmanın korunması için uzaklaştırılmak zorundadır. Ayrıca apoptozis eksikliğinde veya bozukluğunda embriyonik gelişim sırasında defektler oluştuğu gösterilmiştir [14].

Apoptozise sürüklenen hücrelerde karakteristik morfolojik değişiklikler gözlenmektedir. Öncelikle, hücre iskeletinin kaspazlar tarafından yıkılması sonucu hücre büzüşmesi ve yuvarlaklaşma gözlenir. Bu aşamada apoptotik hücre, etrafındaki hücrelerle olan bağlantılarını da kaybeder. Bunu kromatin kondensasyonu takip eder. Bu noktada DNA fragmentasyona uğrar (B) ve hücre; sitosol, kondanse kromatin ve organelleri içeren çok sayıda kompakt ve membranla çevrili yapılarla (apoptotik cisimler) paketlenir (C). Oluşan apoptotik cisimler daha sonra makrofajlar tarafından fagositozla ortadan kaldırılır (Şekil 2.1) [15].



Şekil 2.1: Apoptozis sırasında gözlenen morfolojik değişiklikler (Kerr ve ark.,' dan yeniden düzenlenmiştir [15])

Apoptozisin aktivasyonu ve gerçekleştirilmesi süreçlerinde, evrimsel süreçte *Saccharomyces cerevisiae*'den insana kadar korunmuş bir protein ailesi olan aspartat spesifik sistein proteazlar (kaspazlar) rol oynar. Substratlarını tetrapeptid motiflerinden (P4-P3-P2-P1 ve P1 Asp aminoasidi olmak üzere) çok spesifik bir şekilde kesen kaspazlar, hücrede inaktif öncü yapıda (zimojen veya pro-kaspaz form olarak bilinir) düşük ama yeterli seviyede, çok az veya hiç aktivite göstermeden hazır bir şekilde bulunurlar. Ölümü tetikleyen bir etkiye cevap olarak kaspazların aktifleşmesi süreci başlar. Otokatalitik kesim veya diğer kaspazlar tarafından kesim sonucu baskılayıcı N-terminal domain ortadan kaldırılır ve bu sayede küçük ve büyük alt ünitelerin oluşturulması yoluyla kaspazlar aktif formlarına dönüşürmüş olurlar [16]. Apoptotik süreçte görev alan kaspazlar genellikle “başlatıcı-

kaspazlar” ve “efektör-kaspazlar” olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Başlatıcı kaspazlar uzun prodomainlere sahiptir ve ölüm efektör domain (Death Effector Domain - DED) veya kaspaz toplayıcı domain (Caspase Recruiting Domain – CARD) gibi domainler sayesinde multimerizasyon ve kaspaz aktivasyonu ile ilişkili büyük adaptör moleküllere bağlanabilirler. Buna karşın efektör kaspazlardaki prodomainler kısadır ve başlatıcı kaspazlar tarafından proteolitik olarak işlendikten sonra apoptozisin gerçekleştirilmesinde rol oynarlar. Başlatıcı kaspazlar 2, 8, 9 ve 10 iken efektör kaspazlar 3, 6 ve 7’ dir. Apoptozis gerçekleştirilmesinin başlaması, hücre ölüm sinyalinin orjinine bağlı olarak “iç (intrinsik) yolak (mitokondriyel yolak olarak da bilinir)” ve “dış (extrinsic) yolak (ölüm reseptör yolağı olarak da bilinir)” olmak üzere iki temel sinyal yolağı ile gerçekleşir.

2.4.1.1. İç Apoptotik Yolak

İç apoptotik yolak, apoptozis indükleyici “pro-apoptotik” ve apoptozis baskılayıcı “anti-apoptotik” B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein ailesi üyelerinin dengesiyle düzenlenir. Bcl-2 ailesi, bulundurdıkları Bcl-2 homolog (BH) domain sayısına göre 3 alt aileye ayrılır. Anti-apoptotik alt aile üyeleri BH4 domaini içerirler (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1, Bcl-w) ve bu alt ailenin en bilinen üyesi Bcl-2’dir. Diğer iki alt aile pro-apoptotik özelliktedir ve yapılarında ya BH4 domaini bulundurmazlar (Bak, Bax, Bok) ya da yalnızca BH3 domaini içerirler (Bim, Bik, Bad, Puma, Noxa, HRK gibi). Apoptotik sinyalin olmadığı durumda hem Bcl-2 homolog antagonist killer (Bak) hem de Bcl-2 associated X protein (Bax), anti-apoptotik Bcl-2 proteinleriyle (Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-xL) dimer halinde olup inaktif durumda bulunur. İç apoptotik yolak aktivasyonuna neden olan bir sinyal alındığında, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi ile oluşan Bak ve Bax inaktivasyonu, Bad, Bim, Noxa ve Puma gibi pro-apoptotik BH3-only Bcl-2 proteinlerin Bak ve Bax’a doğrudan bağlanmasıyla ortadan kaldırılır. Bu sayede pro-apoptotik Bak ve Bax aktivasyonu gerçekleşir. Bu iki protein de homo-oligomerler oluşturarak mitokondrinin dış membranında por oluşumuna neden olur. Bu olay mitokondriyal dış membranın permeabilizasyonu (mitochondrial outer membrane permeabilization – MOMP) sonuçlanır. Porların oluşumu, mitokondrinin membranlararası boşluğundan sitokrom c ve SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pl) gibi apoptozisi tetikleyici faktörlerin salınmasına neden

olur. Sitokrom c'nin salınımı "apoptozom" olarak adlandırılan ve Apaf-1 (apoptotic protein activation factor 1), sitokrom c ve pro-kaspaz 9'un birleşiminden oluşan multi-protein kompleksinin oluşmasını sağlar. Apoptozom kompleksinde kaspaz 9'un aktivasyonu sinyal yolağının devamındaki efektör kaspazlar olan kaspaz 3 ve 7'nin aktivasyonuna neden olur. Bu kaspazlar daha sonra caspase-activated DNase (CAD) gibi endonukleazların aktivasyonuna olanak sağlar. Bu sayede bir yandan sitoskelet elemanları yıkılırken diğer yandan nuklear yıkım gerçekleşir ve bu yolak DNA fragmentasyonu ve nuklear yapının yıkılmasıyla sonuçlanır. DNA hasarı, reaktif oksijen türevlerinin (reactive oxygen species - ROS) aşırı üretimi, patojen tarafından enfeksiyon veya inflamatuvar sitokinler gibi bir çok faktör iç apoptotik yolağın aktivasyonuna neden olabilir (Şekil 2.2) [4, 17, 18].

Yukarıda açıklanan iç apoptotik yolak sinyalizasyonu, olası bir kendiliğinden gerçekleşecek apoptozis sürecini engellemek için birçok faktör ile kontrol altında tutulur. Bu faktörlerden biri inhibitor of apoptosis (IAP) protein ailesidir. IAP ailesi proteinleri baculoviral IAP tekrarı (BIR) ve RING finger motifi içerirler. Cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1), c-IAP2 ve XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) en iyi bilinen IAP üyeleridir. Bu üç protein de BIR ve RING domainleri ile kaspaz 3, 7 ve 9'a doğrudan bağlanıp aktivasyonlarını baskılar. İç yolak aktive olduğunda, SMAC/DIABLO'nun mitokondriden salınımı bu proteinlerin koruyucu etkisini spesifik inaktivasyonla ortadan kaldırır ve kaspaz aktivasyonuna olanak sağlar (Şekil 2.2) [19].

2.4.1.2. Dış Apoptotik Yolak

Kaspazların aktivasyonu iç yolaktan olabileceği gibi, hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin ligand bağlanması ile aktivasyonu sonucunda da tetiklenebilir. Bu şekilde gerçekleşen apoptotik aktivasyonda "dış apoptotik yolak" aktive edilir. Ölüm reseptörleri, tumor necrosis factor (TNF) reseptör gen süperailisi olarak bilinen ve hücre ölümü, farklılaşma ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi biyolojik fonksiyonlarda rol oynayan 20 den fazla protein içerir. TNF reseptör ailesi sistince zengin ekstraselüler domainler içerir. İntraselüler kısımda ise 80 aminoasitlik "death domain (ölüm domaini)" olarak adlandırılan ve hücre yüzeyinden alınan ölüm sinyalinin hücre içi sinyalizasyonuna aktarılmasında görev

alan domainler taşır. En iyi karakterize edilen ölüm reseptörlerinden bazıları CD95 (APO-1/Fas), TNF receptor 1 (TNFR1), TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor (TRAIL-R1) ve TRAIL-R2'dir (Şekil-2.2).

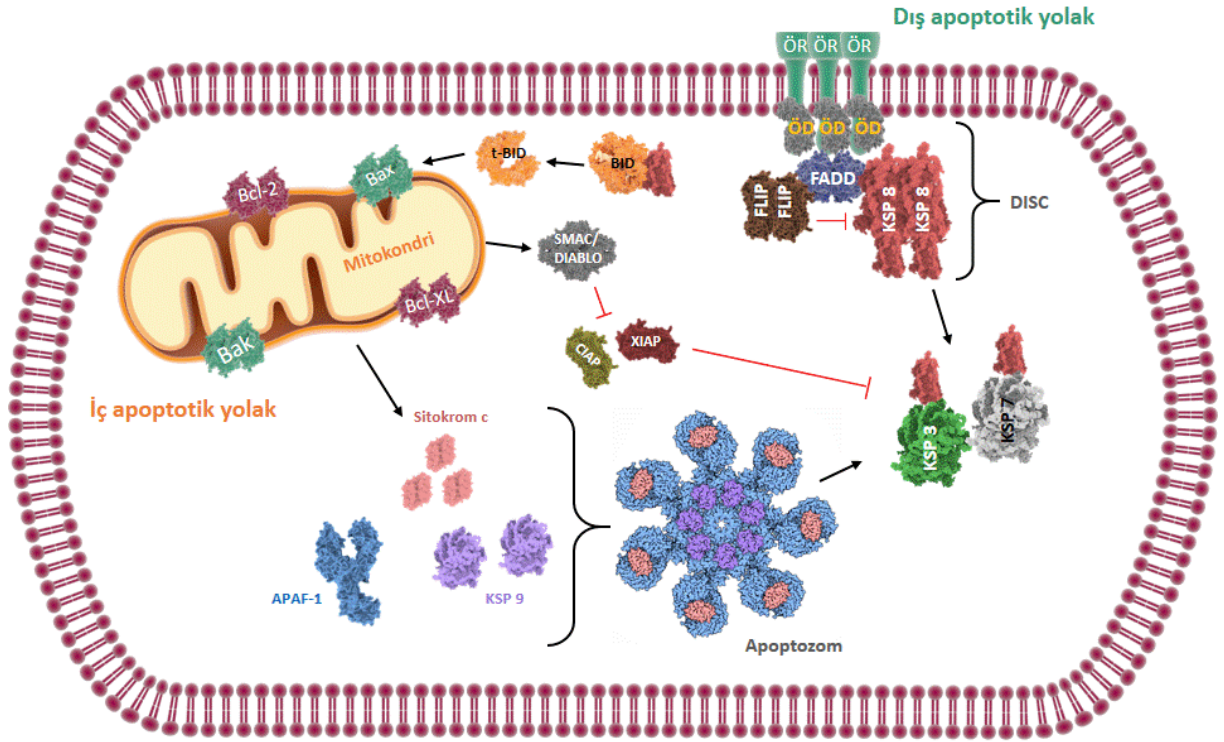
Ölüm reseptörlerinin ligasyonu, reseptörlerin trimerizasyon ile bir araya toplanmasına ve bu toplanma da reseptörlere bağlı ölüm domainlerinin bir araya gelmesine yol açar. Ölüm domainleri bir araya geldiğinde, sinyalizasyonun devam etmesinde görev alan ve bunun için diğer proteinleri bir araya toplamada görevli “adaptör proteinlerin” bu bölgeye gelmesine neden olur. Bu adaptör proteinlerin hücre ölüm sinyalizasyonu için en önemlilerinden biri Fas-associated death domain (FADD)'dir. FADD, ölüm domainleri ile homofilik etkileşim göstererek aktivasyon bölgesine gelir. FADD'ın bağlanması kaspaz 8'in aktive olmuş bölgeye gelmesine neden olur. Bu sayede Death-inducing signaling complex (DISC) multiprotein kompleksi oluşur. Kaspaz 8'in DISC kompleksi üzerinde oligomerize olması, kendi kendini keserek otoaktive olmasına yol açar. Sinyalizasyon, kaspaz 8'in aktive olmasından sonra kaspaz 3 ve 7 'yi doğrudan keserek aktive etmesi ile devam eder. Bu noktada hücrelerin dış yolak aktivasyonuna karşı cevabı iki şekilde olabilir. Birinci olasılıkta, kaspaz 8'in DISC üzerinde aktivasyonu, kaspaz 3 ve 7 gibi efektör kaspazları aktive etmek için yeterlidir. Bu hücreler tip I hücreler olarak tanımlanır. Buna karşın, tip II olarak sınıflandırılan hücrelerde görülen ikinci olasılıkta, DISC üzerinde gerçekleşen kaspaz 8 aktivasyonu tek başına efektör kaspazları aktive etmek için yeterli değildir. Apoptozisi aktive etmek için mitokondri kaynaklı başka bir aktivasyon döngüsü gereklidir (Şekil 2.2) [20].

İç apoptotik yolakta olduğu gibi, hücrede olası bir apoptotik oto-aktivasyonu engellemek için dış yolak da negatif olarak düzenlenir. Bu düzenleme hücresel FADD-like IL-1 β -converting enzyme inhibitory proteinler (FLIP) tarafından gerçekleştirilir. FLIP, uzun FLIP (FLIP_L) ve kısa FLIP (FLIP_S) olmak üzere hücrede alternatif kesim ile üretilen 2 formda bulunur. Her iki form da kaspaz 8 ve 10'la dizi homolojisi göstermektedir ancak katalitik aktivite gösteren bölgeler FLIP proteinlerinde bulunmamaktadır. Bu nedenle de DISC kompleksine kaspaz 8 yerine FLIP'in gelmesi kaspaz aktivasyonunu baskılayıcı etki oluşturur. FLIP_L kaspaz 8 ile etkileştiğinde pro-kaspaz 8'i aktive edebilir, hatta domain benzerliğinden olayı kaspaz 8'in sınırlı (çok düşük seviyede) bir katalitik aktivite gösterebildiği bile

saptanmıştır. Bu sınırlı aktivite ile kaspaz 8, RIPK1 isimli bir proteini kesip ripoptozom isimli bir kompleksi inaktive eder. Ardından kaspaz 8, bu kesim aktivitesini kısa süre içerisinde tekrar kaybederek apoptozisin devam etme ihtimalini de engeller. Bu sayede hücrenin hayatta kalmasını sağlayacak bir fenotip oluşur. FLIP_s kaspaz 8 ile etkileştiğinde ise ripoptozom kompleksini aktive eder ancak ilgili domaini bulundurmadığından prokaspaz 8'i aktive edemez. Bu durumda kaspaz 8'de RIPK1 isimli proteini kesip inaktive edemez. Bu olayın sonucunda hücre “necroptosis - nekroptosis” olarak adlandırılan başka bir hücre ölüm mekanizması ile ölüme sürüklenir (Şekil 2.2) [21].

2.4.1.3. İç ve Dış Apoptotik Yolaklar Arasındaki Etkileşim

Apoptotik hücre ölümü, yukarıda anlatıldığı gibi iç veya dış yolaklar ile aktive olabileceği gibi, her iki yolaktaki sinyalizasyonun birbirine bağlanması ile de gerçekleşebilir. Apoptozisin iç ve dış yolakları arasındaki etkileşimde rol oynayan proteinlerden en iyi tanımlanmış olanı, pro-apoptotik Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan BH3-interacting-domain death agonist (Bid)'dir. Bid, kaspaz 8'in doğrudan substratı olup, dış apoptotik yolağın aktivasyonu sonucunda kesilmiş formu olan tBid'i (truncated Bid/kesilmiş Bid) oluşturur. tBid, mitokondride Bax ve Bak'ı aktive ederek sitokrom c ve SMAC/DIABLO gibi pro-apoptotik faktörlerin salınımına olanak sağlar. Bunun yanında kaspaz 8'i keserek aktive eden kaspaz 6'nın aktivasyonunu da sağlayarak, iç yolak aracılı bir pozitif döngü oluşmasını sağlar. Tip II hücrelerde tBID aktivasyonu hücre ölümünün gerçekleşmesi için gereklidir (Şekil 2.2) [17].



Şekil 2.2: Apoptotik sinyal yolları (ÖR: Ölüm Reseptörü, ÖD: Ölüm Domaini, KSP: Kaspaz).

2.4.2. p53 Ailesi ve Apoptozis

p53 'ün apoptozis üzerindeki etkisi transkripsiyon bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki yoldan gerçekleşebilir. Transkripsiyon bağımlı apoptozis, p53'ün hedef genlerin promotörüne bağlanarak onları aktive etmesiyle gerçekleşir. p53'ün apoptozis ile ilgili hedef genlerine örnek olarak, Apaf-1, Bax, Kaspaz-6, DR4, DR5, Fas, Noxa ve Puma verilebilir. p53 bu genlerin promotörüne bağlandığında genel transkripsiyon faktörlerinin ve histon asetil transferazların (CBP ve p300 gibi) bu bölgeye gelerek transkripsiyonu arttırmasına yol açar. Transkripsiyon bağımsız apoptozis, p53 aktivitesinin RNA ve protein sentezi inhibitörleriyle birlikte kullanımı sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Buna ek olarak, p53 transaktivasyon domaininde mutasyon oluşturulsa dahi yine de apoptozisin p53 aracılı olarak indüklendiği gözlenmiştir. Bu bulguların ardından p53'ün sitoplazmik hedefleri üzerine yoğunlaşmıştır. Immunofloresan, elektron mikroskobu ve hücre fraksiyon analizi ile yapılan deneylerde, DNA hasarı, hipoksi ve aktif onkogenlerin varlığında p53'ün

hızlı bir şekilde mitokondriye transloke olduğu gösterilmiştir. Bu translokasyonun ardından MOMP kaybı ve takiben kaspaz aktivasyonu ile apoptozisin indüklendiği saptanmıştır. Bunun ardından p53 ve mitokondri arasındaki etkileşimler incelenmiştir ve Bcl-2 ailesi üyeleri ile doğrudan etkileşebildiği bulunmuştur. p53'ün Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinlere doğrudan bağlanıp apoptozisi indükleyici etki gösterdiği, ayrıca Bcl-2 ve Bcl-xl gibi anti-apoptotik proteinlere doğrudan bağlanarak bu proteinlerin apoptozis baskılayıcı etkilerini ortadan kaldırdığı saptanmıştır [5].

p63'ün apoptozis ile ilişkisi, p53'e benzer şekilde, DNA hasarı oluşturan ajanlara karşı ekspresyon seviyesinin artmasının bulunmasıyla ortaya çıkmıştır. p63 aracılı apoptozisin yalnızca transkripsiyon bağımlı olarak gerçekleştiği bulunmuştur. p63'ün apoptozis ile ilişkili hedef genleri arasında CD95, TNF-R, TRAIL-R, Bax, Apaf-1, kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 bulunmaktadır. p63'ün transkripsiyonel etkisini transaktivasyon domaini ve proline zengin domaini ile gerçekleştirdiği bulunmuştur. Proline zengin domaindeki delesyon sonucu proliferasyonun yine de baskılandığı, ancak p63'ün apoptozisi indükleyici etkisinin ortadan kalktığı saptanmıştır [5].

p73 ve apoptozis ilişkisi de DNA hasarı oluşturan ajanlara karşı oluşan cevabın araştırılması ile ortaya çıkarılmıştır. p73'ün aktive olduğunda hücre döngüsünü durdurabildiği ve apoptozisi indükleyebildiği saptanmıştır. p73 bağımlı apoptozis de p53 hedef genlerinin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Apoptozis ile ilişkili olan p73 hedef genleri, Bax, Puma, Noxa, Bad, Bik, CD95, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 8' dir [5].

2.4.3. Otofaji

Yaklaşık 40 yıl kadar önce, Clark ve Novikoff, fare böbrek kesitlerinde mitokondrilerin, içeriğinde lizozomal enzimler bulunan kompartmanlar içerisinde olduğunu gözlemlemiş ve bunlara “dense bodies (yoğun cisimcikler)” ismini vermiştir. Daha sonra Ashford ve Porter, glukagona maruz bırakılan sıçan hepatositlerinde, bu membran kaplı veziküllerin yarı-sindirilmiş mitokondri ve endoplazmik retikulum içerdiğini saptamıştır. Aynı deney düzenliğinde daha sonra

Novikoff ve Essner tanımladıkları cisimciklerin lizozomal hidrolazlar içerdiğini göstermiştir. Bir yıl sonra, 1963 yılında CIBA kuruluşunun (şimdiki ismiyle Novartis Foundation) lizozomlar üzerinde düzenlediği bir kongrede, de Duve, hücrelerde parçalanma (sindirilme) aşamasında sitoplazma veya organel parçalarını içeren tek veya iki zarlı veziküller bulunduğunu saptamış ve bu olaya “otofaji” adını vermiştir. Tanımladığı bu vezikülleri “otofagozomlar” olarak tanımlamış ve normal hücreler de de bu olayın gerçekleştiğini göstermiştir. Günümüzde ofotagozomları saran membranların nasıl oluştuğu hala tartışmalıdır, ancak de Duve bu membranların granülsüz endoplazmik retikulum kaynaklı olduğunu öne sürmüştür. Bu tanımlamanın ardından ofotaji ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Hücresel ofotaji normalde sıçan karaciğer hücrelerinde görülmektedir, ancak açlık (starvation) durumunda ve glukagon ile muamele edilmesiyle bu olayın arttığı doğrulanmıştır. Yapılan çalışmaların ardından ofotajinin bugün de kabul edildiği gibi, hücrenin aç kaldığı durumlarda enerji üretmek için kullandığı adaptif bir süreç olduğu ortaya çıkarılmıştır [22].

Otofaji, evrimsel süreçte mayalardan insanlara kadar olan ökaryotlarda korunmuş katabolik bir mekanizmadır. Besin açlığı veya oksidatif strese cevap olarak aktive olabilen ofotaji, öncü metabolik ürünlerin (yağ asitleri, amoniasitler ve ATP gibi) oluşumuyla sonuçlanır. Günümüzde mikrootofaji, makrootofaji ve şaperonlar ile düzenlenen ofotaji olmak üzere ofotajinin 3 farklı tipi tanımlanmıştır. Makrootofaji, sitosolik bileşenlerin ve organellerin lizozomlarda yıkıldığı asıl tiptir ve genellikle “otofaji” kullanıldığında makrootofajiden bahsedilir (bu tezde de ofotaji bu anlamda kullanılmıştır). Otofajik sürecin karakterizasyonunda ilk basamak, dinamik olarak yeniden düzenlenebilen izole edilmiş membranların (isolated membranes veya phagophores - fagoforlar) görülmesidir. Bunun ardından ofotagozom olarak tanımlanan ve sitoplazmanın bir kısmını içerebilen çift zarlı yapılar oluşur. Otofagozomal zarın, endoplazmik retikulumun katlanmasıyla meydana geldiği düşünülmektedir. Bu işlemin sonunda ofotagozom lizozomla kaynaşarak, izole edilen materyalin lizozomal asit hidrolazlarca yıkıldığı “otofagolizozom”lar oluşturulur. Bu işlemin ardından zarın permeazlar tarafından yıkılmasıyla metabolik öncü moleküllerin sitosole salınması gerçekleşir. Otofaji sırasındaki moleküler makine “otofaji ile ilişkili genler (autophagy-related genes - ATG)” ve bu genlerden sentezlenen proteinler ile organize edilir. Memelilerde

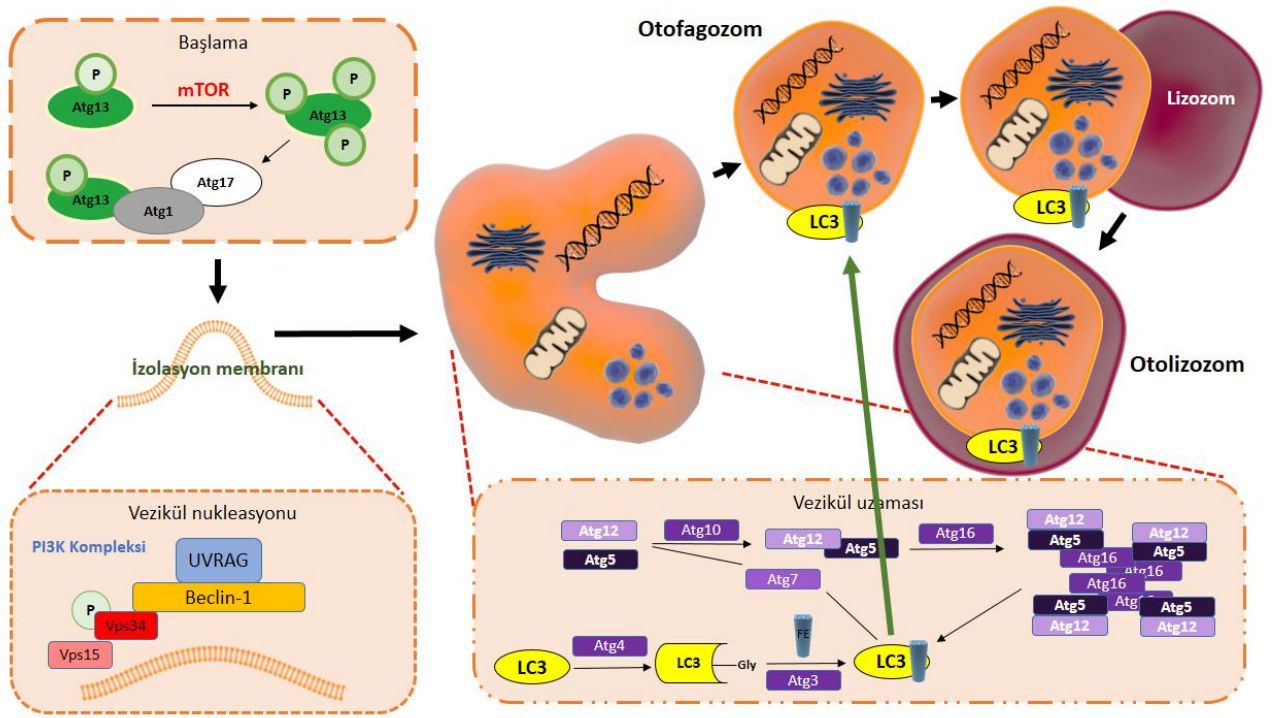
tanımlanmış 30'dan fazla proteinin bu sürecin yürütülmesinde görev aldığı bilinmektedir. Bu proteinler 3 sınıf altında toplanabilir: (1) ATG1/ULK1 (Unc51-like autophagy-activating kinase 1) kompleksi ve düzenleyicileri, (2) Beclin-1/fosfatidilinositol-3 kinaz sınıf III kompleksi ve (3) Atg5-Atg12 ve LC3 konjugasyon sistemi (Şekil 2.3) [3].

Atg1-ULK1 kompleksi otofajini başlatıcı kompleksi olarak da bilinir ve bir kinaz olan mTOR'un (mammalian target of rapamycin) oluşturduğu 2 kompleks (mTORC 1 ve 2) tarafından düzenlenir. Besince zengin durumda, mTORC1 Atg1/ULK1 kompleksini fosforilleyerek baskılar ve otofajinin başlamasını engeller. Besin eksikliği durumunda veya rapamisin eklenmesinden sonra mTORC1 bu kompleksten ayrılır ve Atg1/ULK1 kompleksinin fosforilasyon düzeyini düşürerek kompleksin aktif forma geçmesine yol açarak otofajiyi indükler. mTORC2 kompleksi (rapamisine duyarsız) Akt sinyal yolağını aktive ederek otofajiyi baskılayabilir. Bu durum daha sonra mTORC1'i aktive etse de bir yandan da FoxO3'ü (forkhead box O3) fosforilleyip inaktive ettiğinden otofajiyi baskılayıcı bir fenotip oluşur (FoxO3 normalde LC3 gibi önemli otofajik genleri aktive eder) [3]. Atg1/ULK1 kompleksi bu sayede ortadan kaldırılacak materyalin yakınında izolasyon membranının oluşmasını başlatır (Şekil 2.3).

İzolasyon membranı oluştuktan sonra, bu membranın olgunlaşması Beclin1/PI3K kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Bu kompleksin oluşması otofagozom formasyonlarının oluşacağı anlamına gelir. Beclin1'in bu aşamada Bcl-2 ailesi üyeleri ile oluşturduğu heterodimerizasyondan ayrılması gerekir (Beclin1 heterodimer haldeyken inaktiftir). UVRAG (UV radiation resistance-associated gene protein) ve AMBRA1 (activating molecule in Beclin1-regulated autophagy) gibi proteinler de bu aşamada sinyalizasyona katılarak otofaji sürecinin devam etmesine katkı sağlarlar (Şekil 2.3) [3].

Atg5-Atg12 ve LC3 konjugasyon sistemi ise otofagozomun son formunu alıp genişlemesi için gereklidir. Atg5-Atg12-Atg16L kompleksi sitosolde oluşur ve ardından pre-otofagozomal zara bağlanır. Bu bağlanma MAP-LC3 (microtubule associated protein 1 (MAP1) LC3) veya kısaca LC3'ün bu bölgeye gelmesini sağlar. Burada LC3'ün serbest formu olan LC3-I, fosfatidil etanolamin (FE) eklenmesiyle

lipidlenmiş formu olan LC3-II'ye dönüşür. Bu modifikasyon LC3'ü pre-otofagozomal membrana bağlamak için gereklidir (Şekil 2.3). LC3-II bu aşamadan sonra otofagozom yıkılana kadar membrana bağlı olarak kalır. Bu nedenle LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü otofajinin araştırılmasında en yaygın kullanılan belirteçtir [3]. LC3-II oluşuktan sonra, SQSTM1/p62 proteini bu kargoların otofagozomlara taşınmasında ve otofajiyle yıkımlarının kolaylaştırılmasında görev alır. Bu aşamadan sonra otofagozomlar lizozomlarla kaynaşıp otofagolizozomları oluşturur ve burada otofajik kargolar lizozomal enzimlerce yıkılır. Kargo yıkılana kadar p62 proteini otofagozoma bağlı olarak bulunur. Bu nedenle de p62 proteini otofaji araştırmalarında ikinci en sık kullanılan belirteçtir [3].



Şekil 2.3: Otofajik sinyal yolları (Maiuri ve ark.,'tan yeniden düzenlenmiştir) [31].

2.4.3.1. p53 Ailesi ve Otofaji

Otofajin'in hücrel strese bağılı olarak, adaptif cevap oluşturarak hücrenin hayatta kalmasına katkı sağlayabildiğı veya hücre ölümüne neden olabildiğı gösterilmiştir. Otofaji'nin bu çift taraflı etkisinin ortaya çıkması hücrede anahtar rolü oynayan birçok proteinin çapraz etkileşimi ile gerçekleşir. Bu proteinlerden birinin p53 olduğı düşünülmektedir. p53'ün hücre içerisindeki lokalizasyonuna göre transkripsiyon bağımlı veya bağımsız olarak otofajiyi baskılayabildiğı veya aktive edebildiğı gösterilmiştir. Yapılan çalışmaların çoğı p53'ün otofajiyi pozitif olarak düzenlediğini göstermektedir. DNA hasarı oluşturan ajanlarla genotoksik stres oluşturulması veya onkogenik aktivasyon sonucunda otofajinin p53 aracılı olarak indüklendiğı rapor edilmiştir. p53 aracılı otofajinin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da, transkripsiyon bağımlı otofajik aktivasyonda DRAM (damage-regulated autophagy modulator) ekspresyonunun arttığı, transkripsiyondan bağımsız otofajide ise mTOR'un baskılandığı ve AMPK'nin aktive olduğı gösterilmiştir. p53-aracılı otofajinin DRAM siRNA'sı kullanıldığında baskılanması, p53 ve DRAM arasındaki doğrudan etkileşimin otofajiyi düzenleyebildiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca DAPK1'in (Death-associated protein kinase 1) pozitif geri besleme döngüsü oluşturup p53 akümülesyonunu ve nukleusa translokasyonunu arttırarak otofajiye katkı sağladığı saptanmıştır. p53'ün otofajiyi baskılayıcı özellik gösterebildiğı, p53 sentezinin ortadan kaldırılması veya farmakolojik inhibisyonunu içeren deneyler sonucunda otofajide mTOR inhibisyonuna bağılı olarak artış gözlenmesiyle ortaya çıkmıştır. Rapamisinle mTOR'un baskılanması veya açlık gibi otofajinin indüklenmesine neden olan deney koşullarında p53'ün MDM2 aracılı ubiquitinasyonu takiben proteozomal yıkıma uğradığı saptanmıştır. Ayrıca p53 geninin hücreden çıkarılması sonucu kolon kanseri hücrelerinde bazal otofaji seviyesinin arttığı ve p53 geni hücreye geri kazandırıldığında ise otofaji seviyesinin eski haline döndüğü belirlenmiştir [23–25].

p53 ailesi diğeri üyelerinin de otofajiyi transkripsiyonel aktivasyonla veya hücre metabolizmasını düzenleyerek kontrol ettiğı gösterilmiştir. p53'e ek olarak p63 ve p73'ün de Atg4a, Atg4c, Atg5, Ulk1, Ulk2 ve UVRAG gibi otofajiyi indükleyici genlerin ekspresyon seviyelerini arttırabildiğı saptanmıştır. Ayrıca p53 ekspresyonu

ortadan kaldırılmış hücre kültürlerinde p63 ve p73'ün, apoptozisteki fonksiyonlarına benzer şekilde, p53 fonksiyonu eksikliğini dengeleyerek otofajiyi aktive edebildiği gösterilmiştir. Rapamisin ve açlık gibi otofajik koşullarda p53'ün yıkıldığı, ancak p73'ün stabilizasyonu ve aktivasyonunun arttığı bu sayede otofajinin indüklenebildiği rapor edilmiştir. p63'ün otofaji üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar daha sınırlı sayıdadır. Sisplatin etkisinde p63'ün otofaji ile ilişkili birçok genin promotör bölgesinde lokalize olduğu ortaya çıkarılmıştır [26].

2.4.4. Apoptozis ve Otofaji Arasındaki Bağlantılar

Hem apoptozis hem de otofaji çok hücreli organizmalarda homeostazın korunmasını dinamik olarak sağlayan hücrel yıkım mekanizmalarıdır. Organizmanın canlılığı için her iki mekanizmanın da belirli kontrol edilebilir bir seviyede aktif olması gerekmektedir. Apoptozis ve otofajinin hem eksikliği hem de aşırı aktivasyonu durumlarında hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle bu iki mekanizmanın birbirini birçok aşamada kontrol ettiği düşünülmektedir. Genel olarak otofaji aktivasyonu hücrede apoptozisin gerçekleşmesini baskılayıcı etki gösterir. Diğer yandan apoptozis sürecinde kaspazların aktivasyonu ise birçok otofajik proteinin kesilerek inaktive edilmesiyle ve otofajinin baskılanmasıyla sonuçlanır. Son dönemde bu durumun düşünülenden daha karmaşık olduğunu ve her iki mekanizmanın da birbirini aktive edebildiğini belirten çalışmaların sayısı artmaktadır. Bcl-2/Beclin1 dimerizasyonu, p53 aracılı düzenlenme (Bkz. 2.3.1.4. ve 2.3.2.1.) ve Atg5-FADD etkileşimi otofaji ile apoptozis arasında tanımlanmış başlıca moleküler etkileşimlerdir [27–30].

Beclin-1'in ilk olarak BH3 domaini içerdiği bulunmuş ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleriyle (özellikle Bcl-2) etkileşerek apoptozisi düzenleyen bir protein olduğu keşfedilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise PI3Kc3 ve p150 ile etkileşip otofaji için gerekli olan vezikül nukleasyon kompleksine katıldığı ortaya çıkmıştır. Bu sayede, Beclin-1/Bcl-2 etkileşimi apoptozis ve otofaji arasında ortaya çıkarılan ilk moleküler bağlantı olmuştur. Hem Bcl-2 hem de Beclin-1'de oluşturulan defektler, hem apoptotik hem de otofajik ölüm süreçlerini etkilemektedir. Örneğin, Beclin-1 ekspresyonunun artması Bax ve Bak'ın Bcl-2'den ayrılıp apoptozisi aktive etmesiyle sonuçlanabilir. Bcl-2 ekspresyonunun azalması ise artmış Beclin-1

ekspresyonu sonucunda otofajinin aktivasyonu ile sonuçlanabilir. Servikal kanser hücrelerinde Beclin-1'in aşırı sentezinin sisplatin, paklitaksel, 5-florourasil ve epirubisin aracılı apoptozisi arttırdığı, ayrıca hücreleri bu kemoterapötiklere karşı hassaslaştırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, Bcl-2 ekspresyonunun baskılanmasının da Belcin-1 ekspresyonunu arttırarak meme kanseri hücrelerinde ölümü arttırdığı saptanmıştır [29]. Bcl-2'nin Beclin-1 ile indüklenen otofajiyi etkilediği düşünüldüğünde Bcl-2'yi baskılayan ilaçların da hem otofaji hem de apoptozisi arttırabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Gerçekten de, ABT-737 gibi farmakolojik BH3 mimetik ilaçların Beclin-1 ve Bcl-2 bağlanmasını tamamen ortadan kaldırarak hem Beclin-1 aracılı otofajiyi hem de apoptozisi indüklediği gösterilmiştir [27, 31]. Beclin-1/Bcl-2 etkileşiminin ayrıca açlık durumunda JNK1 (c-Jun N-terminal kinase 1) veya DAPK1 aracılı olarak düzenlenebildiği rapor edilmiştir [28, 29].

FADD-ATG5 ilişkisi, son dönemde yapılan maya 2 hibrit ve immunpresipitasyon deneyleriyle (yeast two-hybrid) ortaya çıkmıştır. ATG5 otofaji sırasında diğer ATG proteinleri ile kompleks oluşturup otofagozomların oluşumuna katılır; FADD ise dış apoptotik yolda ölüm reseptörleri ile kaspaz 8 arasında sinyal iletiminde rol alan adaptör proteindir. Hücrelerin IFN- γ ile uyarılması sonucu ATG5 ekspresyonunun arttığı ve sonuçta otofagozom oluşumu ile hücre ölümünün gerçekleştiği belirlenmiştir. ATG5'i aşırı sentezleyen hücreler IFN- γ ile muamele edildiğinde otofagozomların oluştuğu ve daha büyük vakuoller oluşturmak için kaynaştıkları saptanmıştır. Daha sonrasında ise bu vakuollerin büzüştüğü ve sürecin hücre ölümüyle sonuçlandığı gözlenmiştir. ATG5 mutant hücrelerin ATG12 ile kompleks oluşturamadığı ve bu nedenle vakuollerin oluşumuna bağlı hücre ölümünün azaldığı belirlenmiştir. Daha sonra, FADD sentezinin engellendiği hücrelerde ATG5'in aşırı ekspresyonu durumunda vakuollerin oluştuğu, ancak hücre ölümünün gerçekleşmediği belirlenmiştir. Sonuç olarak ATG5 ile FADD'ın doğrudan etkileşiminin otofajik vakuoller oluşturduğu ancak hücre ölümünün apoptozis üzerinden gerçekleştiği rapor edilmiştir [29].

2.5. GBM’de Apoptozis ve Otofajiye Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Merkezi sinir sistemindeki hücreler ölümüne karşı cevapta farklılık gösterir. Ölümüne karşı en duyarlı hücreler nöronlardır, bu sırayı oligodendrositler, astrositler ve mikrogliya takip eder. Glioblastoma gelişimi ve tedavi sırasında bu hücre tiplerinin hemen hepsi hücre ölümünü tetikleyen faktör ve ilaçlara karşı direnç kazanır. Glioblastomada tümör içerisinde “marjinal bölge” deki hücreler, tüm kanser tipleri arasında tedavi prosedürlerine karşı en direçli hücrelerdir ve bu durum sıklıkla tedavi sonrası nüks ile sonuçlanır. Glioblastoma hücrelerinin apoptotik yolları inaktive eden mutasyonlar taşıdığı rapor edilmiştir. Bu nedenle diğer hücre ölümü tiplerini aktive edebilen ilaçların ortaya çıkarılmasına acilen ihtiyaç vardır.

Glioblastomada apoptozise karşı direçte en önemli olaylardan biri Bcl-2 ailesi proteinlerinin aşırı ekspresyonudur. BH3-only proteinleri ile glioblastoma hastalarının ortalama sağkalım süresi arasında ters orantılı ilişki bulunmuştur. Nüks eden glioblastomalarda ise Bcl-2 ailesi üyesi proteinlerin sentezinin anti-apoptotik yöne kaydığı tespit edilmiştir ve bu hastalarda artmış Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ve azalmış Bax belirlenmiştir. Buna ek olarak GBM kök hücrelerinde de aşırı Bcl-2 ekspresyonu saptanmıştır. Son dönemde Bcl2L12’nin de GBM’de önemli rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır. Neredeyse tüm GBM tiplerinde aşırı eksprese durumda olduğu saptanan Bcl2L12’nin MOMP ve sitokrom c salınımı üzerinde etki göstermediği, ancak henüz belirlenemeyen bir mekanizma ile kaspaz 3 ve 7 aktivitesini baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca p53’e doğrudan bağlanıp, onun Bax, Noxa ve Puma ile doğrudan etkileşimini de engellediği saptanmıştır [4]. Bcl-2 ailesinin baskılanması mekanizmasıyla çalışan ilaçlar birçok tümör tipinde araştırılmış olmasına karşın glioblastoma üzerindeki araştırmalar son derece sınırlıdır. Bcl-2 inhibitörleri olan HA14-1 ve ABT-737’nin, özellikle kemo/radyoterapi ile kombine olarak kullanıldıklarında GBM hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Yine Bcl-2 ailesi üyelerini baskılayan bir ilaç olan Gossypol’ün bir türevi olan AT-101’in GBM üzerindeki klinik etkileri faz I ve faz II çalışmalarda araştırılmaktadır [4].

Glioblastoma'da apoptozis direncindeki diğer faktör IAP protein ailesidir. IAP'lar kaspazlara doğrudan bağlanıp onları inhibe ederek apoptozisi negatif olarak düzenlerler. GBM' de IAP'ların sentezinin arttığı ve bu nedenle kaspaz aktivasyonunun azaldığı bildirilmiştir. GBM'lerde en iyi karakterize edilen IAP'lardan biri olan survivin apoptotik kapasiteyi azaltmaktadır ve GBM'lerde ortalama sağkalımla ters korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu nedenle IAP proteinlerinin baskılanmasının GBM'deki apoptotik direncin üstesinden gelinmesinde iyi bir yaklaşım olabileceği düşünülmüş ve yapılan çalışmalarda radyoterapi, Apo2L/TRAIL, kemoterapi ve Temozolomid teravilerine karşı direncin kırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir [4].

Günümüzde otofaji inhibisyonunu hedefleyen bir mekanizma ile kanser tedavisi henüz hala çelişkilidir. Bu durum otofajinin hücrede ikili etki (hem hücrenin hayatta kalmasını hem de ölmesini sağlayabilen) göstermesi ve henüz bu konuda henüz yeterli bilgiye sahip olmamamızdan kaynaklanmaktadır. Tümör gelişiminin erken dönemlerinde otofaji hücre proliferasyonunu ve dolayısıyla tümör progresyonunu sınırlayıcı etki gösterirken; tümör büyüdüğünde veya kan damarı desteği azaldığında oluşan hipoksik ortam ve besin yetersizliği durumlarında tümörün sağkalımına yardımcı bir etki gösterir. Otofajinin GBM'nin agresifliğini ölçmede iki belirteç olan invazyon ve direnci pozitif veya negatif olarak düzenleyebildiği gösterilmiştir. Konu direnç olduğunda, otofaji düzenlenmesi ve klasik kemoterapi arasındaki bağlantının son derece karmaşık olduğu bulunmuştur. Örneğin, potent bir antikanser molekül olan curcubitasin I'in GBM ksenograftlarında otofajiyi indükleyerek hücrelerin hayatta kalmasını ve tümörü koruduğu belirlenmiştir. Buna karşın, itrakonazol'un GBM'nin gelişimini otofajik sinyalizasyonu aktive ederek baskıladığı ortaya konmuştur. Aynı çalışmada otofajinin baskılanmasının bu etkiyi geri çevirdiği de gösterilerek otofajinin gerçekten de GBM hücrelerinin ölümü için bir mekanizma olarak düşünülebileceği gösterilmiştir. GBM'de en yaygın tedavi olan Temozolomid'in GBM hücrelerinde otofajiyi aktive ederek sağkalımı arttırdığı ve TMZ'nin etkisini azaltarak tedaviye direnç kazanmada rol oynadığı bulunmuştur. Ardından, otofaji inhibitörleri olan 3-MA ve bafilomisin A1'in TMZ'nin GBM'deki sitotoksik etkisini tekrar arttırdığı saptanmıştır. Bu stratejinin günümüz GBM tedavisinde en umut verici yaklaşımlardan biri olduğu düşünülmektedir. FDA onaylı tek otofaji inhibitörleri

olan klorokuin (chloroquine - CQ) ve analogu hidroksiklorokuin'in (hydroxychloroquine - HCQ) günümüzde faz III klinik çalışmalarda, cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapiden sonra adjuvan tedavi olarak kullanımı araştırılmaktadır. CQ ile tedavi edilen hastaların, plaseboya göre ortalama sağkalım sürelerinin arttığı belirlenmiştir. HCQ'nun ise TMZ ile birlikte kullanıldığında maksimum tolere edilebilir dozunda otofajiyi baskılamadığı saptanmıştır [3].

Günümüzde GBM tedavisinde düşünülen bir diğer otofaji ilişkili tedavi yöntemi ise otofaji inhibitörü mTOR'u hedeflemektedir. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağındaki düzenin birçok kanser tipinde bozulduğu ve bu durumun rapamisin analoglarıyla çözülebileceği düşünülmüştür. GBM tümörlerinde, RAD001 (mTOR inhibitörü) gibi otofaji indükleyicilerin TMZ'nin otofajik hücre ölümü sinyalizasyonunu aktive ederek hücreleri öldürdüğü belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise mTOR inhibisyonunun TMZ aracılı hücre yaşlanmayı arttırdığı saptanmıştır [3]. Sonuç olarak, otofajinin GBM'de tedavi yaklaşımı olarak kullanılması umut verici bir yaklaşım olsa da, otofajinin ikili etkisinin daha iyi anlaşılması için çalışmalara ve yeni otofajik hücre ölümü aktivatörlerinin keşfedilmesine ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışmasıyla ilgili olarak, Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direncinde rol oynayan moleküler mekanizmalar hakkında Türkçe kaynak oluşturmak amacıyla 2013 yılında bir adet derleme yayınlanmıştır [32].

2.6. Trabectedin

Trabectedin (ET-743), Karayip denizinde yaşayan omurgasız canlılardan gömlekliler (tunikatlar) grubuna ait *Ecteinascidia turbinata* (deniz fiskiyesi) isimli organizmadan izole edilmiş ve 1969 yılında Ulusal Kanser Enstitüsünün bitki ve deniz canlılarını tarama çalışmalarıyla antikanser aktivitesi keşfedilmiştir [33]. Çeşitli kanser türlerinde antikanser etkinliği tespit edilen Trabectedin, 2000'li yıllardan beri yarı-sentetik olarak üretilmektedir [34]. İlk sonuçların umut vaadedici olması nedeniyle Avrupa ve Amerika'da klinik çalışmaları hızlıca tamamlanmış, bu çalışmalar sonunda 2007 yılında yumurtalık kanseri ve yumuşak doku sarkomlarında tek başına veya mevcut kemoterapötiklerle kombine olarak hastalara uygulanmaya

başlanmıştır. Çoğunluğu yumuşak doku sarkomları ve yumurtalık kanserleri olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde Trabectedinle ilgili çalışmalar mevcuttur. Ancak farklı kanser tiplerindeki etki mekanizmaları detaylı olarak gösterilmemiştir. Bu hususta meme ve prostat gibi diğer kanser türlerinde *in vitro*, *in vivo* ve klinik faz çalışmaları devam edilmektedir [33].

Trabectedin molekülünün kimyasal yapısına bakıldığında üç tane tetrahidroizokinolin halkasına sahip olduğu görülmektedir. Bu halkalardan ikisinin DNA'nın küçük oluğu ile etkileşime girdiği, diğer halkanın ise transkripsiyon faktörleri ve DNA tamir enzimleri gibi moleküllerle etkileştiği bilinmektedir [35].

Trabectedin DNA'ya bağlanan diğer ajanlara kıyasla özgün bir yapı ve fonksiyona sahiptir. Diğer alkilleyici ajanlar DNA'nın büyük oluğundaki N7 veya O6 pozisyonundaki guaninlere bağlanırken, Trabectedin DNA heliks yapısının küçük oluğundaki guaninlerin N2 pozisyonundaki amino gruplarına bağlanarak G-C'ce zengin dizileri alkiler ve DNA'yı büyük oluğa doğru bükür. Trabectedin'in sahip olduğu bu özgün yapı, farklı kanser modellerinde farklı etkiler göstermesini ve hücre içerisinde etkilediği sistemlerin fazla sayıda ve çeşitli olmasını açıklar niteliktedir. DNA ve tamir mekanizmaları ile ilişkili proteinler, transkripsiyonel düzenlenme, tümör mikroçevresi, anjiyogenez, apoptotik yollar ve topoizomeraazlar Trabectedin tarafından etkilenen başlıca molekül ve sistemlerdir [33].

Trabectedin'in *in vitro* ve *in vivo* antikanser aktivitesi lösemi, sarkom, meme, akciğer, yumurtalık, melanom, kolon ve prostat kanseri hücre kültürü modellerinde araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalar, diğer DNA hasarı oluşturan ajanların aksine (örneğin; cisplatin), nükleotid kesip çıkarma tamir sistemi'nden (NER) yoksun hücrelerin Trabectedin'e iki ya da 10 kat daha az duyarlı olduğunu ortaya koymuştur [36, 37]. Bunun yanında, TBP, E2F, SRF ve NF-Y gibi transkripsiyon faktörlerinin trabectedinin artan dozlarına bağlı inhibisyonu gösterilmiştir [38]. Nanomolar konsantrasyonlarda ise, HSP-70 [39] ve MDR1 [40] gibi genlerin transkripsiyonlarını bloke ettiği tespit edilmiştir. Trabectedin'in DNA'nın küçük oluğuna bağlandığı gösterilmişse de, büyük oluğa bağlanan transkripsiyon faktörleriyle de etkileştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [41]. Trabectedin normal NER fonksiyonu olan hücrelerde RNA polimeraz II'nin hızlı bir şekilde yıkılmasına

neden olurken, XPD, XPA, XPG ve XPF-yoksunu hücrelerde bu etkisinin olmadığı tespit edilmiştir [42]. Trabectedin'in SW620 ve LoVo insan kolon kanseri hücre hatlarında hücre döngüsünü S ve G2 fazlarında durdurduğu saptanmıştır [36]. Liposarkom hücre hatlarında ise CCL2, CXCL8, IL-6, VEGF ve PTX3 gibi çoğalma faktörlerini ve anjiyogenezle ilişkili molekülleri inhibe ettiği gösterilmiştir [43].

Kan beyin bariyeri (KBB) ve kan tümör bariyeri (KTB) GBM tedavisi sınırlayan en önemli etkenlerdendir. Kemoterapötikler KBB ve KTB'den geçmedikçe GBM tedavisi için kullanılmaları düşünülemez. Trabectedin'in P-gp substratı olduğu ve bu sayede KTB ve KBB'den geçtiği göstermiştir [44]. Trabectedin, bu özelliği ile GBM tümörlerinde kullanılabilecek az sayıda ajana yeni bir alternatif olma yolunda ön plana çıkmaktadır.

Literatürde Trabectedin'in apoptozisle ilişkili çalışmalarının sınırlı olduğunu görülmektedir. Akut miyeloid lösemi hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda, Trabectedin'in artan doza bağlı olarak apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir [45]. Trabectedin'e bağlı apoptozisin JNK, mitokondri ve kaspaz 3 aracılığı ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, Trabectedin'in hücre döngüsünde kilit rol oynayan moleküllerden siklin G2, GADD45A ve p21 ile etkileştiği gösterilmiştir. Ekibimiz meme kanserinin farklı genotipik özelliklere sahip iki hücre hattında Trabectedin'in farklı apoptotik yolları tetikleyerek hücreleri ölüme götürdüğünü göstermiştir [46]. Literatüre bakıldığında, Trabectedin'in otofajik hücre ölümünü tetiklediğine dair bir bilgi bulunmamaktadır.

2.7. Tezin Amacı

2013 yılında tamamlanan yüksek lisans tezinde Trabectedin'in insan glioblastoma multiforme hücre kültürlerinde (U-87 MG ve T98G) hücre ölümünü arttırdığı ve DNA tamir mekanizmalarını etkileyerek hücreleri radyasyona uygulamasına karşı duyarlı hale getirdiği belirlenmiştir [47]. İlgili tez çalışmasında Trabectedin'in T98G hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. U-87 MG hücre kültürlerinde ise hücrelerin öldüğü ancak bu ölümün apoptozis veya nekroz üzerinden gerçekleşmediği saptanmıştır. Yüksek lisans tezinin devamında yapılan çalışmalarla, bu hücre kültürlerinden sağlam p53 içeren U-87 MG'de Trabectedin

aracılı sitotoksik etkide p53'ün doğrudan rol oynadığı; mutant p53 içeren T98G'de ise p53'ün sitotoksik etki üzerine herhangi bir etkisi olmadığı ortaya çıkarılmıştır [48].

Bu doktora tezinin amacı, yukarıdaki çalışmalardan elde edilen ön verilere dayanarak;

- 1- T98G hücre kültürlerinde Trabectedin aracılı apoptozis sürecini ve apoptotik yolları aydınlatmak,
- 2- U-87 MG hücre kültürlerinde Trabectedin muamelesi sonucu indüklenen hücre ölüm mekanizmasını ortaya çıkarmak,
- 3- U-87 MG hücre kültürlerinde Trabectedin ile indüklenen ve p53 aracılı olduğu belirlenen sitotoksik etkinin hangi ölüm mekanizması üzerinden gerçekleştiğini saptamak,
- 4- p53 mutant olan T98G hücre kültürlerinde p53 ailesi diğer üyeleri olan p63 ve p73'ün Trabectedin etkisiyle gerçekleşen hücre ölümü üzerindeki rollerini ortaya çıkarmak,
- 5- Her iki hücre kültüründe de Bcl-2/Beclin-1 dimerizasyonu ve Trabectedin ile p53 ailesinin bu dimerizasyon üzerindeki rollerini araştırmak,
- 6- Trabectedin'in hücre döngüsü faz dağılımı üzerindeki etkisini belirlemektir.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

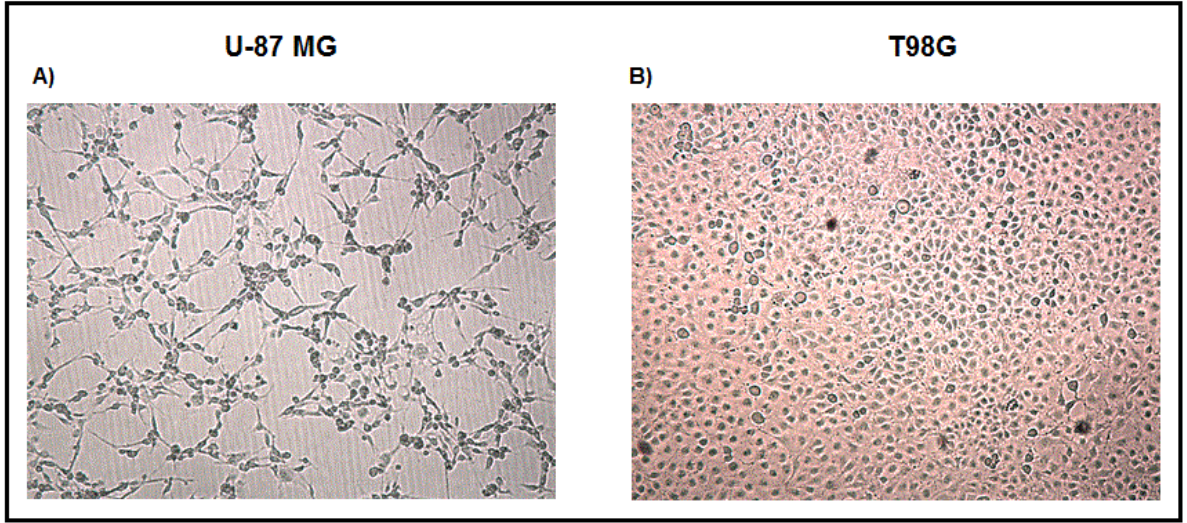
3.1. Hücre Hatlarının Temini ve İdamesi

İnsan glioblastoma multiforme hücre hatları U-87 MG ve T98G, Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı'nın American Type Culture Collection (ATCC) (Wesel, Almanya) firmasından satın aldığı ve çoğaltarak dondurduğu hücre hatları stoğundan temin edildi.

Hücre kültür işlemleri, çalışma öncesi UV ile sterilize edilen ve ardından alkol ile temizlenen laminar hava akımlı çalışma kabinlerinde NuAire (Plymouth, MN ABD) gerçekleştirildi. Sıvı azot tankında saklanan hücreler, 16 saat -80 °C'de bekletildi. Ardından sırasıyla -20 °C'de 3 saat ve +4 °C'de 1 saat bekletilen hücreler 37 °C'de su banyosunda çözöldü ve 75 cm² 'lik filtreli hücre kültür flasklarına aktarıldı.

U-87 MG hücreleri, Eagle's Minimum Essential Medium besiyerine (MEM) %10 Fetal Sığır Serumı, 5 ml penisilin/streptomisin (10.000 unite/ml) ve 5 ml Partricin (50 µg/ml) eklenerek; T98G hücreleri ise Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerine %10 Fetal Sığır Serumı, 5 ml penisilin/streptomisin (10.000 unite/ml) ve 5 ml Partricin (50 µg/ml) eklenerek 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörlerde (Binder, Tuttlingen, Germany) çoğaltıldı.

Hücre hatları canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak izlendi. Flasklarda %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözleendiğinde hücreler pasajlanarak yeni flasklara aktarıldı.



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan hücre hatlarının faz kontrast mikroskopunda çekilen görüntüleri (Büyütme oranı: 40X).

U-87 MG hücreleri, glioblastoma (seviye IV astrositoma) tanısı konmuş bir erkek hastanın beyninden izole edilmiş, epiteliyal ve yıldız şekilli bir morfoloji gösteren adherent hücrelerdir. Hücrelerin ~%48'inin 44 kromozom bulundurduğu ve bu nedenle hipodiploid oldukları bilinmektedir. Mutasyon analizleri sonucunda, 154 gende tek nükleotid varyasyonu, 178 gende küçük insersiyon/delesyonlar, 145 gende büyük mikrodelsiyonlar ve 35 gende interkromozomal translokasyonlar olmak üzere 512 genin homozigot mutant olduğu belirlenmiştir. p53 geni sağlam, p63 ve p73 genleri ise hipermetile durumdadır [47]. T98G hücreleri ise glioblastoma multiforme tanısı konmuş 61 yaşında Kafkasya kökenli erkek bir hastanın beyninden izole edilmiş, fibroblastik ve küresel şekilli bir morfoloji gösteren adherent hücrelerdir. Hücreler hiperpentaploid olup karakteristik olarak 128-132 kromozom bulundururlar. p53 geni mutant (237, Met -> Ile) olan bu hücrelerde p63 ve p73 proteinlerinin sentezlendiği bilinmektedir [47].

3.2. Stok Solüsyonların Hazırlanması

Trabectedin lyofilize halde, üretici firma olan Pharma Mar (Madrid, İspanya) yetkililerinden Dr. Carlos Galmarini'den temin edildi. 1.4 mg toz Trabectedin (761 g/mol), 1 ml DMSO (Dimetil Sülfoksit) içinde çözülerek 1.8397 mM'lık stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonlar 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi ve 10 µl'lik parçalar halinde -20 °C 'de saklandı. Her deney için yeni bir Trabectedin stoğu kullanıldı.

3.3. Hücrelerin Sayımı

Tripan mavisi ile muamele edilen hücreler canlı ise membran bütünlükleri korunduğundan boyanmazlar ve mikroskopta incelendiklerinde parlak görünürler. Ölü hücreler ise membran bütünlüklerini kaybettiklerinden boyanırlar ve mikroskopta incelendiklerinde koyu mavi renkte görülürler. Bu nedenle Tripan mavisi, hücre canlılığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Deneylere istenilen sayıda hücre ekilmesi için Tripan mavisi yöntemi ile sayım yapan T4 cellometer otomatik sayım cihazı (Cellometer, Nexcelom, ABD) kullanıldı. U-87 MG ve T98G hücrelerini içeren flasklardaki besiyerleri uzaklaştırılıp, 1 ml Tripsin/EDTA eklenen flasklar ~ 10 dakika inkübatörde bekletildi. Flask zemininden ayrılan hücreler 1 :1 oranında hazır besiyeri ile nötralize edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 25°C sıcaklıkta 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenen hücrelerin süpernatantları uzaklaştırılarak dibe çöken hücre pelleti 10 ml besiyeri içinde tekrar homojenize edildi. Tripan mavisi ile bu hücre süspansiyonu 1 :1 oranında karıştırıldı. Bu karışım otomatik sayım cihazının lamına aktarıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı otomatik olarak belirlendi.

3.4. Apoptozis'in Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisin araştırılmasında histon-ilişkili DNA fragmentasyonu ölçümü, kaspaz 3/7 aktivitesi ölçümü ile aktif mitokondri membranı ve canlı hücrelerdeki DNA boyamasının floresan mikroskopta görüntülenmesi yaklaşımları izlendi.

Erken ve geç dönemdeki apoptotik hücrelerin belirlenmesi için sitokrom c salınımı ve ölü hücrelerdeki DNA boyamasının flow sitometrik analizi yapıldı.

Apoptozisin belirlenmesinin ardından, sürecin iç ve/veya dış yolak aktive edilerek gerçekleştirildiğini araştırmak için Kaspaz 9 (iç yolağın araştırılması için) veya Kaspaz 8 (dış yolağın araştırılması için) inhibitörleri varlığında ve yokluğunda histon-ilişkili DNA fragmentasyonu ölçümü yapıldı. İç yolak aktivasyonunun doğrulanması için Bad, Bax, Bcl-2, c-IAP, Smac/Diablo, Kaspaz 9, Aktif (kesilmiş) Kaspaz 9 protein ekspresyonlarının ölçümü; dış yolak aktivasyonunun doğrulanması

için ise Bid, FADD, Kaspaz 8 ve Aktif (kesilmiş) Kaspaz 8 proteinlerinin ekspresyonlarının ölçümü yapıldı.

3.4.1. Histon-İlişkili DNA Fragmentlerinin Ölçümü

Hücre ölümü kaynaklı olarak oluşturulan sitoplazmik histon - ilişkili DNA framgentlerinin (mono- ve oligo- nukleozomlar) ölçümü için apoptotikk ve nekrotik hücre ölümünü ayırt etmeye olanak sağlayan Cell Death Detection ELISA^{Plus} Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Almanya) kullanıldı.

U-87 MG ve T98G hücreleri, her kuyucukta 100 µl içerisinde 10⁴ hücre olacak şekilde ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Ardından hücreler, Trabectedin'in 100 µl içerisinde hazırlanan artan konsantrasyonları ile (0.1 - 100 nM) 24 ve 48 saat sürelerince muamele edildi. İnkubasyonun ardından, ilaç eklenen ve eklenmeyen hücrelerin bulunduğu kuyucuklara, kitin içerdiği lizis solüsyonu eklendi ve plakeler 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Elde edilen hücre lizatları, kitin içerdiği streptavidin kaplı mikrolaka kuyucuklarına eklendi. Histon proteinleri ve nukleozomların örneklerle bağlanmasını sağlayan (Anti-histon biotin ve Anti-DNA-Peroksidaz) antikorları içeren immuno-kompleks eklenen mikrolakalar, orbital çalkalayıcı içerisinde 240 rpm'de oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Bağlanmayan bileşenlerin yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılmasının ardından, nukleozom miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesi, immuno-komplekslere bağlanan peroksidazların ölçülmesi ile gerçekleştirildi. Kuyucuklara ABTS substratı eklenen mikrolaka, DTX 880 Multimode Reader mikrolaka okuyucuda (Beckman Coulter, Miami, FL, ABD) 405 ve 490 nm dalgaboyları referans alınarak ölçüldü. Kitin içerdiği, pozitif kontrol olarak değerlendirilen stabil DNA-histon komplekslerinin absorbans değerleri baz alınarak, Trabectedin, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 inhibitörleri ile muamele edilen ve edilmeyen lizatlara ait kuyucukların absorbansları değerlendirildi.

$$\begin{aligned} & \% \text{Histon} - \text{İlişkili DNA Fragmentasyonu} \\ & = \frac{\text{İlaçlı kuyucukların absorbans ortalaması} \times 100}{\text{Pozitif Kontrol kuyucuklarının absorbans ortalaması}} \end{aligned}$$

formülü kullanılarak hesaplandı.

3.4.2 Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Belirlenmesi

Trabectedin'in T98G hücrelerindeki kaspaz 3/7 aktivitesi üzerindeki etkisi Caspase-Glo 3/7 Assay Kiti (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak araştırıldı. U-87 MG ve T98G hücreleri, her kuyucukta 100 µl içerisinde 10⁴ hücre olacak şekilde ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Ardından hücreler, Trabectedin'in 100 µl içerisinde hazırlanan artan konsantrasyonları ile (0.1 - 100 nM) 24 ve 48 saat sürelerince muamele edildi. Kitin içerdiği Caspase-Glo 3/7 solüsyonu (2.5 ml), substratı ile 1:1 oranında karıştırıldı. Bu karışımdan her kuyucuğa 100 µl eklenen mikroparka oda sıcaklığında ışısız ortamda bir saat inkube edildi. Inkubasyon sonunda oluşan luminesans miktarı DTX 880 Multimode Reader mikroparka okuyucuda (Beckman Coulter, Miami, FL, ABD) ölçüldü. Ölçülen luminesans miktarı, hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesiyle doğru orantılı olarak değerlendirildi.

$$\text{Kaspaz 3/7 Aktivitesi} = \frac{\text{İlaçlı kuyucukların luminesans ortalaması}}{\text{Kontrol kuyucuklarının luminesans ortalaması}}$$

formülü ile hesaplandı.

3.4.3. TMRE/HOECHST İkili Boyaması ile Apoptotik Hücrelerin Görüntülenmesi

Trabectedin etkisi ile apoptozise giden T98G hücrelerini görüntülemek için Multi-Parameter Apoptosis Assay Kit (CaymanChem, Michigan, ABD) kullanıldı.

T98G hücreleri, her kuyucukta 5x10⁵ hücre olacak şekilde 6'lı plakalara ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Inkubasyonun ardından hücreler 13 nM Trabectedin ile 48 saat süresince 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde muamele edildi. TMRE/Hoechst boya solüsyonu, 10 µl Cell-Based Assay TMRE ve 5 µl Cell-Based Assay Hoechst boyasının 1 ml besiyeri içerisinde karıştırılması ile hazırlandı. Hazırlanan bu karışım, 1 ml besiyeri içerisinde

100 µl boya solüsyonu olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve 6'lı plaka 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 15 dakika inkübe edildi. Inkubasyonun ardından 6'lı plaka 400xg 'de 5 dakika santrifüj edildi ve kuyucuklardaki boya uzaklaştırılıp kitin içerdiği bağlanma solusyonundan (1x) kuyucuk başına 2 mililitre eklendi. Hücreler floresan mikroskopta Olympus görüntülendi. Sağlıklı mitokondrilere sahip hücreler TMRE ile boyanır ve rhodamine'i (eksitasyon/emisyon 540/570 nm) veya Texas Red'i (eksitasyon/emisyon 590/610 nm) tanımak için tasarlanmış filtrede görüntülenebilirken; hücrelerdeki nukleusu boyayan Hoechst boyası ise UV filtre ile görüntülenebilir. TMRE ile boyanan hücreler 540/570 nm'lik floresan filtrede, Hoechst ile boyanan hücreler ise UV filtrede görüntülendi. Aynı kareden elde edilen TMRE ve Hoechst görüntüleri mikroskobun yazılımında (StreamBasic) üst üste getirilerek ikili analiz yapıldı.

3.4.4. Annexin V/7-AAD İkili Boyamasının Flowsitometrik Analizi ile Erken ve Geç Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

Trabectedin etkisi ile apoptozise giden erken ve geç apoptotik hücrelerin belirlenmesi için Multi-Parameter Apoptosis Assay Kit (CaymanChem, Michigan, ABD) kullanıldı.

T98G hücreleri, her kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde 6'lı plakalara ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Inkubasyonun ardından hücreler deney uygulanan deney planına göre ilgili ajan ve inhibitörlerle belirtilen sürelerce 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde muamele edildi. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile toplanıp test tüplerine aktarıldı. Tüpler 400g'de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüjün ardından süpernatantlar uzaklaştırıldı. Bu aşamada, Annexin V/7-AAD boya solüsyonu, 10 µl Cell-Based Assay Annexin V FITC ve 5 µl Cell-Based Assay 7-AAD boyalarının 5 ml bağlanma solusyonu içerisinde karıştırılmasıyla hazırlandı. Santrifüjle elde edilen pellet, 800 µl boya solüsyonu içerisinde çözüldü ve tüpler karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi. Tüpler 400g'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi ve süpernatant tekrar uzaklaştırıldı. Elde

edilen pellet 2 ml bağlanma solusyonunda çözüldü. Hücreler flow sitometride (The BD Accuri™ C6, Franklin Lakes, NJ, USA) analiz edildi. Annexin V ile boyanan erken dönemdeki apoptotik hücrelerin analizinde FL1 kanalı; 7-AAD ile boyanan geç apoptotik ve/veya nekrotik hücrelerin analizinde ise FL3 kanalı kullanıldı.

3.4.5. Kaspaz 8 ve 9 İnhibitörleri ile İç ve Dış Apoptotik Yolakların Analizi

T98G hücre hatlarında Trabectedin aracılı apoptotik etkinin iç yoldan gerçekleşip gerçekleşmediğini araştırmak için Caspase-9 Inhibitor Z-LEHD-FMK (BioVision Inc., Milpitas, CA); dış yoldan gerçekleşip gerçekleşmediğini araştırmak için ise Caspase-8 Inhibitor Z-IETD-FMK (BioVision Inc., Milpitas, CA) kullanıldı. İnhibitörler hücrelere artan dozlarda (5-50 μ M) uygulanarak aktivite gösterdikleri doz (20 μ M) belirlendi.

T98G hücreleri, her kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde 96'lı mikrotiplere ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Inkubasyonun ardından hücreler: (1) Pozitif kontrol, (2) Trabectedin veya inhibitörler ile muamele edilmemiş hücreler, (3) yalnızca inhibitörler ile muamele edilmiş hücreler, (4) 13 nM Trabectedin ile muamele edilmiş hücreler ve (5) Önce kaspaz inhibitörü ile 2 saat ön muamele edilmiş ve ardından 13 nM Trabectedin uygulanmış hücreler olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Bu deney planına uygun olarak Histon-İlişkili DNA Fragmentleri ölçüldü (Bkz 3.4.1).

İç yolk aktivasyonunun doğrulanması için Bad, Bax, Bcl-2, c-IAP, Smac/Diablo, Kaspaz 9, Aktif (kesilmiş) Kaspaz 9 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri; dış yolk aktivasyonunun doğrulanması için ise Bid, FADD, Kaspaz 8 ve Aktif (kesilmiş) Kaspaz 8 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile ölçüldü.

3.5. Otofaji Ölçülmesinde Kullanılan Yöntemler

Otofajinin araştırılmasında, otofajik vakuollerin floresan mikroskop altında kalitatif ve kantitatif olarak ölçümü ile literatürde otofaji ile ilişkili araştırmalarda en yaygın kullanılan belirteçler olan LC3-I, LC3-II, SQSTM1/P62 ve Beclin-1 protein ekspresyonlarının ölçümü yapıldı.

3.5.1. Monodansylcadaverine (MDC) Boyaması ile Otofajik Vakuollerin Görüntülenmesi

U-87 MG hücre hatlarında Trabectedin aracılı otofajik vakuol miktarındaki değişimi görüntülemek amacıyla, vakuol membran lipidleriyle spesifik etkileşerek ve iyon yakalayarak (ion trapping) otofajik vakuollerin görüntülenmesini sağlayan otofloresan bir boya olan Monodansylcadaverine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) boyaması yapıldı. U-87 MG hücreleri, her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 24'lü plakalara ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Inkubasyonun ardından hücreler 5 nM Trabectedin ile 48 saat süresince 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde muamele edildi. Trabectedin muamelesinin ardından kuyucuklara serumsuz besiyeri içerisinde 5 mM MDC eklenerek hücreler 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 8 dakika bekletildi. Kuyucuklar PBS (Merck) ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı ve boyanan hücreler floresan mikroskopta (Olympus BX53, Tokyo, Japonya) görüntülendi.

3.6. Western Blot

U-87 MG ve T98G hücreleri, her kuyucukta 500.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Kırksekiz saat Trabectedin muamelesinin ardından, M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) kullanılarak hücrelerden protein lizatları izole edildi. Elde edilen total protein miktarları Bradford yöntemiyle (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, USA) ölçüldü. Ölçülen proteinler eşit miktarda molecular weight marker ile birlikte SDS Poli-akrilamid jel'e yüklendi ve elektroforezle (120 V, 2 saat, oda sıcaklığı) birbirlerinden ayrılmaları sağlandı (PAGE). Elektroforezin ardından, jel, nitroselüloz membran, filtre kağıtları ve süngerleri içeren sandviç hazırlandı. Bu sandviç +4 °C'de 115 V'da 75 dakika yürütülerek proteinlerin jelden nitroselüloz membrana (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) transferi yapıldı. Jel ve membran sırasıyla Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) ve Ponceau S (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, ABD) boya ile boyanarak transferin gerçekleştiği doğrulandı. Transferin ardından membranlar, % 0.1 Tween20 içeren Tris Buffered Saline solüsyonu (TBS-T) ve %5 yağ içermeyen süt tozu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) ile hazırlanan bloklama solüsyonunda, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bloklanan membranlar TBST ile 2 defa yıkandı ve ardından primer antikorlarla (Tablo X) (Abcam, Cambridge, UK) 4 °C 'de 16 saat inkübe edildi. Primer antikorla muamele edilmiş membranlar TBST ile 5'er defa 5'er dakika arayla yıkandı. Yıkama basamaklarının ardından membranlar primer antikora uygun sekonder antikorlar (Abcam, Cambridge, UK) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Protein bandları, Immun-Star™ HRP Chemiluminescent Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) kullanılarak Kodak Gel Logic 1500 Görüntüleme Sistemi (Carestream Molecular Imaging, Newhaven, CT, ABD) ile görüntülendi ve ImageJ v1.48 (NIH, Maryland, ABD) yazılımı kullanılarak görüntülerin kantitasyonu yapıldı. β -Actin yükleme kontrolü olarak kullanıldı ve tüm inkübasyon basamakları orbital çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirildi.

Tablo 1: Western blot deneylerinde kullanılan antikorlar.

İsim	Katalog numarası	Üretici firma
Anti-active Caspase 9 antibody	ab2324	Abcam
Anti-Bad antibody	ab32445	Abcam
Anti-Bax antibody	ab32503	Abcam
Anti-Bcl-2 antibody	ab7973	Abcam
Anti-Bec1 antibody	ab183335	Abcam
Anti-Bec1-1 Antibody	3738S	Cell Signaling
Anti-Beta Actin antibody	ab8227	Abcam
Anti-Bid antibody	ab32060	Abcam
Anti-Caspase-8 antibody	ab32125	Abcam
Anti-Caspase-9 antibody	ab32539	Abcam
Anti-DAP Kinase 1 antibody	ab109382	Abcam
Anti-FADD antibody	ab52935	Abcam
Anti-GABARAP2 antibody	ab126607	Abcam
Anti-LC3A/B antibody	ab58610	Abcam

Anti-p63 antibody	ab53039	Abcam
Anti-p73 alpha+beta antibody	ab17230	Abcam
Anti-SQSTM1 / p62 antibody	ab56416	Abcam
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	ab6789	Abcam
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	ab6721	Abcam

3.7. Trabectedin - p53 İlişkisinin Pifithrin- α ile Araştırılması

Sağlam p53 'e sahip U-87 MG hücre hattında Trabectedin aracılı etkide p53'ün rolü, spesifik p53 inhibitörü olan Pifithrin- α (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, ABD) varlığında ve yokluğunda Trabectedin'in etkileri ölçülerek araştırıldı.

Öncelikle Pifithrin- α 'nın artan konsantrasyonları (10-50 μ M) hücrelere uygulandı. Ardından nukleozom fragmentasyonu ve hücre canlılığı ölçülerek inhibitörün aktivite gösterdiği konsantrasyon (30 μ M) belirlendi.

U-87 MG hücreleri, tasarlanan deney planına göre, 96 kuyucuklu mikrolaka, 24'lü plakala ve 6'lı plaka için sırasıyla her kuyucukta 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Inkübasyonun ardından hücreler: (1) Pozitif kontrol, (2) Pifithrin- α ile muamele edilmiş hücreler, (3) 5 nM Trabectedin uygulanmış hücreler ve (4) Pifithrin- α ile ön muamele edilmiş ve ardından 5 nM Trabectedin uygulanmış hücreler olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Bu plana uygun olarak hücre proliferasyonu, hücre canlılığı, MDC boyaması, CO-IP ve western blot deneyleri yapıldı.

3.8. siRNA Uygulamaları

Hücreler 96 kuyucuklu mikrolaka ve 6'lı plaka için sırasıyla her kuyucukta 1×10^4 ve 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi ve tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Ardından, 5 nmol p63 siRNA (siRNA dizisi: 5'-GGACAGUACAAAGAACGGUTT-3') (Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) 50 μ l nükleaz içermeyen su içerisinde (Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) çözülerek 100 μ M (100 pmol/ml) ana stok hazırlandı.

Bu ana stok 1:10 dilue edilerek 10 μ M'lık çalışma stokları hazırlandı ve bu stoklar -20 °C no-frost derin dondurucuda saklandı.

Transfeksiyon basamağı, Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) solusyonu kullanılarak gerçekleştirildi. Lipofectamine 3000 solusyonu, serumsuz DMEM besiyeri ile 3:50 oranında dilüe edilerek transfeksiyon solüsyonu hazırlandı. Ardından 10 μ M siRNA serumsuz DMEM besiyeri ile 1:50 oranında dilüe edilerek siRNA solusyonu hazırlandı. Transfeksiyon solusyonu ve siRNA solusyonu 1:1 oranında karıştırıldı ve bu karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilerek siRNA-Lipid kompleksinin oluşması sağlandı. Oluşan siRNA-Lipid kompleksi kuyucuklara damla damla eklendi ve plateler 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Transfeksiyonun ardından hücreler: (1) Kontrol, (2) p63 siRNA'sı ile muamele edilmiş hücreler, (3) 13 nM Trabectedin uygulanmış hücreler ve (4) p63 siRNA'sı ile 24 saat ön muamele edilmiş ve ardından 13 nM Trabectedin uygulanmış hücreler olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Bu plana uygun olarak hücre canlılığı, nukleozom fragmentasyonu, CO-IP ve western blot deneyleri yapıldı. siRNA'nın susturma potansiyeli, western blot ile hedef proteinin (p63) ekspresyonu ölçülerek kontrol edildi.

3.9. Co – Immunoprecipitasyon

Trabectedin, p53 inhibisyonu ve p63 inhibisyonunun Bcl-2 / Beclin-1 dimerizasyonu üzerindeki etkisinin araştırılmasında The Pierce Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit (26149) kullanıldı.

U-87 MG ve T98G hücreleri, her kuyucukta 1x10⁶ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Hücreler: (1) Kontrol, (2) p63 siRNA'sı ile muamele edilmiş hücreler, (3) p53 inhibitörü ile muamele edilmiş hücreler, (4) 13 nM Trabectedin ile muamele edilmiş hücreler, (5) 5 nM Trabectedin ile muamele edilmiş hücreler, (6) p63 siRNA'sı ile 24 saat ön muamele edilmiş ve ardından 13 nM Trabectedin uygulanmış hücreler ve (7) p53 inhibitörü ile 24 saat ön muamele edilmiş ve ardından 13 nM Trabectedin uygulanmış hücreler olmak üzere 7 gruba ayrıldı. Bu plana uygun olarak yapılan

uygulamaların ardından hücrelerden M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) kullanılarak protein lizatları izole edildi. Elde edilen total protein miktarları Bradford yöntemiyle (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ölçüldü.

Elde edilen protein lizatları, olası yanlış bağlanmaları engellemek için kitin içerdiği yıkama solüsyonu ile +4 °C'de 240 rpm'de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra 250 µg Beclin-1 antikor, amin-reaktif rezin solüsyonu ile +4 °C'de 240 rpm'de 2 saat inkübe edilerek Beclin1-bağlı rezin kompleksi oluşturuldu. Beclin1-bağlı rezin kompleksi ile protein lizatlarının karıştırılması ve bu karışımın +4 °C'de 240 rpm'de 16 saat inkübe edilmesiyle Bcl-2/Beclin1-bağlı rezin kompleksinin oluşması sağlandı. Toplama tüplerine aktarılan örnekler 200 µl yıkama solüsyonuyla yıkandı. Yıkama basamağı, süpernatant içerisinde spektrofotometrede ölçülebilir miktarda protein kalmayınca kadar tekrarlandı. Toplama tüpleri 50 µl elution buffer ile yıkanarak, örnekler içerisindeki Bcl-2/Beclin1-bağlı rezin kompleksinin ayrıştırılması sağlandı. Bu işlem sonucunda elde edilen protein miktarları Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) yöntemi ile ölçüldü. Elde edilen proteinlerdeki Bcl-2 ekspresyonu western blot yöntemi ile belirlendi. Rezin içeren tüm santrifüj işlemleri 1000 x g'de gerçekleştirildi.

3.10. Hücre Döngüsü Faz Dağılımının Belirlenmesi

Trabectedin etkisi hücre döngüsünde meydana gelen duraksamanın belirlenmesi için Cell Cycle Phase Determination Kit (CaymanChem, Michigan, ABD) kullanıldı.

U-87 MG ve T98G hücreleri, her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve hücreler tutunmaları için 37 °C sıcaklık, %5 karbondioksit ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. Hücreler: (1) kontrol ve (2) Trabectedin'in her hücre kültürü için IC_{50} değeri ile 36 saat muamele edilmiş hücreler olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Bu plana uygun olarak yapılan uygulamaların ardından hücreler tripsinize edilerek plaka zemininden kalkmaları sağlandı ve tüpler 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek hücreler toplandı. Pelletler

kitin içerdği yıkama solüsyonuyla 2 defa yıkandı. Ardından pellet 1 ml assay buffer içerisinde çözülerek hücrelerin birbirlerinden ayrılıp tekli bir dağılım oluşturması sağlandı. Daha sonra hücreler 1ml fiksatif ile karıştırılarak -20 °C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler propidyum iyodid ile boyandı ve 500 x g’de 5 dk santrifüj edildi. Fiksatif uzaklaştırıldı ve pellet 500 µl boyama solüsyonunda çözülerek 30 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Örnekler flow sitometride (The BD Accuri™ C6) 488 nm lazer ve 650 nm filtre kullanılarak analiz edildi.

3.11. İstatistiksel Analiz

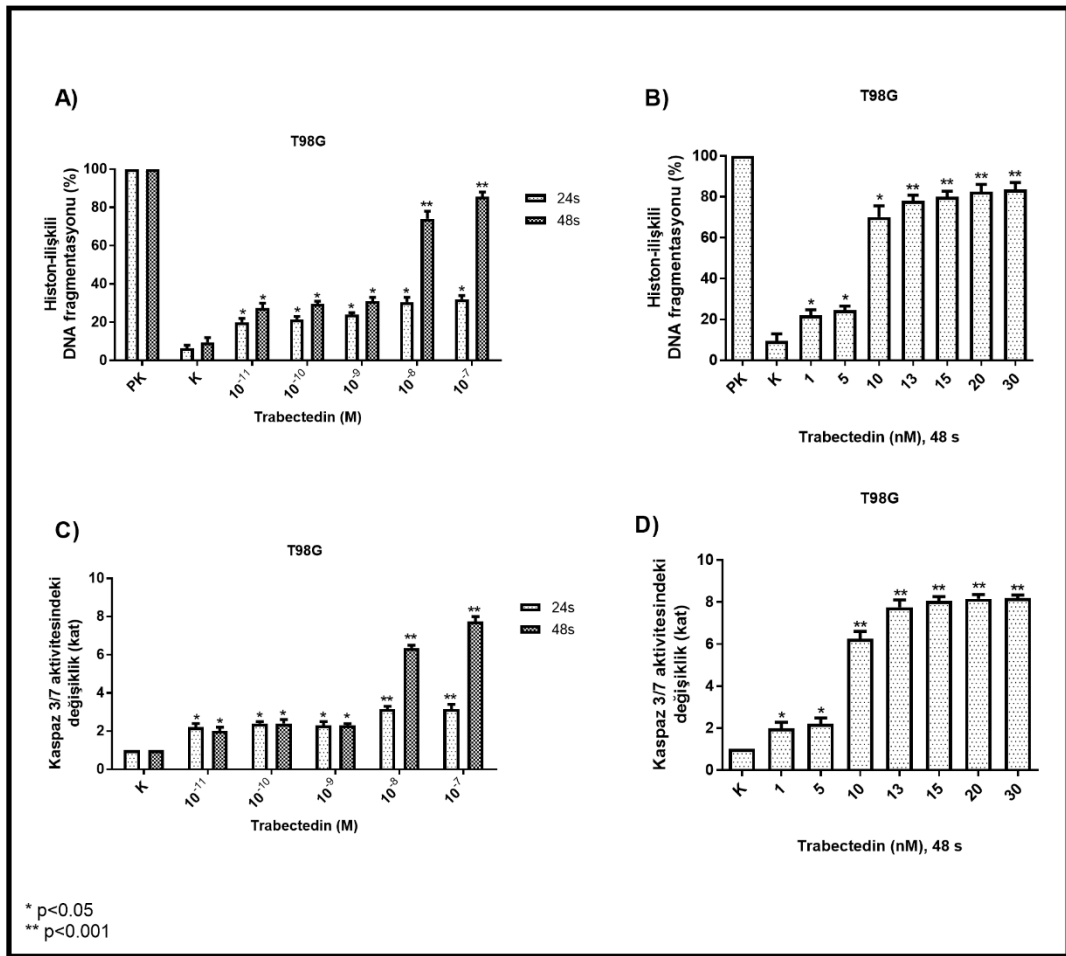
Aksi belirtilmedikçe grafiklerin çizimi ve istatistiksel analizin yapılmasında GraphPad 6.0 yazılımı (La Jolla, CA, ABD) kullanıldı. Her deney üç defa tekrarlandı ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizde one way ANOVA ve takiben Dunnett test kullanıldı. İnhibitor ve siRNA içeren grupların kontrol ve tekli uygulamalarla karşılaştırılması için Bonferroni testi uygulandı. Flow sitometri deneylerinin grafikleri ve istatistiksel analizi BD Accuri C6 yazılımı (Franklin Lakes, NJ, USA) kullanılarak yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.1. Trabectedin T98G Hücre Kültürlerinde Apoptozisi İndüklemektedir

Trabectedin'in artan konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilen T98G hücre kültürlerinin histon-ilişkili DNA fragmentasyonu ve kaspaz 3/7 aktivitesinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak azalma belirlendi (Şekil 4.1) (*p<0.05 **p<0.001).

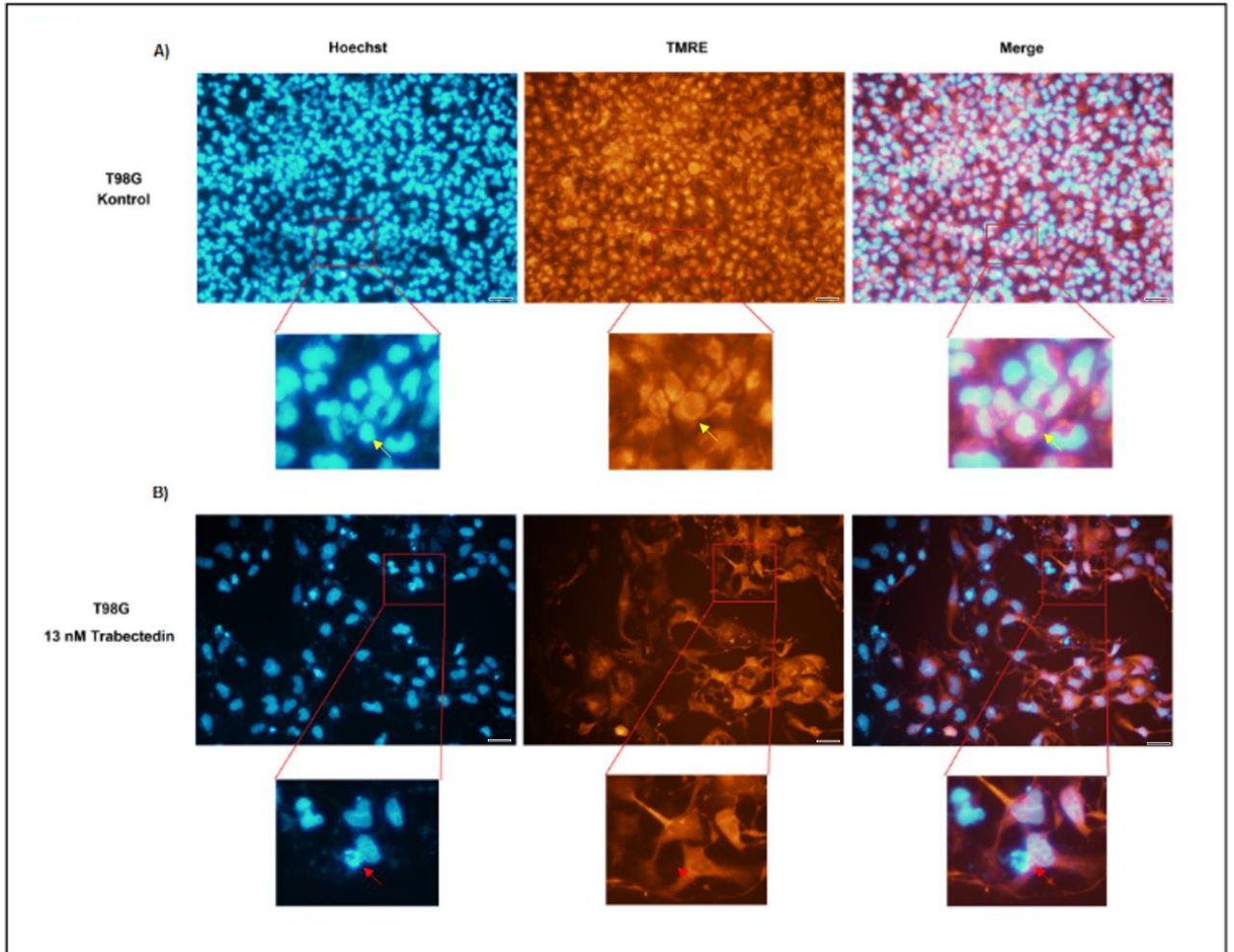


Şekil 4.1: Trabectedin'in artan konsantrasyonlarıyla 24 ve 48 saat muamele edilen T98G hücre kültürlerinde histon-ilişkili DNA fragmentasyonu (A ve B) ve kaspaz 3/7 aktivitesi (C ve D) ile apoptozisin gösterilmesi (PK: Pozitif Kontrol, K: Kontrol).

Trabectedin'in geniş aralıkta (10^{-11} - 10^{-7} M) uygulanması sonucu gözlenen etkinin 10^{-8} - 10^{-7} M konsantrasyonlar arasında en yüksek seviyeye ulaştığı gözlemlendi. Doz aralığı 1-30 nM olarak daraltıldığında ise 10^{-8} M (10 nM) ve 10^{-7} M (100 nM) konsantrasyonlar arasında gözlenen etkinin 10 ve 30 nM aralığında ortaya çıktığı

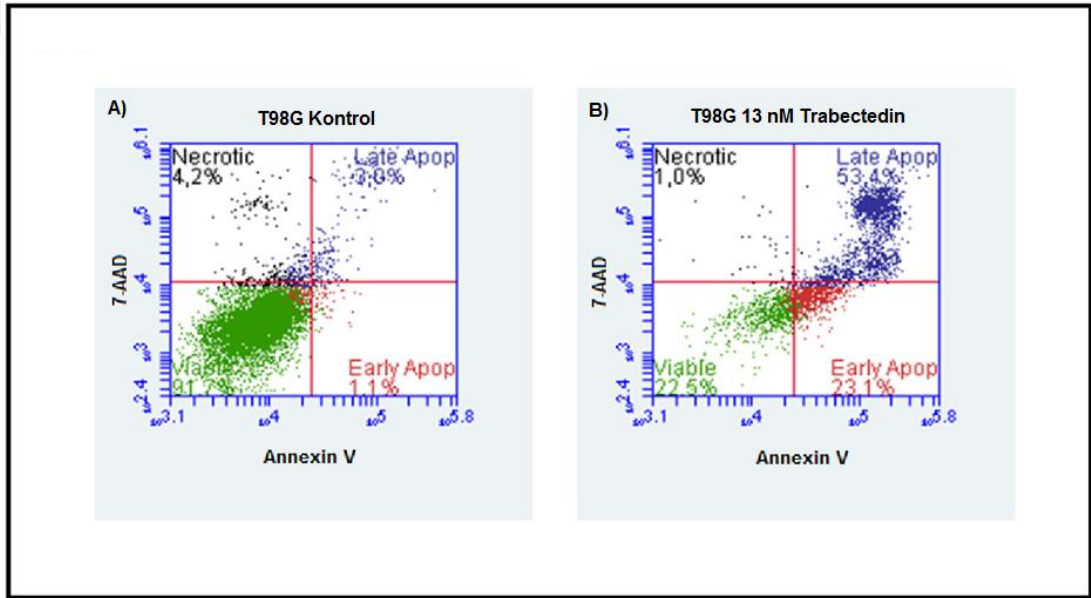
saptandı. Bu nedenle, apoptozisin daha ayrıntılı olarak araştırılması amacıyla tasarlanan deneylerde T98G hücre kültürleri, Trabectedin'in IC₅₀ değeri olan 13 nM ile 48 saat muamele edildi.

Trabectedin'in T98G hücre kültürlerinde nuklear morfoloji ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkilerini araştırmak için hücreler Hoechst ve TMRE ile boyanarak floresan mikroskop altında analiz edildi (Şekil 4.2). Kontrol hücrelerinde intakt bir nuklear morfoloji ve TMRE boyaması gözlenirken (Şekil 4.2A / Sarı oklar), 13 nM Trabectedin ile 48 saat muamele edilen hücrelerde kodanse ve fragmente olmuş nuklear morfoloji ile bozulmuş veya tamamen kaybolmuş mitokondriyal membran potansiyeli gözlemlendi (Şekil 4.2B / Kırmızı oklar).



Şekil 4.2: 13 nM Trabectedin ile 48 saat muamele edilen T98G hücre kültürlerinde nuklear morfoloji ve mitokondriyal membran potansiyelinin Hoechst/TMRE boyaması ile floresan mikroskopta analizi (Büyütme oranı: 20X; Ölçek: 200 µm).

Trabectedin etkisi ile aktive olan apoptoziste erken ve geç dönemdeki apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla 13 nM Trabectedin ile 48 saat muamele edilen ve edilmeyen T98G hücre kültürleri Annexin V ve 7-AAD ile boyanarak flow sitometride analiz edildi (Şekil 4.3). Kontrol hücrelerinin % 91,7'sinin Annexin V ve 7-AAD ile boyanmadığı (canlı – sol alt kısım); % 4,2'sinin yalnızca 7-AAD ile boyandığı (nekrotik – sol üst kısım); % 1,1'inin yalnızca Annexin V ile boyandığı (erken apoptotik - sağ alt kısım) ve % 3,2'sinin hem Annexin V hem de 7-AAD ile boyandığı (geç apoptotik – sağ üst kısım) belirlendi (Şekil-3A). Trabectedin ile muamele edilen hücrelerin % 20,7'sinin canlı; % 1'inin nekrotik; % 23,1'inin erken apoptotik ve % 53,4'ünün geç apoptotik olduğu saptandı ($p<0.01$) (Şekil 4.3B).



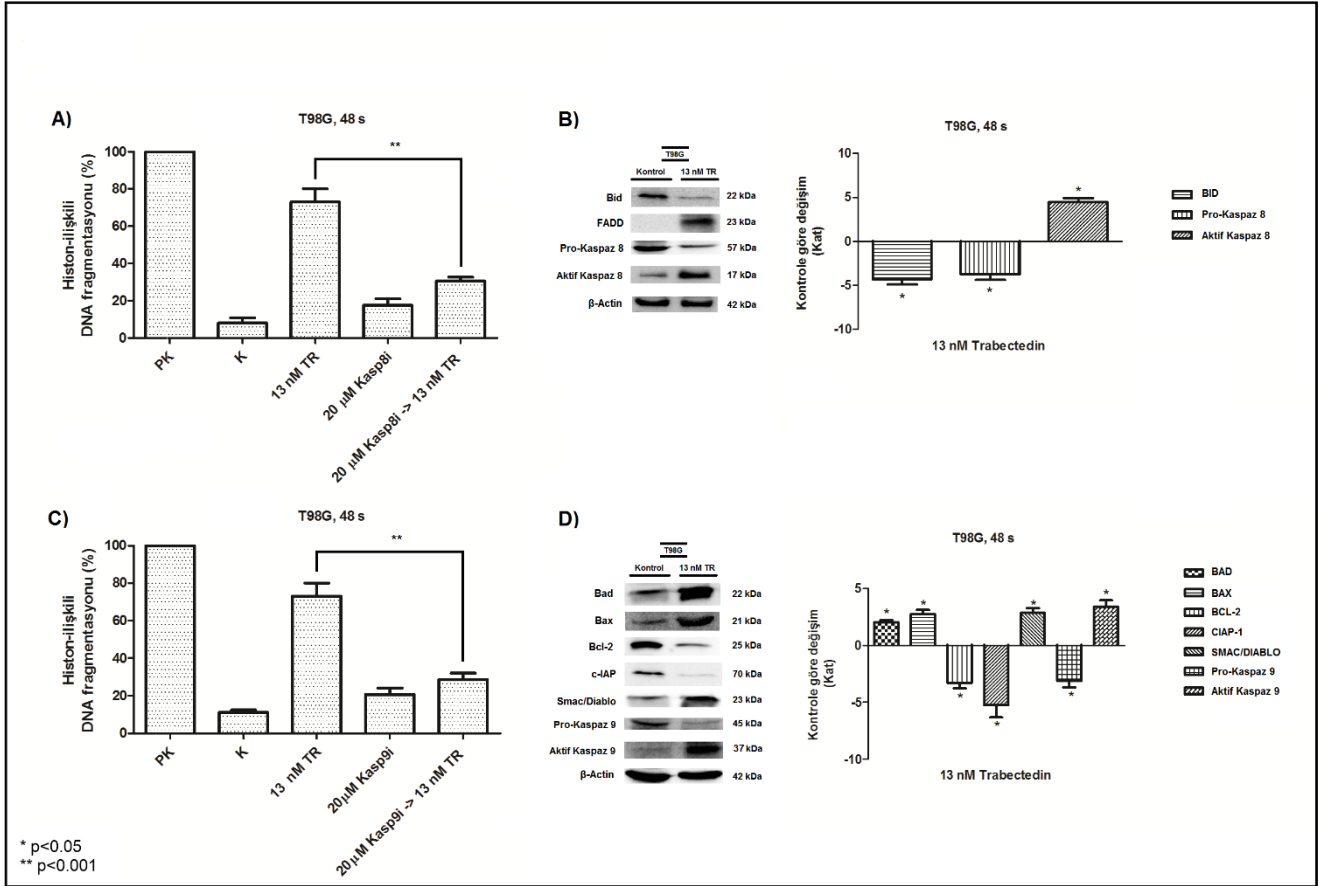
Şekil 4.3: 13 nM Trabectedin ile 48 saat muamele edilen ve edilmeyen T98G hücre kültürlerinde erken ve geç apoptotik hücreleri belirlemek için Annexin V/7-AAD boyamasının flow sitometrik analizi.

4.1.1.2. Trabectedin ile İndüklenen Apoptoziste Hem İç Hem De Dış Yolak Aktive Olmaktadır

T98G hücre kültürlerinde Trabectedin etkisi ile indüklenen apoptozis sürecinde iç ve/veya dış apoptotik yolların aktive olup olmadığını araştırmak için, ilgili yolların aktivasyon sürecinde rol alan kaspazlar spesifik inhibitörler ile baskılanarak histon-ilişkili DNA fragmentasyonu ölçüldü. İç yolak aktivasyonunu araştırmak için spesifik Kaspaz 9 inhibitörü olan Z-LEHD-FMK; dış yolak

aktivasyonunu araştırmak için ise spesifik Kaspaz 8 inhibitörü olan Z-IETD-FMK kullanıldı.

İnhibitör deneylerini doğrulamak için ilgili yolakta görev alan protein ekspresyonları western blot yöntemiyle ölçüldü ve veriler kantifiye edildi. İç yolak aktivasyonunun doğrulanması için Bad, Bax, Bcl-2, c-IAP, Smac/Diablo, pro-kaspaz 9, aktif (kesilmiş) kaspaz 9; dış yolak aktivasyonunun doğrulanması için ise Bid, FADD, pro-kaspaz 8 ve aktif (kesilmiş) kaspaz 8 incelendi. Buna göre, Yalnızca Trabectedin ile muamele edilen hücelere kıyasla, kaspaz 8 enzimi spesifik inhibitör ile baskılanan T98G hücre kültürlerinde Trabectedin ile indüklenen histon-ilişkili DNA fragmentasyonunun azaldığı saptandı ($p<0.001$) (Şekil 4.4A).



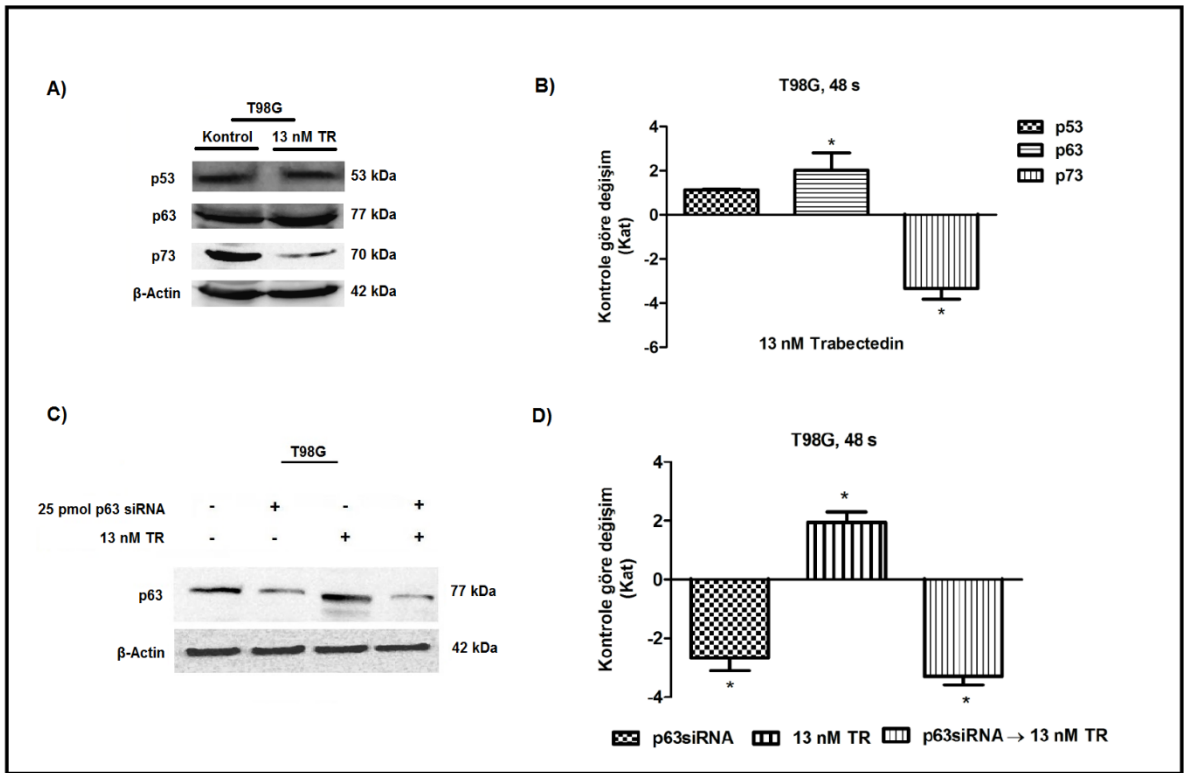
Şekil 4.4: Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen T98G hücre kültürlerinde kaspaz 8 ve kaspaz 9 inhibitörleri varlığında/yokluğunda histon-ilişkili DNA fragmentasyonu ölçümü (A ve C), dış ve iç apoptotik yollarla ilgili proteinlerin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve verilerin kantifikasyonu (B ve D).

Dış yolak ile ilişkili pro-apoptotik proteinlerden FADD'ın kontrol hücrelerinde sentezi belirlenemezken, Trabectedin ile muamele edilen hücrelerde sentezlendiği belirlendi. Dış yolak ile ilişkili pro-apoptotik proteinlerden bir diğeri olan aktif kaspaz 8 'in ise kontrol hücrelerine kıyasla 4.45 kat arttığı saptandı. Dış yolak aktivasyonu sırasında kesilerek aktif forma dönüşmesi öngörülen pro-kaspaz 8 ve Bid proteinlerinin sırasıyla 3.75 ve 4.32 kat azaldığı belirlendi (Şekil 4.4B).

Yalnızca Trabectedin ile muamele edilen hücrelere kıyasla, kaspaz 9 enzimi spesifik inhibitör ile baskılanan T98G hücre kültürlerinde Trabectedin ile indüklenen Histon-ilişkili DNA fragmentasyonunun azaldığı saptandı ($p < 0.001$) (Şekil 4.4C). Mitokondri ile ilişkili pro-apoptotik proteinlerden Bad, Bax, Smac/DIABLO ve aktif kaspaz 9 ekspresyonlarının sırasıyla 2.03, 2.74, 2,84 ve 3,4 kat arttığı saptanırken; anti-apoptotik proteinlerden Bcl2 ve c-IAP1 ile pro-kaspaz 9 ekspresyonlarının sırasıyla 3.27, 5.25 ve 3.1 kat azaldığı saptandı (Şekil 4.4D). Bu bulgular, T98G hücre kültürlerinde Trabectedin aracılı apoptotik etkinin hem iç hem de dış yolak aktive olarak gerçekleştiğini belirtmektedir.

4.1.1.3. Trabectedin ile İndüklenen Apoptozis p63 Aracılı Olarak Gerçekleşmektedir

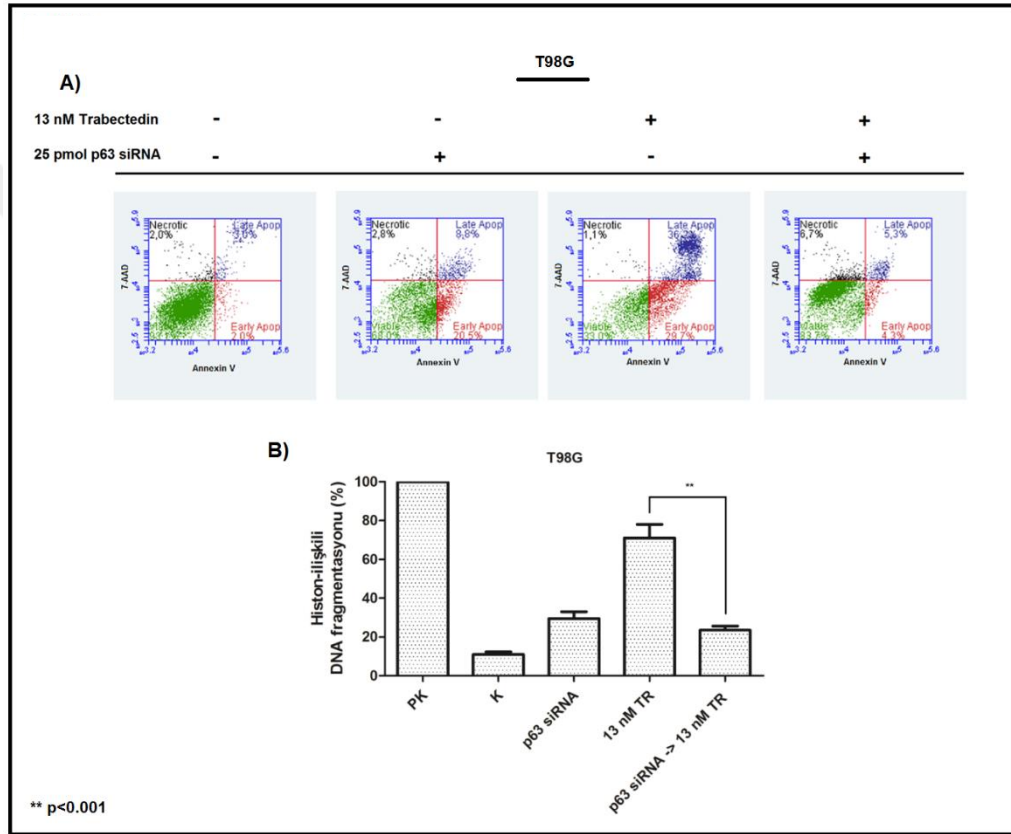
Trabectedin ile indüklenen apoptoziste p53 ailesi üyelerinin rolünü araştırmak için, T98G hücre kültürleri 13 nM Trabectedin ile muamele edildi ve ardından p53, p63 ve p73 protein ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Trabectedin muamelesi sonucu T98G hücrelerinde p53 (mutant) ekspresyonu değişmezken, p63'ün 2.3 kat arttığı, p73'ün ise 3.3 kat azaldığı belirlendi (Şekil 4.5A).



Şekil 4.5: Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen T98G hücre kültürlerinde p53, p63 ve p73 protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması (A ve B). p63 ekspresyonunun siRNA ile baskılanması (B ve C) * $p < 0.05$.

Trabectedin ile indüklenen apoptozisin p63 aracılı olarak gerçekleşip gerçekleşmediği araştırmak amacıyla T98G hücre kültürlerinde p63 sentezi 25 pmol siRNA kullanılarak engellendi. siRNA uygulamasının başarılı olup olmadığı p63 protein ekspresyonu ölçülerek araştırıldı. Şekil 4.5C’ de gösterildiği üzere p63 ekspresyonunun siRNA uygulaması ile ~ % 80 oranında baskılandığı belirlendi. Ayrıca p63 ekspresyonu baskılandıktan sonra T98G hücreleri tekrar Trabectedin ile muamele edilse bile p63 ekspresyonun artmadığı saptandı (Şekil 4.5C).

p63'ün Trabectedin ile indüklenen apoptozis sürecinde rolü olup olmadığını araştırmak için sağlam ve baskılanmış p63 içeren T98G hücreleri Trabectedin ile muamele edildi ve ardından Annexin V/7-AAD boyamasının flow sitometrik analizi yapıldı. Flow sitometri deneylerini doğrulamak için histon-ilişkili DNA fragmentasyonu ölçüldü. Flow sitometrik analizlere göre, Trabectedin ile muamele edilen T98G hücre popülasyonunun % 65,9'u Annexin V/7-AAD yönünden pozitif iken; p63 sentezi baskılandığında bu oranın % 9,6 olduğu saptandı (Şekil 4.6A) ($p<0.001$).

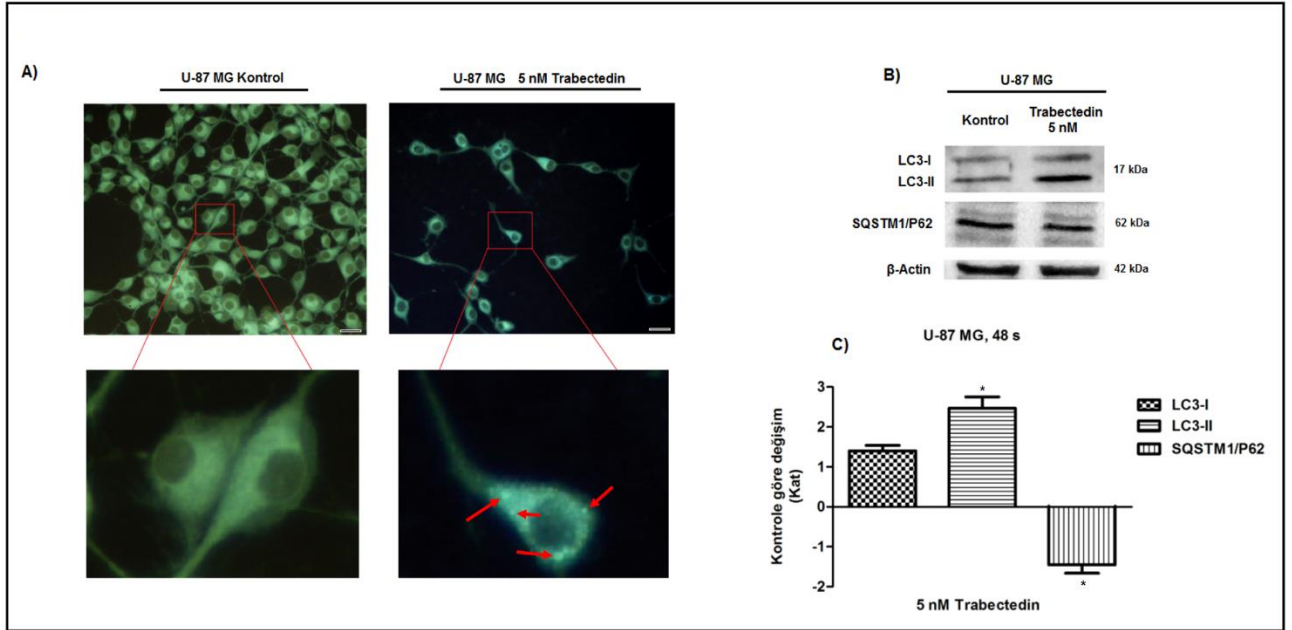


Şekil 4.6: Trabectedin'in p63 ekspresyonu baskılanan ve baskılanmayan T98G hücre kültürlerinde Annexin V/7-AAD değişimi ve histon-ilişkili DNA fragmentasyonu üzerindeki etkileri.

Histon-ilişkili DNA fragmentasyonu incelendiğinde, flow sitometri sonuçlarına benzer şekilde, p63 sentezi baskılandığında Trabectedin ile indüklenen histon-ilişkili DNA fragmentasyonunun % 47,5 oranında azaldığı saptandı (Şekil 4.6B) ($p<0.001$).

4.1.2. Trabectedin U-87 MG Hücre Kültürlerinde Otofajiyi İndüklemektedir

Trabectedin'in U-87 MG hücre kültürlerinde otofajiyi indükleyip indüklenmediğini araştırmak için hücreler 5 nM Trabectedin ile 48 saat süresince muamele edildi ve ardından 5 mM monodansylcadaverine ile boyanarak floresan mikroskop altında görüntülendi. Görüntüler incelendiğinde kontrol hücrelerinde MDC ile boyanan vakuol gözlenmez iken; Trabectedin ile muamele edilen hücrelerin tamamında MDC pozitif vakuoller belirlendi (Şekil 4.7A). Trabectedin ile indüklenen otofajik etkiyi doğrulamak için LC3-I, LC3-II ve SQSTM1/p62 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Buna göre, kontrol hücrelerine kıyasla, Trabectedin ile muamele edilen hücrelerde LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün arttığı ve SQSTM1/p62 ekspresyonunun azaldığı saptandı (Şekil 7B ve C) ($p < 0.05$).



Şekil 4.7: 5 nM Trabectedin ile 48 saat muamele edilen ve edilmeyen U-87 MG hücre kültürlerinde otofajik vakuollerin görüntülenmesi (A; Büyütme oranı: 20X; Ölçek: 200 μ M) ve LC3-I, LC3-II ve SQSTM1/P62 protein ekspresyon düzeylerinin ölçümü (B ve C).

4.1.3. Trabectedin ile İndüklenen Otofaji P53 Aracılı Olarak Gerçekleşmektedir

Trabectedin ile indüklenen otofajik etkide p53'ün rolünü araştırmak için, U-87 MG hücre kültürleri 30 μ M spesifik p53 inhibitörü varlığında ve yokluğunda 5 nM Trabectedin ile muamele edildi. Kırksekiz saat inkübasyonun ardından hücreler 5 nM monodansylcadaverine ile boyanarak floresan mikroskop altında görüntülendi. Daha sonra, yapılan her uygulama için 4 farklı mikroskop görüş alanındaki hücreler ve hücrelerdeki vakuoller sayılarak görüntüler kantifiye edildi. Buna göre, kontrol hücrelerinde ve yalnızca p53 inhibitörü ile muamele edilen hücrelerde MDC ile boyanan vakuol gözlenmedi (Şekil 8A). Buna karşın, kontrol hücrelerine kıyasla, p53 inhibitörü ile muamele edilen hücrelerin sayısında artış saptandı ($p<0.05$).

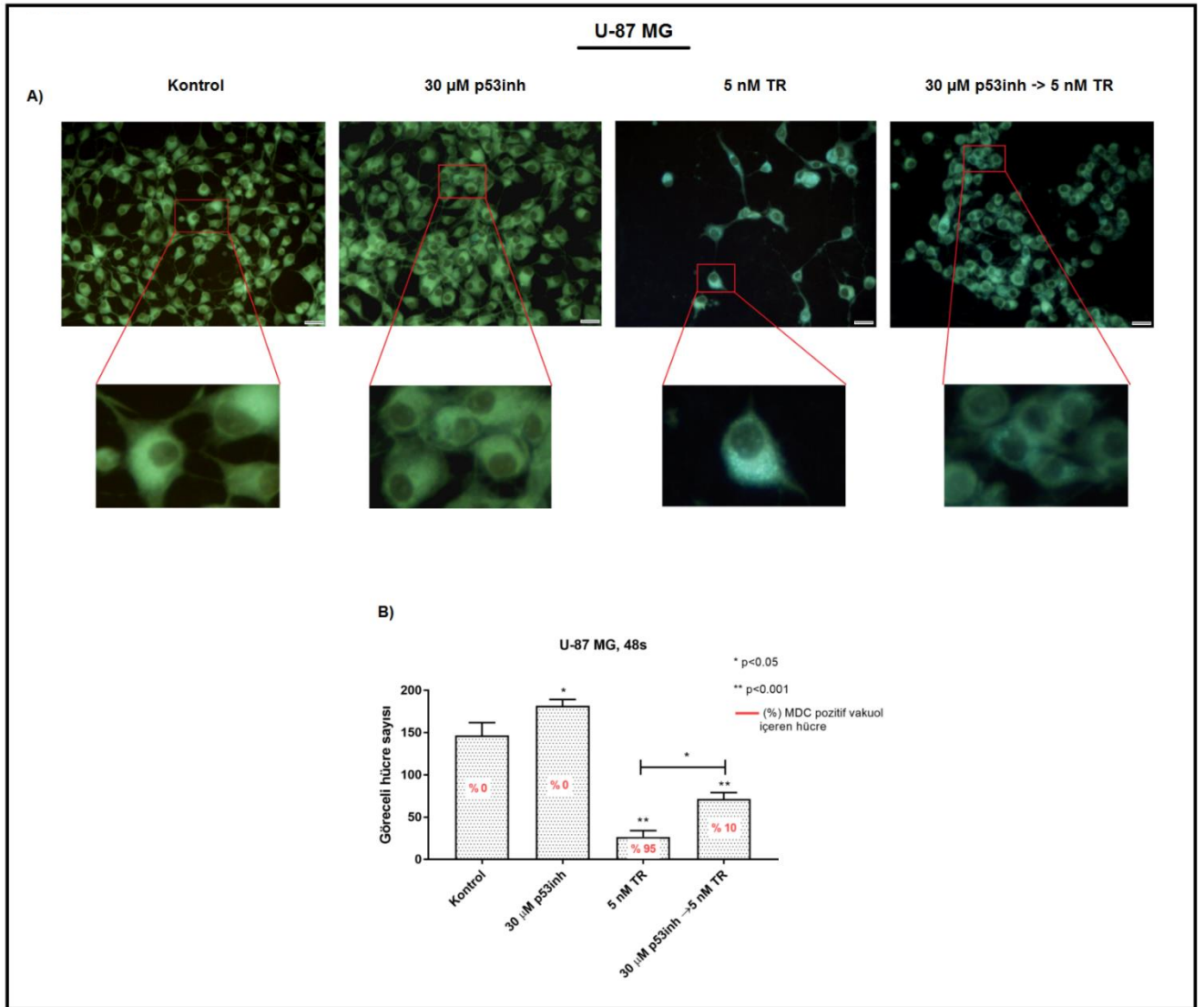
Trabectedin muamele edilmiş hücrelerin %95'inde MDC ile boyanmış vakuoller saptandı (Şekil 4.8A ve B) ($p<0.001$).

p53 inhibitörü varlığında Trabectedin ile muamele edilen hücreler incelendiğinde, vakuol içeren hücre sayısının yalnızca Trabectedin ile muamele edilen hücrelere kıyasla %85 oranında azaldığı, canlı hücre sayısının ise anlamlı oranda arttığı saptandı (Şekil 4.8A ve B) ($p<0.05$).

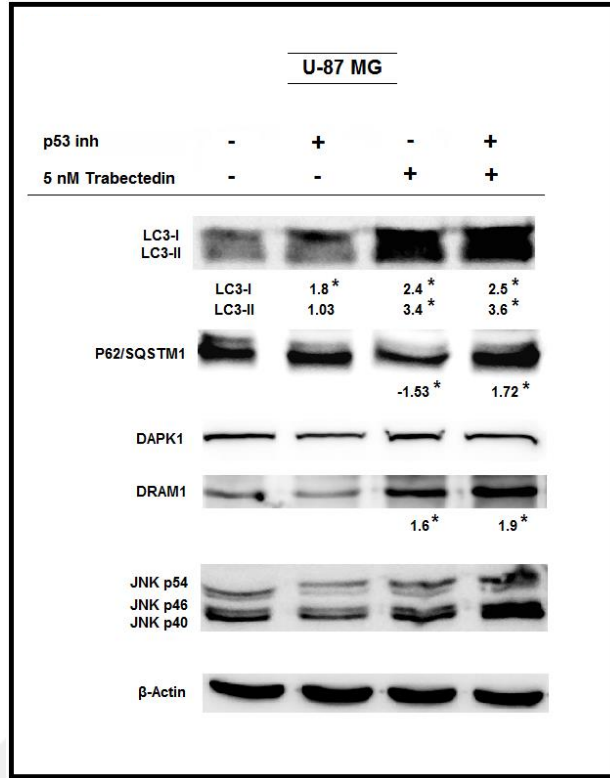
Floresan mikroskop deneylerini doğrulamak için LC3-I, LC3-II, p62/SQSTM1, JNK 1-2-3, DAPK1 ve p53 aracılı otofajinin gerçekleştirilmesinde doğrudan rol oynayan DRAM1 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi. Buna göre, kontrol hücrelerine kıyasla, 5 nM Trabectedin ile muamele edilen hücrelerde LC3-I ve DRAM1 miktarlarının 2.4 ve 1.6 kat arttığı, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün gerçekleştiği, p62/SQSTM1 miktarının 1.53 kat azaldığı ($p<0.05$); JNK 1-2-3 miktarının ise değişmediği belirlendi (Şekil 4.9).

p53 inhibitörü ile muamele edilen hücreler kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, LC3-I miktarının arttığı ancak LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün gerçekleşmediği belirlendi. Buna ek olarak JNK 1-2-3, DRAM1, p62/SQSTM1 ve DAPK1 proteinlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.9).

p53 inhibitörü varlığında 5nM Trabectedin ile muamele edilen hücreler kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında LC3-I ve DRAM1 miktarlarının 2.5 ve 1.9 kat arttığı ($p<0.05$), DAPK1 miktarının değişmediği, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün gerçekleştiği ancak p62/SQSTM1 miktarının 1.73 kat arttığı saptandı (Şekil 4.9) ($p<0.05$).



Şekil 4.8: p53 inhibitörü varlığında ve yokluğunda Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen U-87 MG hücre kültürlerinde otofajik vakuollerin floresan mikroskop ile görüntülenmesi (A; Büyütme oranı: 20X; Ölçek: 200 μ M) ve görüntülerin kantifikasyonu (B).



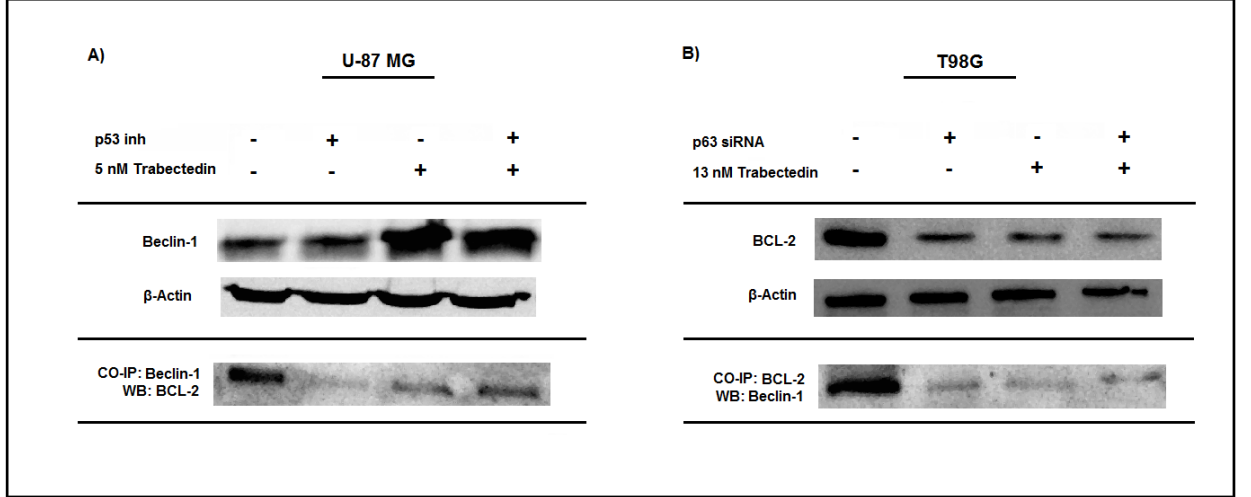
Şekil 4.9: p53 inhibitörü varlığında ve yokluğunda Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen U-87 MG hücre kültürlerinde LC3-I, LC3-II ve SQSTM1/P62, DAPK1, DRAM1 ve JNK 1-2-3 protein ekspresyon düzeylerinin ölçümü ve verilerin kantifikasyonu *p<0.05.

4.1.4. Trabectedin BCL-2/Beclin-1 Heterodimerizasyonunda Ayrılmaya Yol Açarak Etki Göstermektedir

Hem apoptotik hem de otofajik hücre ölümünün gerçekleşmesini engellediği düşünülen BCL-2/Beclin-1 heterodimerizasyonunun Trabectedin etkisiyle ayrılıp ayrılmadığını araştırmak için; inhibitör veya siRNA varlığında ve yokluğunda Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen U-87 MG ve T98G hücre kültürlerine CO-IP ve takiben blot yöntemleri uygulandı.

U-87 MG hücre kültürleri için, kontrol hücrelerinde Beclin-1 sentezi olduğu ve BCL-2 ile Beclin-1'in dimerize formda olduğu saptandı. Buna karşın 5 nM Trabectedin ile muamele edilen hücrelerde hem Beclin-1 miktarının arttığı hem de BCL-2/Beclin-1 hetero-dimerizasyonunun ayrıldığı belirlendi (Şekil 4.10A).

T98G hücre kültürlerinde de benzer bir davranış gözlemlendi. Kontrol hücrelerinde BCL-2'nin sentezlendiği ve BCL-2 ile Beclin-1'in dimerize formda olduğu saptandı. Buna karşın 13 nM Trabectedin ile muamele edilen hücrelerde BCL-2 miktarının azaldığı hem BCL-2 miktarının azaldığı hem de BCL-2/Beclin-1 hetero-dimerizasyonunun ayrıldığı belirlendi (Şekil 4.10B).



Şekil 4.10: U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde p53 inhibitörü veya p63 siRNA'sı varlığında ve yokluğunda Beclin-1/BCL-2 hetero-dimerizasyonunun Trabectedin aracılı olarak ayrılıp ayrılmadığının CO-IP ve western blot yöntemleriyle araştırılması.

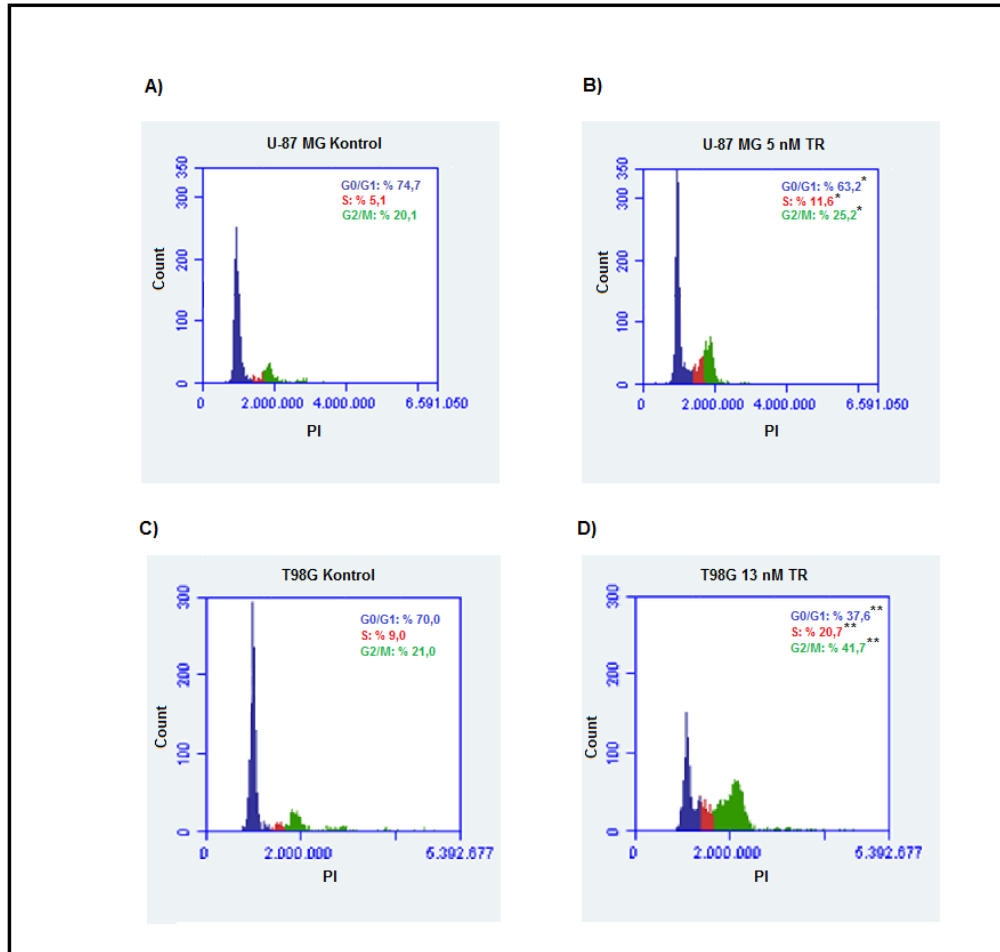
p53 inhibisyonu veya p63 baskılanmasının her iki hücre kültüründe de BCL-2/Beclin-1 hetero-dimerizasyonunda ayrılmaya yol açtığı saptandı. U-87 MG hücre kültürlerinde, yalnızca Trabectedin veya p53 inhibitörü ile muamele edilen hücreler ile karşılaştırıldığında, p53 inhibitörü varlığında Trabectedin ile muamele edilen hücrelerde BCL-2/Beclin-1 dimerizasyonundaki ayrılmanın azaldığı belirlendi. Buna karşın T98G hücre kültürlerinde p63 baskılanması ile Trabectedin etkisi arasında bir etkileşim saptanmadı.

4.1.5. Trabectedin Etkisiyle Hücre Döngüsü S ve G2/M Fazlarında Durmaktadır

U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde Trabectedin aracılı apoptotik ve otofajik etki ile hücre döngüsü arasındaki ilişkinin araştırılması için hücreler propidyum iyodid boyası ile boyandı ve populasyonun dağılımı flow sitometri ile analiz edildi.

U-87 MG hücre kültürlerinde, kontrol hücrelerinde populasyonun %74,4'ü G0/G1, %5,1'i S, %20,1'i ise G2/M fazında iken, Trabectedin ile muamele edilen hücrelerde populasyonun %63,2'si G0/G1, %11,6'sı S ve %25,2'sinin G2/M fazında toplandığı belirlendi ($p<0.05$). Buna göre G0/G1 fazındaki hücrelerin %10'unun Trabectedin etkisiyle duraksadığı ve %5 oranında S ve G2/M fazlarına dağıldıkları saptandı (Şekil 4.11A ve B).

T98G hücre kültürlerinde ise, kontrol hücrelerinde populasyonun %70'i G0/G1, %9'u S, %21'i ise G2/M fazında iken, Trabectedin ile muamele edilen hücrelerde populasyonun %37,6'sı G0/G1, %20'si S ve %41,7'sinin G2/M fazında toplandığı belirlendi ($p<0.01$). Buna göre G0/G1 fazındaki hücrelerin %32,4'ünün Trabectedin etkisiyle duraksadığı ve %11,7 oranında S ve %20,7 oranında G2/M fazlarına dağıldıkları saptandı (Şekil 4.11C ve D).



Şekil 4.11: Trabectedin ile muamele edilen ve edilmeyen U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde propidyum iyodid boyaması ile hücre döngüsü faz dağılımının belirlenmesi * $p<0.05$ ** $p<0.01$.

4.2. TARTIŞMA

Glioblastoma multiforme'nin konumu, kötü prognozu, kısa sağkalım süresi, hızlı bir şekilde nüks etmesi ve radyoterapi/kemoterapiye dirençli olması onu en tahrip edici tümörlerden birisi yapan başlıca özelliklerdir. GBM için günümüzdeki tedavi yaklaşımı cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonlarından oluşmaktadır. Bu tedavi yaklaşımına karşı gelişen cevap genellikle şu şekildedir: GBM'nin difüz ve invazif yapısı, tümörün beyinden cerrahi müdahaleyle tamamen çıkarılma ihtimalini oldukça düşürmektedir. Bu nedenle de hücre proliferasyonunu baskılamak ve apoptozisi tetiklemek üzere, cerrahi müdahalenin ardından sitotoksik kemoterapi (genellikle Temozolomid - TMZ) ve radyoterapi adjuvan tedavi olarak kullanılır. Ancak bu yaklaşım da, tümörün nüks etmesinden (hastaların <%90'ında nüks gözlenir) önce, sağkalımda yalnızca kısa bir süre ilerleme sağlamaktan öteye gidememiştir. Bu tedavi yaklaşımlarının beklenen başarıyı sağlayamamasında çözülmesi gereken en büyük sorunlardan birisi GBM'nin apoptozis aktivasyonunu hedefleyen tedavilere karşı gösterdiği aşırı dirençtir. Gerek radyasyon gerekse kemoterapötik stratejiler, kanser hücrelerini çevre hücrelere zarar vermeden veya en az zarar verecek şekilde öldürmeye dayanmaktadır. Bunun yanı sıra GBM tedavisinde kullanılan diğer tedaviler de tümör büyümesini veya anjiyogenezi baskılamaya yöneliktir. Bu gibi yaklaşımlar ise yalnızca tümörü kontrol etme amaçlı olup kısa süreli sağkalım sağlamaktadır [4, 32]. Apoptozis direnci günümüzde kombinasyon tedavileri ile göreceli olarak çözülmeye çalışılmakta; ancak GBM'de tümör içerisindeki heterojenite farklı mekanizmaları ve çapraz sinyalizasyonu kullanarak bu tedavi stratejilerine çok hızlı bir şekilde cevap ve adaptasyon oluşturarak kısa sürede nüks etmektedir [4, 49]. Bu nedenle farklı hücre ölüm tiplerini veya hücre ölümünde farklı mekanizmaları aktive ederek etki gösteren umut verici kemoterapötiklerin ortaya çıkarılması GBM tedavisi için son derece önemli olup, geliştirilebilecek tedavi stratejilerini arttırmada çok büyük katkı sağlayacaktır.

Kanser tedavisinde klinik aşamada yeni stratejiler geliştirilmesinde en yaygın kullanılan yaklaşımlardan biri endikasyon dışı (off-label) ilaç kullanımıdır. Bu kullanım kısaca, bir hastalığın tedavisi için ilgili kurum tarafından onaylanmış olarak kullanılan bir ilacın, onaylanan kullanım şartlarından farklı olarak uygulanması anlamına gelir. Endikasyon dışı kullanım hastalık, doz, uygulanma şekli ve

uygulanma süresi gibi birçok farklı uygulama şekline olanak sağlar. Kanseri ilaçlarının %50'sinden daha fazlasının endikasyon dışı kullanıldığı belirlenmiştir. Kanserde endikasyon dışı kullanım genellikle bir kanser türü için onaylanmış bir ilacın farklı bir kanser türünde kullanılmasını içerir [50, 51]. Kanserde endikasyon dışı kullanımın yapılabilmesinde önemli bir etken potansiyel kemoterapötiklerin farklı kanser tiplerinde araştırılarak çalışma mekanizmalarının moleküler düzeyde ortaya çıkarılmasıdır. Bunun gerçekleştirilmesi için ise genellikle in vitro kanser hücre kültürleri ve in vivo modeller kullanılır. Bu modellerden üretilen bilginin hızlı, ucuz, kolay tekrarlanabilir ve hızlıca geliştirilebilir oluşu temel bilimler ile klinik arasındaki uzun süreci kemoterapötik onaylandıktan sonra hızlıca kısaltmaktadır. Bu tip araştırmalar “Translasyonel Araştırmalar”ın (Translational Research) en yaygın uygulanan tipidir. Endikasyon dışı kullanımda olumlu sonuç elde edilmesinin ardından potansiyel ilacın yeni hastalık üzerinde kullanılabilmesi normal sürece göre çok daha hızlı gerçekleşebilir.

2011-2013 yılları arasında gerçekleştirilen yüksek lisans tezinde (Tez numarası: 337078) Trabectedin'in insan glioblastoma multiforme hücre kültürlerinde (U-87 MG ve T98G) hücre ölümünü arttırdığı ve DNA tamir mekanizmalarını etkileyerek hücreleri radyasyona uygulamasına karşı duyarlı hale getirdiği belirlenmiştir [47]. İlgili tez çalışmasında Trabectedin'in T98G hücrelerinde apoptozisi indüklediğine dair ön veriler elde edilmiştir. U-87 MG hücre kültürlerinde ise hücrelerin öldüğü ancak bu ölümün apoptozis veya nekroz üzerinden gerçekleşmediği saptanmıştır. Yüksek lisans tezinin sonrasında, bu hücre kültürlerinden sağlam p53 içeren U-87 MG'de Trabectedin aracılı sitotoksik etkide p53'ün doğrudan rol oynadığı; mutant p53 içeren T98G'de ise p53'ün sitotoksik etki üzerine herhangi bir etkisi olmadığı ortaya çıkarılmıştır [48]. Yapılan bu çalışmalarla, Trabectedin'in GBM için kullanılabilecek potansiyel bir tedavi seçeneği olabileceğine dair ön veriler ilk defa literatüre kazandırılmıştır. Yüksek lisans tezinin devamı niteliğinde olan bu tez çalışmasında, Trabectedin'in U-87 MG ve T98G glioblastoma hücre kültürlerinde aktive ettiği hücre ölüm mekanizmaları ayrıntılı olarak aydınlatılmıştır. Ayrıca, p53 ailesi üyeleri ve Bcl-2/Beclin-1 dimerizasyonunun Trabectedin aracılı etkideki rolleri de ortaya çıkarılmıştır. Bu doktora tezi ve daha öncesindeki tamamlanan yüksek lisans tezi, Trabectedin'in en direçli beyin kanseri tipi olan GBM tedavisi için endikasyon dışı kullanımının

stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilecek edebilecek temel bilgileri literatüre kazandırmıştır. Henüz Trabectedin'in GBM için kullanım potansiyelini araştıran herhangi klinik bir çalışma olmamasına karşın, Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (European Organisation for Research and Treatment of Cancer – EORTC), Trabectedin'in bir beyin tümörü tipi olan menenjiyom üzerindeki etkilerinin araştırılacağı bir faz II çalışma başlatmıştır. Nüks eden seviye II/III menenjioma sahip 89 hastanın kullanılması planlanan bu çalışma 2015 yılında başlatılmış olup, ilk sonuçların 2017 yılının temmuz ayında sunulması öngörülmüştür. Avusturya başta olmak üzere Avrupa'daki 37 farklı merkezin dahil olduğu çalışmanın ClinicalTrials.gov numarası NCT02234050'dur [52]. Bu çalışma Trabectedin'in beyin kanserleri üzerinde etkisinin araştırılacağı ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir ve elde edilecek sonuçlar Trabectedin'in GBM'de kullanılma olasılığını etkileyecektir.

Trabectedin, etkisi sarkoma, yumurtalık, meme ve prostat kanserlerinde gösterilmiş; günümüzde sentetik olarak üretilen; FDA, Avrupa Birliği ve 70 ülkede liposarkom ve leiomyosarkom tedavisi için onaylanmış denizel kaynaklı bir kemoterapötiktir. Ayrıca platine dirençli yumurtalık kanseri ve yumuşak doku sarkomları için de klinikte kullanılmaktadır. Meme, prostat, akciğer ve renal kanserlerde klinik faz çalışmaları ise devam etmektedir [53–55]. Trabectedin'in anti-kanser etki mekanizması henüz anlaşılamamıştır ve etkinin birden çok mekanizma ile ortaya çıktığı öne sürülmektedir. Buradan yola çıkarak farklı kanser tiplerinde farklı mekanizmalarla etki gösterebildiği ortaya çıkarılmıştır [33, 46]. Trabectedin'in DNA'ya bağlanıp küçük oluğu büyük oluğa doğru büküldüğü, DNA'yı alkillediği, DNA tamir mekanizmalarıyla etkileştiği, onkojenik transkripsiyon faktörlerini ve çoklu ilaç direnci proteinlerini selektif olarak baskıladığı, kanser mikroçevresiyle etkileştiği, tümör-ilişkili makrofajları baskıladığı, hücre döngüsünü S ve G2/M fazlarında durdurduğu ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir [33, 34, 37, 45, 53, 54, 56]. Tüm bu etkiler içerisinde hücre ölümü ile ilgili yapılan çalışmalar son derece sınırlıdır. Trabectedin'in sarkom, yumurtalık, akciğer, prostat, lösemi ve servikal kanser in vitro ve in vivo modellerinde apoptozisi indüklediği gösterilmişse de [54], yapılan çalışmalar çoğunlukla apoptozisi yüzeysel olarak araştırmıştır. A549, Jurkat, Raji, K562 ve HL-60 hücrelerinde PARP'ın Trabectedin aracılı olarak kesildiği ancak Burkitt CA46 hücre hattında bu etkinin gözlenmediği rapor edilmiştir. 5 ve 10

nM konsantrasyonlar arasında Trabectedin'in A549 hücrelerinde kaspaz 8 ve 9'un kesilerek işlenmesini arttırdığı belirlenmiştir. HL-60 hücrelerinde DNA fragmentasyonunu ve mitokondriyal sitokrom c salınımını arttırdığı; JNK ve kaspaz -3'de aktive ettiği belirlenmiştir [54]. Ordonez ve ark., Ewing Sarkoma hücre kültürlerinde ve hastalarda oluşturulan ksenograftlarda, PARP inhibitörü olaparib'in hücreleri Trabectedin etkisine karşı duyarlı hale getirdiğini göstermiştir [56]. Hoda ve ark., ise Trabectedin'in malign peural mezoteliyoma hücre kültürleri ve ksenograftlarında apoptozisi indüklediğini TUNEL, Hoechst ve PI boyamalarıyla göstermiştir. Ardından Trabectedin'in 5 nM konsantrasyonda p53 ekspresyonunu arttırdığı, Bcl-xL ekspresyonunu azalttığı ve PARP'ın kesildiği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada Bcl-2 inhibisyonunun hücreleri Trabectedin'e karşı hassaslaştırdığı tespit edilmiştir [53]. Açıkgöz ve ark., Trabectedin'in prostat kanseri hücre hatları PC-3 ve DU-145'te, ayrıca bu hücre hatlarından elde edilen kök hücrelerde kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9 ve p53 ekspresyonunu arttırarak; buna karşın Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak apoptozisi indüklediğini göstermiştir. Trabectedin'in apoptotik etki mekanizmalarını ortaya koyan en ayrıntılı çalışma grubumuz tarafından yapılmıştır [57]. Yapılan çalışmada meme kanserinin iki farklı genotipini modelleyen MCF-7 (HER2-/ER+) ve MDA-MB-453 (HER2+/ER-) hücre kültürlerinde Trabectedin'in apoptozisin farklı sinyalizasyon mekanizmalarını indükleyerek hücreleri öldürdüğü ortaya çıkarılmıştır. İlginç olarak, Trabectedin etkisiyle MCF-7 hücrelerinde Fas, TRAIL, TNF, FADD protein ekspresyonlarının arttığı ve bu sayede dış apoptotik yolağın aktive olduğu saptanmıştır. Bu bulgular apoptozisin dış yolağıyla ilişkili kaspaz 8, hücrelerde baskılanarak yapılan deneylerle doğrulanmıştır. MDA-MB-453 hücrelerinde ise Trabectedin'in Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyonunu baskıladığı; Bad, Bax, Smac/DIABLO, kesilmiş kaspaz-3 ve sitokrom c sentezini arttırdığı, bu sayede iç apoptotik yolağı aktive ettiği belirlenmiştir. İç apoptotik yolak aktivasyonu da kaspaz 9 baskılanarak yapılan deneylerle doğrulanmıştır. Bunun yanı sıra Trabectedin'in her iki hücre kültüründe de cIAP, XIAP ve survivin gibi anti-apoptotik proteinleri baskıladığı; buna karşın HSP27, HSP60 ve p53 gibi pro-apoptotik proteinleri de attırdığı ortaya çıkarılmıştır [57]. Bu tez çalışmasında T98G hücrelerinde Trabectedin etkisiyle indüklenen apoptotik süreç; konsantrasyona ve zamana bağlı histon-ilişkili DNA fragmentasyonu ve kaspaz 3/7 aktivitesi ölçümü, muklear morfoloji ve mitokondriyal membran poransiyeli ölçümü, 7-AAD ve Annexin V boyamalarının flow sitometrik analizi, iç

ve dış yolakta rol oynayan pro- ve anti- apoptotik proteinlerin ekspresyon düzeyinin ölçümü, iç ve dış yolağın spesifik inhibitörlerle baskılanıp apoptozisin doğrulanmasını içeren yöntemler ile oldukça ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır. Uygulanan yöntemler sonucunda iç ve dış yolağı başlatıcı kaspazlar; MOMP, sitokrom c salınımı ve apoptozom oluşumu; kaspazların aktivasyonu; DNA fragmentasyonu; nuklear ve morfolojik değişimler ölçülerek apoptozis sürecinin tüm aşamaları ayrıntılarıyla ortaya çıkarılmıştır. Buna göre, Trabectedin'in histon ilişkili DNA fragmentasyonunu ve kaspaz 3/7 aktivitesinin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak arttırdığı geniş (10^{-11} - 10^{-7} M) ve dar (1-30 nM) aralıkta yapılan uygulamalarla gösterildi. Bu deneyler sonucunda 13 nM Trabectedin ile 48 saat uygulamanın apoptozis araştırmaları için optimum konsantrasyon ve süre olduğu belirlendi. Kullanılan konsantrasyon ve muamele süresi literatürdeki çalışmalarla uyumlu olup klinikte hastalara uygulanan dozlarla örtüşmektedir [33, 47, 56, 57]. İkinci basamak olarak, Hoechst boyamalarının analizi yapılarak Trabectedin'in T98G hücrelerinde kromatin kodansesyonunu arttırdığı ve fragmente olmuş bir nuklear morfoloji oluşumuna neden olduğu saptandı. Bunun yanı sıra mitokondri zar potansiyelinin Trabectedin aracılı olarak bozulduğu TMRE görüntüleri analiz edilerek gösterildi. Floresan mikroskop görüntülerinin analizi sırasında, Hoechst ve TMRE boyamalarına ait görüntülerde aynı görüş alanları üst üste getirilerek hücrelerdeki nuklear morfoloji ve mitokondriyal membran potansiyeli "tek hücre seviyesinde (single cell)" analiz edildi. Buna göre, fragmente olmuş nuklear morfolojiye sahip hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelini tamamıyla veya göreceli olarak kaybettiği saptandı. Bu sayede T98G hücrelerinde Trabectedin ile aktive olan apoptozis kalitatif bir yöntemle de doğrulanmış oldu. Hoechst/TMRE boyamalarında bazı hücrelerde DNA fragmentasyonu gözlenirken, bazılarında mitokondriyal membran potansiyelinin bozulduğu, ancak fragmentasyonun gerçekleşmediği belirlendi. Bu durum hücrelerde sitokrom c salınımının gerçekleştiği ancak apoptozisin henüz sonuçlanmadığı anlamına gelmektedir. Erken ve geç apoptotik hücrelerin miktarını ortaya çıkarabilmek için T98G hücreleri Trabectedin ile muamele edildi ve ardından 7-AAD/Annexin V ikili boyamasının flow sitometrik analizi yapıldı. Buna göre, 48 saat sonunda hücrelerin %23'ünün erken %53'ünün ise geç apoptoziste olduğu saptandı. Bu bulguların Hoechst/TMRE boyamalarıyla uyumlu olduğu gözlemlendi.

Apoptozis'in Trabectedin ile aktive olduğu gösterildikten sonra, bu aktivasyonun iç ve/veya dış yolak aracılı olarak gerçekleşip gerçekleşmediği araştırıldı. İç yolak aktivasyonunun araştırılması için, MOMP sonrası apoptozom yapısına katılarak kaspaz 3 ve 7 aktivasyonunu sağlayan kaspaz 9, spesifik inhibitörü olan Z-LEHD-FMK ile baskılanarak Trabectedin ile indüklenen histon-ilişkili DNA fragmentasyonu ölçüldü. Kaspaz 9 aktivitesi baskılanan hücrelerde Trabectedin ile indüklenen histon-ilişkili DNA fragmentasyonunun azaldığı belirlendi. İnhibitör kullanarak yapılan deneylerde gerçekleşen durum şu şekilde açıklanabilir: Eğer ki Trabectedin T98G hücrelerinde kaspaz 9'u aktive ederek apoptozisin indüklenmesini sağlıyorsa, hücrelerde kaspaz 9 baskılandığında apoptotik aktivitenin ortadan kalkması veya düşmesi beklenir. T98G hücrelerinde kaspaz 9 inhibitörü varlığında Trabectedin'in apoptotik etkisinin %44.5 azaldığı belirlendi. Buna göre Trabectedin'in doğrudan veya dolaylı olarak apoptozisin iç yolağının aktive ettiği yorumu yapıldı. İnhibitör kullanılarak yapılan deneyler her ne kadar bilgi verici olsa da, bu deneylerin bağımsız bir yöntemle doğrulanması önemlidir. İç yolak aktivasyonunun doğrulanması mitokondriyal pro- ve anti- apoptotik protein ekspresyonlarının ölçümü ile gerçekleştirildi. Buna göre Trabectedin'in Bad, Bax ve Smac/Diablo gibi pro-apoptotik proteinlerin sentezini arttırırken; cIAP ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin sentezini azalttığı belirlendi. Buna ek olarak kaspaz 9'un da Trabectedin etkisiyle kesilerek aktif forma geçtiği ortaya çıkarıldı. Dış apoptotik yolak aktivasyonunun araştırılmasında da benzer bir yaklaşım izlendi. Bunun için, dış yolağın aktivasyonunda yol oynayan kaspaz olan kaspaz 8 spesifik inhibitörle (Z-IETD-FMK) baskılandı. İç yolak aktivasyonu ile benzer şekilde, kaspaz 8 aktivitesi baskılanan hücrelerde Trabectedin ile indüklenen histon-ilişkili DNA fragmentasyonunun azaldığı belirlendi. Buna göre, dış apoptotik yolağın da Trabectedin ile aktive edildiği yorumu yapıldı. İnhibitör deneylerini doğrulamak için ise FADD, Bid, pro- ve aktif kaspaz 8 proteinlerinin miktarı ölçüldü. Trabectedin etkisiyle FADD ekspresyonunun arttığı ve Bid ekspresyonunun azaldığı belirlendi. Buna ek olarak kaspaz 8'in de kesilerek aktif forma dönüştüğü saptandı. İç ve dış apoptotik yolak sinyalizasyonunu birbirine bağlayan Bid'in azalması, onun kesildiği anlamına gelebilir. Bid, kesimi sonrası mitokondriye lokalize olarak iç apoptotik yolağı aktive etmiş ve bu sayede pozitif bir döngü oluşturup apoptotik etkinin artmasını sağlamış olabilir [20, 57, 58]. Bu durum Trabectedin'in T98G hücrelerinde güçlü bir şekilde apoptozisi indüklediğini de açıklar niteliktedir.

Trabectedin'in DNA'yla hem yapısal hem fonksiyonel ilişki göstermesi ve transkripsiyonu etkilemesi gibi özellikleri nedeniyle birçok kanser modelinde p53 aracılı olarak apoptozisi indüklediği bildirilmiştir [33, 46, 47, 59, 60]. Ancak T98G hücreleri p53 mutasyonu taşımaktadır (237, Met -> Ile) ve Trabectedin'in bu hücrelerde p53 üzerinden etki göstermediği grubumuz tarafından yapılan çalışmada belirlenmiştir [48]. Watanabe ve ark., tarafından hücre kültürleri ve hastalarda yapılan çalışmada, p53 varlığında, diğer p53 ailesi üyelerinin promotör metilasyonuna uğrayarak sentezlerinin azaltıldığı (kısmen metilasyon) veya durdurulduğu (hiper metilasyon) gösterilmiştir [61]. Aynı grup, U-87 MG hücre kültürlerinde p73 promotörünün tamamen metile durumda olduğunu, T98G hücre kültürlerinde ise p73 promotörünün kısmen metile olduğunu ortaya koymuştur [61]. p53, p63 ve p73 %60'ın üzerinde yapısal benzerlik taşımakta ve birbirlerinin rollerinin üstlenebilmektedir [26]. Bu tez çalışmasında, T98G hücrelerinde p53 mutant ve p73 de metile olduğundan p63'ün Trabectedin aracılı etkide rol oynayıp oynamadığı araştırıldı. İlk olarak T98G hücreleri Trabectedin ile muamele edildi ve p53 ailesi üyelerindeki değişim protein düzeyinde ölçüldü. Buna göre p53 ekspresyonunun değişmediği, p63'ün arttığı ve p73'ün ise azaldığı belirlendi. Ardından p63 sentezi siRNA ile spesifik ve kalıcı olarak engellendi. p63 sentezi engellenen hücreler tekrar Trabectedin ile muamele edilerek inhibisyonun kalıcı olduğunun doğrulanmasının ardından apoptozis üzerindeki etkinin araştırıldı. Trabectedin ile indüklenen apoptozisin p63 aracılı olarak gerçekleşip gerçekleşmediği 7-AAD/Annexin V boyamasının flow sitometrik analizi ve histon-ilişkili DNA fragmentasyonu ölçümleriyle gösterildi. Bu deneylerde de teorik olarak yukarıda anlatılan inhibitör deneylerine benzer bir yaklaşım izlendi. Hücrelerde p63 sentezi engellendiğinde, Trabectedin aracılı histon-ilişkili DNA fragmentasyonunun % 47.5; 7-AAD ve Annexin V ile boyanan hücrelerin ise % 56.3 azaldığı belirlendi. Bu bulgularla Trabectedin ile indüklenen apoptozisin p63 üzerinden gerçekleştiği gösterilmiş oldu.

GBM'de otofajinin hem hücre ölümüne hem de sağkalımına yardımcı olabilecek şekilde düzenlenebildiği bilinmektedir [3, 62]. GBM hücrelerinin kemoterapötiklere karşı cevapta otofajiyi çoğunlukla bir adaptasyon mekanizması gibi kullanarak hücreleri apoptozise karşı koruduğu gösterilmiştir [3, 62, 63].

Özellikle DNA hasarı oluşturan ajanlarla muamele sonrasında bu adaptif mekanizmanın aktive olması dikkat çekicidir. Harhaji-Trajkovic ve ark., Cisplatin uygulanan U-251 hücre kültürlerinin otofayı aktive ettiğini, bu sayede Bax/Bcl-2 oranını düşürdüğünü ve AMPK/mTOR sinyalizasyonu ile hücreleri apoptoza karşı dirençli hale getirdiğini göstermiştir [64]. GBM tedavisinde standart tedavi olarak kullanılan Temozolomid etkisinde U-87 MG, LN229, U-251 ve U-118'i de içeren birçok glioblastoma hücre kültüründe benzer bir mekanizmayla apoptotik aktivasyona karşı direnç oluşturduğu ve TMZ' tedavisinden yanıt alınabilmesi için bu otofajik aktivasyonun baskılanması gerektiği belirtilmiştir [63]. Elodie ve ark., bir mTOR inhibitörü olan RAD001'in U-87 MG hücre kültürlerinde Temozolomid ile indüklenen otofajiyi artırarak hücre ölümüne yardımcı olduğunu göstermiştir [65]. Günümüzde Temozolomid etkisinin otofaji inhibitörleri ile artırılmasının amaçlandığı faz 1 ve 2 çalışmalar devam etmektedir [63]. Yüksek lisans döneminde U-87 MG hücre kültürlerinde Trabectedin ile indüklenen hücre ölüm mekanizması belirlenememiş, ancak bu mekanizmanın apoptozis veya nekroz olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle doktora döneminde Trabectedin'in U-87 MG hücre kültürlerinde otofajiyi aktive edip etmediği, otofaji araştırmalarında kullanılan en yaygın belirteçler olan Beclin-1, LC3-I, LC3-II ve SQSTM1/P62 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ölçülerek araştırıldı ve veriler Image J yazılımı kullanılarak kantifiye edildi. Bunun yanı sıra, otofajik vakuoller spesifik olarak boyayan otofloresan bir boya olan monodansilkadaverin (monodansylcadaverine - MDC) kullanılarak yüksek çözünürlüklü kalitatif floresan görüntülerle otofajik aktivite doğrulandı. Buna göre, kontrol hücrelerinde MDC boyalı vakuol oluşmazken, Trabectedin ile muamele edilen hücrelerde MDC pozitif otofajik vakuollerin olduğu, LC3-I'nin LC3-II'ye dönüştüğü (bu dönüşüm yalnızca otofagozomlarda gerçekleşir ve LC3-II membran yıkılana kadar stabil kalır) ve SQSTM1/P62 ekspresyonunun azaldığı saptandı. Bu bulgular, Trabectedin ile muamele edilen U-87 MG hücre kültürlerinde otofajik hücre ölümünün gerçekleştiğini göstermektedir. U-87 MG hücre kültürlerinde, otofajinin bir hayatta kalma mekanizması olarak kullanıldığı Temozolomid etkisine kıyasla; Trabectedin etkisinde otofaji bir hücre ölüm mekanizması olarak aktive olmuştur.

Yüksek lisans tezinden sonraki dönemde yapılan çalışmalarla Trabectedin etkisiyle oluşan sitotoksik etkinin p53 aracılı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir [48].

Bu tez çalışmasında Trabectedin'in otofajiyi indüklediği gösterildikten sonra, bu etkinin p53 aracılı olarak gerçekleşip gerçekleşmediği araştırıldı. Bunun için U-87 MG hücreleri spesifik farmakolojik p53 inhibitörü olan Pifithrin- α ile ön-muamele edildi ve ardından Trabectedin uygulanarak otofajik belirteçler ölçüldü. Buna göre, p53 baskılandığında Trabectedin'in etkisiyle oluşan otofajik vakuol sayısının azaldığı ve ayrıca vakuol içermeyen hücre sayısının arttığı saptandı. Ardından Trabectedin etkisiyle p53 aracılı olarak gerçekleşen otofajik aktiviteyi doğrulamak amacıyla, p53 inhibitörü varlığında ve yokluğunda DRAM1, DAPK1, JNK 1-2-3 gibi p53 aracılı otofajik etkide rol oynadığı bilinen proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Bu proteinlerin arasında p53 ile ilişkili olarak DRAM1'in Trabectedin etkisiyle arttığı belirlenirken, DAPK1 ve JNK 1-2-3'de ise değişim saptanmadı. Bunun yanı sıra Trabectedin etkisiyle p62'nin azaldığı ve LC3-I'in LC3-II'ye dönüştüğü saptandı. İlginç olarak, Trabectedin etkisiyle LC3 ve DRAM1'de oluşan bu değişikliklerin p53 inhibisyonu ile değişmediği saptanırken; p62 ekspresyonundaki azalmanın p53 inhibisyonu ile normal seviyesine geri döndüğü ve hücrelerin otofajik ölümden kurtulduğu belirlendi. p62'nin otofaji ile ilişkisi hala net olarak anlaşılamamış olsa da, otofaji aktive olduğunda p62'nin selektif olarak baskılandığı, otofaji baskılandığında arttığı ve otofaji sırasında mTOR'u aktive ettiği bilinmektedir [66, 67]. p62 artışı sonucunda otofajik vakuollerin yıkıma uğrayamadığı gösterilmiştir [67]. Deneylerden elde edilen sonuçlar da bu bilgilerle uyumaktadır. p62'deki azalma, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü ve floresan mikroskop görüntüleri Trabectedin etkisiyle otofajik vakuollerin oluştuğunu göstermektedir. Buna karşın yalnızca p53 inhibitörü ile muamele edilen hücrelerde p62 ekspresyonu değişmemekte, LC3 dönüşümü gerçekleşmemekte ve floresan mikroskopta vakuol oluşumu gözlenmemektedir. p53 baskılanan hücrelere Trabectedin uygulandığında ise LC3 dönüşümü ve floresan mikroskop görüntülerinden otofajik vakuollerin az sayıda oluşabildiği ancak otofagozomlar yıkılamadığından otofajik hücre ölümünün gerçekleşmediği anlaşılmaktadır. DRAM1 ekspresyonunun p53 baskılandığında azalması, Trabectedin uygulandığında ise artması da olayın p53 aracılı olarak gerçekleştiğini doğrular niteliktedir.

Trabectedin etkisiyle hem apoptozis hem de otofajinin aktive olabilmesi ve bu olayların p53 ailesi aracılı olarak gerçekleşmesi her iki aktivasyon için de ortak bir apoptozis-otofaji etkileşiminin olup olmayacağı sorusunu ortaya çıkarmıştır.

Literatürde apoptozis ve otofaji arasındaki etkileşimler henüz aydınlatılamamıştır. Buna karşın, en iyi tanımlanmış etkileşim Bcl-2/Beclin-1 dimerizasyonudur [27, 29–31]. Ayrıca, p53'ün bu dimerizasyon üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, Tripathi ve ark., p53'ün Beclin-1 ile bağlanabildiğini ve Cisplatin'in bu bağlanmayı ortadan kaldırarak etki gösterdiğini belirlemiştir [68]. Diğer çalışmalar da p53'ün Bcl-2 ile bağlanarak hücre ölümünü aktive edebildiğini ortaya çıkarılmıştır [5, 31]. Trabectedin, p53 ve p63'ün Bcl-2/Beclin-1 dimerizasyonu üzerindeki etkisi bu tez çalışmasında CO-IP yöntemi ile araştırılmıştır. Kısaca, U-87 MG hücrelerinde Beclin-1 ve ona bağlı tüm proteinler çöktürüldü ve ardından bu örneklerde Bcl-2'ye karşı antikorla western blot yöntemi kullanılarak protein ekspresyonu ölçüldü. T98G hücrelerinde de bu işlemin tersi uygulanıp Bcl-2 ve bağlı olduğu proteinler çöktürülüp, ardından bu örneklerde Beclin-1'e karşı antikorla western blot yöntemi uygulanarak protein ekspresyonu ölçüldü. Buna göre, her iki hücre kültüründe de, kontrol hücrelerinde Bcl-2 ile Beclin-1'in dimerize formda bulunduğu ve bu dimerizasyonun Trabectedin etkisiyle ayrıldığı saptandı. İlginç olarak, hem p53 hem de p63 baskılandığında Bcl-2/Beclin-1 dimerizasyonunun ayrıldığı gözlemlendi. Bu nedenle Trabectedin muamelesiyle Bcl-2/Beclin-1 dimerizasyonunda gerçekleşen ayrılmanın p53 veya p63 aracılı olup olmadığı ortaya çıkarılamasa da; bu ayrılmanın apoptozis ve otofajide gerçekleşebildiği gösterildi.

Trabectedin ile indüklenen apoptozis ve otofaji aydınlatıldıktan sonra, hücre döngüsünün duraksayıp duraksamadığı araştırıldı. Trabectedin'in hücre döngüsünü erken S ve geç G2/M fazlarında duraksattığı birçok hücre kültüründe gösterilmiştir [53, 55, 59, 60, 69]. Hücre döngüsünde S fazı DNA hasarının replikasyon sırasında kontrol edildiği ve replikasyon başlama noktasının buna göre düzenlendiği evre iken [70]; G2/M fazı, DNA hasarına karşı son kontrolün yapıldığı ve Cdk1/Siklin B1 kompleksi ile G2'den M fazına geçişin düzenlendiği evredir [71]. GBM hücre kültürlerinde de Trabectedin aracılı gözlenen bu etki propidyum iyodid boyamasının flow sitometride analiziyle ortaya çıkarıldı. Buna göre, Trabectedin'in hem U-87 MG hem de T98G hücre kültürlerinde S ve G2/M fazlarında hücre döngüsünü duraksattığı belirlendi. Her iki hücre kültüründe de G2/M fazında duraksayan hücre sayısı S fazındakilere göre daha fazla iken; iki hücre hattı karşılaştırıldığında, T98G'de hücre döngüsünde duraksayan hücrelerin daha fazla olduğu saptandı.

Trabectedin etkisiyle p63 aracılı olarak aktive olan apoptozisle öldüğü saptanan bu hücrelerin hücre döngüsünde de duraksama yaşaması, Napoli ve Flores'in belirttiği gibi [26], p63'ün p53 gibi etki gösterip hücre döngüsünü ve takiben apoptozisi aktive etmiş olabileceğini belirtmektedir. Hücre döngüsü ve otofaji arasındaki ilişki incelendiğinde, G2/M fazındaki duraksama ile otofaji aktivasyonu arasında bağlantı olduğu anlaşılmaktadır [71–73]. Ancak bu ilişkinin mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasında da benzer ilişki gözlenmiştir. Trabectedin U-87 MG hücre kültürlerinde S ve G2/M fazlarında duraksamaya neden olmuş ve otofaji indüklenmiştir. Ayrıca Trabectedin aracılı etkinin p53 üzerinden gerçekleştiği saptanmıştır. Buna göre, hücre döngüsü Trabectedin etkisiyle p53 aracılı olarak duraksamış ve ardından otofajik hücre ölümü gerçekleşmiş olabilir. Otofaji ile hücre döngüsü arasındaki bağlantının araştırılacağı daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışması sonucunda Trabectedin'in insan glioblastoma hücre kültürleri üzerindeki apoptotik ve otofajik etki mekanizmaları detaylı olarak ortaya çıkarılmıştır. Buna göre,

- ❖ Trabectedin'in T98G hücre kültürlerinde hem iç hem de dış apoptotik yolağı aktive ederek hücre ölümüne yol açtığı,
- ❖ Trabectedin ile indüklenen apoptozisin p63 aracılı olarak gerçekleştiği,
- ❖ Trabectedin'in U-87 MG hücre kültürlerinde otofajiyi aktive ederek hücreleri öldürdüğü,
- ❖ Trabectedin aracılı otofajik etkinin p53 aracılı olarak gerçekleştiği,
- ❖ Apoptozis ve otofaji arasında önemli etkileşimlerden biri olan Bcl-2/Beclin1 dimerizasyonunun Trabectedin aracılı olarak ayrıldığı,
- ❖ Trabectedin'in her iki hücre kültüründe de hücre döngüsünün S ve G2/M fazlarında duraksamaya yol açtığı belirlenmiştir.

Bu bulguların yanı sıra doktora süreci içerisinde, Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direnci konusunda bir adet ulusal derleme makale [32], Trabectedin'in farklı kanser tipleri üzerindeki etkileriyle ilgili bir adet uluslararası kitap bölümü [54], 1 adet ulusal (XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi) ve 2 adet uluslararası (5th EMBO meeting ve 15th International Congress on Targeted Anticancer Therapies) bildiri literatüre kazandırılmıştır. Sonuç olarak, bu tez çalışmasında Trabectedin'in GBM tedavisinde kullanılabilecek umut vadeci bir kemoterapötik olabileceğini belirten preliminere veriler sunulmuştur. GBM'de tedaviyi sınırlandıran önemli bir faktör olan tümör heterojenitesinin, farklı tip GBM hücrelerinde hem apoptotik hem de otofajik hücre ölümünü tetikleyebildiği gösterilen Trabectedin ile yenilebileceğini araştırarak *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Hanahan, D., Weinberg, R. A., Adams, J. M., Cory, S., Aguirre-Ghiso, J. A., Ahmed, Z., Bicknell, R., Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Amaravadi, R. K., Thompson, C. B., Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M. et al. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- [2] Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavennee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., Ellison, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 2016, 131(6), 803–820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
- [3] Jawhari, S., Ratinaud, M.-H., Verdier, M. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone “ménage-à-trois.” *Cell Death and Disease* 2016, 7(10), e2434. doi:10.1038/cddis.2016.318
- [4] Wojton, J., Meisen, W. H., Kaur, B. How to train glioma cells to die: molecular challenges in cell death. *Journal of Neuro-Oncology* 2016, 126(3), 377–384. doi:10.1007/s11060-015-1980-1
- [5] Pietsch, E. C., Sykes, S. M., McMahon, S. B., Murphy, M. E. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008, 27(50), 6507–6521. doi:10.1038/onc.2008.315
- [6] Stindt, M. H., Muller, P. A. J., Ludwig, R. L., Kehrloesser, S., Dötsch, V., Vousden, K. H. Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. *Oncogene* 2015, 34(33), 4300–10. doi:10.1038/onc.2014.359
- [7] Nagpal, J., Jamoona, A., Gulati, N. D., Mohan, A., Braun, A., Murali, R., Jhanwar-Uniyal, M. Revisiting the role of p53 in primary and secondary glioblastomas. *Anticancer Research* 2006, 26(6 C), 4633–4639.
- [8] Yamaki, T., Suenaga, Y., Iuchi, T., Alagu, J., Takatori, A., Itami, M., Araki, A., Ohira, M., Inoue, M., Kageyama, H., Yokoi, S., Saeki, N., Nakagawara, A. Temozolomide suppresses MYC via activation of TAp63 to inhibit progression of human glioblastoma. *Scientific reports* 2013, 3, 1160. doi:10.1038/srep01160
- [9] Landré, V., Antonov, A., Knight, R., Melino, G. p73 promotes glioblastoma cell invasion by directly activating POSTN (periostin) expression. *Oncotarget* 2016, 7(11), 1–18. doi:10.18632/oncotarget.7600
- [10] Giono, L. E., Manfredi, J. J. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *Journal of Cellular Physiology* 2006, 209(1), 13–20. doi:10.1002/jcp.20689
- [11] Taylor, W. R., Stark, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001, 20(15), 1803–1815. doi:10.1038/sj.onc.1204252
- [12] Allocati, N., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. P63/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Experimental Cell Research* 2012, 318(11), 1285–1290. doi:10.1016/j.yexcr.2012.01.023
- [13] Feoktistova, M., Leverkus, M. Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS Journal* 2015, 282(1), 19–31. doi:10.1111/febs.13120
- [14] Yaron, F., Hermann, S. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. 2016, 116(8), 1477–1490. doi:10.1161/circresaha.116.303790
- [15] Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications In Tissue Kinetics. *Journal of*

- Internal Medicine 1972, 258(6), 479–517. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x
- [16] Fuchs, Y., Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 2011, 147(4), 742–758. doi:10.1016/j.cell.2011.10.033
 - [17] Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2008, 9(3), 231–241. doi:10.1038/nrm2312
 - [18] Tsujimoto, Y., Shimizu, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death & Differentiation* 2005, 12 Suppl 2, 1528–1534. doi:10.1038/sj.cdd.4401777
 - [19] Salvesen, G. S., Duckett, C. S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2002, 3(6), 401–10. doi:10.1038/nrm830
 - [20] Fulda, S., Debatin, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006, 25, 4798–4811. doi:10.1038/sj.onc.1209608
 - [21] Tsuchiya, Y., Nakabayashi, O., Nakano, H. FLIP the switch: Regulation of apoptosis and necroptosis by cFLIP. *International Journal of Molecular Sciences* 2015, 16(12), 30321–30341. doi:10.3390/ijms161226232
 - [22] Manuscript, A. Eaten alive : a history of macroautophagy. 2013, 12(9), 814–822. doi:10.1038/ncb0910-814.Eaten
 - [23] Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S. A., Kroemer, G. Autophagy regulation by p53. *Current Opinion in Cell Biology* 2010, 22(2), 181–185. doi:10.1016/j.ceb.2009.12.001
 - [24] Levine, B., Abrams, J. NIH Public Access. 2009, 10(6), 637–639. doi:10.1038/ncb0608-637.p53
 - [25] Ryan, K. M. P53 and autophagy in cancer: Guardian of the genome meets guardian of the proteome. *European Journal of Cancer* 2011, 47(1), 44–50. doi:10.1016/j.ejca.2010.10.020
 - [26] Napoli, M., Flores, E. R. The family that eats together stays together: New p53 family transcriptional targets in autophagy. *Genes and Development* 2013, 27(9), 971–974. doi:10.1101/gad.219147.113
 - [27] Li, M., Gao, P., Zhang, J. Crosstalk between autophagy and apoptosis: Potential and emerging therapeutic targets for cardiac diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, 17(3), 1–19. doi:10.3390/ijms17030332
 - [28] Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., Kroemer, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, 15(2), 81–94. doi:10.1038/nrm3735
 - [29] Su, M., Mei, Y., Sinha, S. Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. *Journal of Oncology* 2013,. doi:10.1155/2013/102735
 - [30] Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation* 2011, 18(4), 571–80. doi:10.1038/cdd.2010.191
 - [31] Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2007, 8(9), 741–752. doi:10.1038/nrm2239
 - [32] Bozkurt, E., Atmaca, H., Uzunoğlu, S. Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direnci. 2013, 133–143.
 - [33] D'Incalci, M., Galmarini, C. M. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Molecular cancer therapeutics* 2010, 9(8), 2157–2163.

doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0263

- [34] Cuevas, C., Francesch, A. Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Natural Product Reports* 2009, (26), 322–33. doi:10.1039/b808331m
- [35] Gago, F., Hurley, D. L. H. Devising a Structural Basis for the Potent Cytotoxic Effects of Ecteinascidin 743. In *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complexes 2004*, (Vol. 2, pp. 643–675). doi:10.1002/3527601783.ch23
- [36] Erba, E., Bergamaschi, D., Bassano, L., Damia, G., Ronzoni, S., Faircloth, G. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *European Journal of Cancer* 2001, 37, 97–105. doi:10.1016/S0959-8049(00)00357-9
- [37] Takebayashi, Y., Pourquier, P., Zimonjic, D. B., Nakayama, K., Emmert, S., Ueda, T., Urasaki, Y., Kanzaki, a, Akiyama, S. I., Popescu, N., Kraemer, K. H., Pommier, Y. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature medicine* 2001, 7, 961–966. doi:10.1038/91008
- [38] Bonfanti, M., La Valle, E., Fernandez Sousa Faro, J. M., Faircloth, G., Caretti, G., Mantovani, R., D’Incalci, M. Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and DNA. *Anticancer Drug Des* 1999, 14(3), 179–186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500494>
- [39] Minuzzo, M., Marchini, S., Broggin, M., Faircloth, G., D’Incalci, M., Mantovani, R. Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97(12), 6780–6784. doi:10.1073/pnas.97.12.6780
- [40] Jin, S., Gorfajn, B., Faircloth, G., Scotto, K. W. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97(12), 6775–6779. doi:10.1073/pnas.97.12.6775
- [41] Friedman, H. S., McLendon, R. E., Kerby, T., Dugan, M., Bigner, S. H., Henry, A. J., Ashley, D. M., Krischer, J., Lovell, S., Rasheed, K., Marchev, F., Seman, A. J., Cokgor, I., Rich, J., Stewart, E., Colvin, O. M., Provenzale, J. M., Bigner, D. D., Haglund, M. M. et al. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology* 1998, 16(12), 3851–3857.
- [42] Aune, G. J., Takagi, K., Sordet, O., JoséeGuirouilh-Barbat, Antony, S., Bohr, V., Pommier, Y. Von hippel-lindau-coupled and transcription-coupled nucleotide excision repair-dependent degradation of RNA polymerase II in response to trabectedin. *Clinical Cancer Research* 2008, 14(20), 6449–6455. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0730
- [43] Germano, G., Frapolli, R., Simone, M., Tavecchio, M., Erba, E., Pesce, S., Pasqualini, F., Grosso, F., Sanfilippo, R., Casali, P. G., Gronchi, A., Virdis, E., Tarantino, E., Pilotti, S., Greco, A., Nebuloni, M., Galmarini, C. M., Tercero, J. C., Mantovani, A. et al. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer Research* 2010, 70(6), 2235–2244. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2335
- [44] Beumer, J. H., Buckle, T., Ouwehand, M., Franke, N. E. F., Lopez-Lazaro, L., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., Van Tellingen, O. Trabectedin (ET-743,

- Yondelis) is a substrate for P-glycoprotein, but only high expression of P-glycoprotein confers the multidrug resistance phenotype. *Investigational New Drugs* 2007, 25(1), 1–7. doi:10.1007/s10637-006-7773-9
- [45] Gajate, C., An, F., Mollinedo, F. Differential cytostatic and apoptotic effects of ecteinascidin-743 in cancer cells: Transcription-dependent cell cycle arrest and transcription-independent JNK and mitochondrial mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(44), 41580–41589. doi:10.1074/jbc.M204644200
- [46] Atmaca, H., Bozkurt, E., Uzunoglu, S., Uslu, R., Karaca, B. A diverse induction of apoptosis by trabectedin in MCF-7 (HER2-/ER+) and MDA-MB-453 (HER2+/ER-) breast cancer cells. *Toxicology Letters* 2013, 221(2), 128–136.
- [47] Bozkurt, E. Radyasyona Maruz Bırakılan İnsan Glioblastoma Multiforme Hücre Kültürlerinde (U-87 MG ve T98G) Trabectedin Aracılı Zenginleştirilmiş Sitotoksik Etkide DNA Tamir Mekanizmalarının Rolü. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa, 2013, 83 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [48] Bozkurt, E., Atmaca, H., Uzunoglu, S., Uslu, R., Karaca, B. p53 Modulates Trabectedin Mediated Cytotoxicity In Glioblastoma Multiforme Cells (U-87MG and T98G). *Annals of Oncology* 2013, 24(suppl 1), i30–i30. doi:10.1093/annonc/mdt047.3
- [49] Lefranc, F., Brotchi, J., Kiss, R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: Special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23(10), 2411–2422. doi:10.1200/JCO.2005.03.089
- [50] Levêque, D. Off-label use of targeted therapies in oncology. *World journal of clinical oncology* 2016, 7(2), 253–7. doi:10.5306/wjco.v7.i2.253
- [51] Casali, P. G., Executive Committee of ESMO The off-label use of drugs in oncology: a position paper by the European Society for Medical Oncology (ESMO). *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 2007, 18(12), 1923–5. doi:10.1093/annonc/mdm517
- [52] Trabectedin for Recurrent Grade II/III Meningioma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. 2016,. Retrieved November 22, 2016, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02234050#locn>
- [53] Hoda, M. A., Pirker, C., Dong, Y., Schelch, K., Heffeter, P., Kryeziu, K., van Schoonhoven, S., Klikovits, T., Laszlo, V., Rozsas, A., Ozsvar, J., Klepetko, W., Do me, B., Grusch, M., Hegedu s, B., Berger, W. Trabectedin Is Active against Malignant Pleural Mesothelioma Cell and Xenograft Models and Synergizes with Chemotherapy and Bcl-2 Inhibition In Vitro. *Molecular Cancer Therapeutics* 2016, 15(10), 2357–2369. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0846
- [54] Atmaca, H., Bozkurt, E. Trabectedin (ET-743) from Marine Tunicate for Cancer Treatment. In *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin* 2015, (pp. 397–412). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-07145-9_19
- [55] Monk, B. J., Lorusso, D., Italiano, A., Kaye, S. B., Aracil, M., Tanović, A., D’Incalci, M. Trabectedin as a chemotherapy option for patients with BRCA deficiency. *Cancer Treatment Reviews* 2016, 50, 175–182. doi:10.1016/j.ctrv.2016.09.009
- [56] Ordóñez, J. L., Amaral, A. T., Carcaboso, A. M., Herrero-Martín, D., García-

- Macías, M. del C., Sevillano, V., Alonso, D., Pascual-Pasto, G., San-Segundo, L., Vila-Ubach, M., Rodrigues, T., Fraile, S., Teodosio, C., Mayo-Iscar, A., Aracil, M., Galmarini, C. M., Tirado, O. M., Mora, J., Álava, E. de The PARP inhibitor olaparib enhances the sensitivity of Ewing sarcoma to trabectedin. *Oncotarget* 2015, 6(22), 18875–18890. doi:10.18632/oncotarget.4303
- [57] Atmaca, H., Bozkurt, E., Uzunoglu, S., Uslu, R., Karaca, B. A diverse induction of apoptosis by trabectedin in MCF-7 (HER2-/ER+) and MDA-MB-453 (HER2+/ER-) breast cancer cells. *Toxicology Letters* 2013, 221(2), 128–136. doi:10.1016/j.toxlet.2013.06.213
- [58] Riedl, S. J., Shi, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2004, 5(11), 897–907. doi:10.1038/nrm1496
- [59] Atmaca, H., Bozkurt, E. Trabectedin (ET-743) from marine tunicate for cancer treatment. In *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin* 2015, (pp. 397–412). Springer International Publishing.
- [60] Acikgoz, E., Guven, U., Duzagac, F., Uslu, R., Kara, M., Soner, B. C., Oktem, G. Enhanced G2/M Arrest, Caspase Related Apoptosis and Reduced E-Cadherin Dependent Intercellular Adhesion by Trabectedin in Prostate Cancer Stem Cells. *PLOS ONE* 2015, 10(10), e0141090. doi:10.1371/journal.pone.0141090
- [61] Watanabe, T., Huang, H., Nakamura, M., Wischhusen, J., Weller, M., Kleihues, P., Ohgaki, H. Methylation of the p73 gene in gliomas. *Acta neuropathologica* 2002, 104(4), 357–62. doi:10.1007/s00401-002-0549-1
- [62] Sarafian, V., Koev, I., Staykov, D. Mechanisms of Cell Resistance in Glioblastoma. *Cancer* 2009,.
- [63] Yan, Y., Xu, Z., Dai, S., Qian, L., Sun, L., Gong, Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2016, 35, 23. doi:10.1186/s13046-016-0303-5
- [64] Harhaji-Trajkovic, L., Vilimanovich, U., Kravic-Stevovic, T., Bumbasirevic, V., Trajkovic, V. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009, 13(9B), 3644–54. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00663.x
- [65] Josset, E., Burckel, H., Noel, G., Bischoff, P. The mTOR inhibitor RAD001 potentiates autophagic cell death induced by temozolomide in a glioblastoma cell line. *Anticancer Res* 2013, 33(5), 1845–1851. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645729>
- [66] Nihira, K., Miki, Y., Ono, K., Suzuki, T., Sasano, H. An inhibition of p62/SQSTM1 caused autophagic cell death of several human carcinoma cells. *Cancer Science* 2014, 105(5), 568–575. doi:10.1111/cas.12396
- [67] Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., Johansen, T. Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. *Methods in Enzymology* 2009, 451(C), 181–197. doi:10.1016/S0076-6879(08)03612-4
- [68] Tripathi, R., Ash, D., Shaha, C. Beclin-1-p53 interaction is crucial for cell fate determination in embryonal carcinoma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2014, 18(11), 2275–2286. doi:10.1111/jcmm.12386
- [69] Romero, J., Zapata, I., Córdoba, S., Jimeno, J. M., López-Martín, J. A., Tercero, J. C., La Torre, A. De, Vargas, J. A., Molerón, R., Sánchez-Prieto, R. In vitro radiosensitisation by trabectedin in human cancer cell lines. *European Journal of Cancer* 2008, 44(12), 1726–1733. doi:10.1016/j.ejca.2008.04.013
- [70] Bartek, J., Lukas, C., Lukas, J. Checking on DNA damage in S phase. *Nature*

- Reviews Molecular Cell Biology 2004, 5(10), 792–804. doi:10.1038/nrm1493
- [71] Wang, H., Zhang, T., Sun, W., Wang, Z., Zuo, D., Zhou, Z., Li, S., Xu, J., Yin, F., Hua, Y., Cai, Z. Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. Cell Death and Disease 2016, 7(6), e2247. doi:10.1038/cddis.2016.138
- [72] Shin, S. Y., Hyun, J., Yu, J.-R., Lim, Y., Lee, Y. H. 5-Methoxyflavanone induces cell cycle arrest at the G2/M phase, apoptosis and autophagy in HCT116 human colon cancer cells. Toxicology and Applied Pharmacology 2011, 254(3), 288–298. doi:10.1016/j.taap.2011.05.003
- [73] Pathania, A. S., Guru, S. K., Kumar, S., Kumar, A., Ahmad, M., Bhushan, S., Sharma, P. R., Mahajan, P., Shah, B. A., Sharma, S., Nargotra, A., Vishwakarma, R., Korkaya, H., Malik, F., Dotiwala, F., Du, J., Kenific, C. M., Thorburn, A., Debnath, J. et al. Interplay between cell cycle and autophagy induced by boswellic acid analog. Scientific Reports 2016, 6, 33146. doi:10.1038/srep33146.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emir Bozkurt
Doğum Yeri ve Yılı : Fatsa, 1989
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : emrbzkrt@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : İzmir Karataş Lisesi, 2005
Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2007-2011
Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programı, 2011-2013

Mesleki Deneyim

Kurum bilgisi : Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi,
Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı, 2010-2016.

Kurum bilgisi : Royal College of Surgeons in Ireland, Department of Physiology and
Medical Physics, 2016-... (Halen)

Yayınları

1. **Bozkurt, E.**, Atmaca, H., Kisim, A., Uzunoglu, S., Uslu, R., Karaca B. Effects of Thymus serpyllum Extract on Cell Proliferation, Apoptosis and Epigenetic Events in Human Breast Cancer Cells. Nutrition and Cancer. 2012, 64(8), 1245–1250.

2. Karaca, B., Atmaca, H., **Bozkurt, E.**, Kisim, A., Uzunoglu, S., Karabulut, B., Sezgin, C., Sanli, U.A., Uslu, R. Combination of AT-101/cisplatin overcomes chemoresistance by inducing apoptosis and modulating epigenetics in human ovarian cancer cells. Molecular Biology Reports. 2013, 40(6), 3925-33.

3. Atmaca, H., **Bozkurt, E.**, Uzunoglu, S., Uslu, R., Karaca, B.. A diverse induction of apoptosis by trabectedin in MCF-7 (HER2-/ER+) and MDA-MB-453 (HER2+/ER-) breast cancer cells. *Toxicology Letters*. 2013, 20;221(2):128-136.
4. Dirican, A., Atmaca, H., **Bozkurt, E.**, Erten, C., Karaca, B., Uslu, R. Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by modulating PI3K-AKT pathway. *Clinical and Translational Oncology*. 2015, 17(2):145-51.
5. Dirican, A., Erten, C., Atmaca, H., **Bozkurt, E.**, Kucukzeybek, Y., Varol, U., Oktay Tarhan, M., Karaca, B., Uslu, R. Enhanced cytotoxicity and apoptosis by thymoquinone in combination with zoledronic acid in hormone- and drug-resistant prostate cancer cell lines. *Journal of Balkan Union of Oncology*. 2014, 19(4):1055-61.
6. Karaca, B., Degirmenci, M., Ozveren, A., Atmaca, H., **Bozkurt, E.**, Karabulut, B., Sanli, U.A., Uslu, R. Docetaxel in combination with octreotide shows synergistic apoptotic effect by increasing SSTR2 and SSTR5 expression levels in prostate and breast cancer cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2015, 75(6):1273-80. doi: 10.1007/s00280-015-2756-1. Epub 2015 Apr 30.
7. Atmaca, H., **Bozkurt, E.**. Apoptotic and anti-angiogenic effects of Salvia triloba extract in prostate cancer cell lines. *Tumor Biology*. 2016, 37: 3639. doi:10.1007/s13277-015-4208-2.
8. Surmeli, Z., Gursoy, P., Erdogan, A.P., **Bozkurt, E.**, Atmaca, H., Uzunoglu, S., Sezgin, C., Şanlı, U.A., Uslu, R., Karaca, B. Combination of zoledronic acid and serine/threonine phosphatase inhibitors induces synergistic cytotoxicity and

apoptosis in human breast cancer cells via inhibition of PI3K/Akt pathway. Tumour Biol. 2016, 37(3):3665-73.

9. Gümüş, P., Öztürk, V.Ö., **Bozkurt, E.**, Emingil, G. Evaluation of the gingival inflammation in pregnancy and postpartum via 25-hydroxy-vitamin D3, prostaglandin E2 and TNF- α levels in saliva. Arch Oral Biol. 2016, 63, 1–6.

10. Karaca, B., Atmaca, H., **Bozkurt, E.**, Uslu, R. Each patient's cancer is like fingerprint: where are we in molecular profiling in breast cancer diagnosis? Med Sci Discovery, 2014, 1, 1.

11. Kursunlu, S.F., Ozturk, V.O., Han, B., **Bozkurt, E.** Gingival Crevicular Fluid IL-33 Levels in Gingival Inflammation. Journal of Animal and Veterinary Advances. 2013, 12 (4): 550-552.

12. Kursunlu, S.F., Ozturk, V.O., Han, B., **Bozkurt, E.** Gingival Crevicular Fluid Annexin-A1 Levels in Gingival Inflammation. Journal of Animal and Veterinary Advances. 2013, 12(4): 544-546.

13. **Bozkurt E.**, Atmaca H, Uzunoğlu S. Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direnci. Genel Tıp Dergisi. 2013, 23(4).

14. Özer Ö, **Bozkurt E.**, Uzunoğlu S. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürü: Yöntemler ve Uygulama Alanları. (Three-dimensional (3D) cell culture: methods and applications). Journal of Cell and Molecular Biology, *13 (2015) sayısında yayınlanmak üzere kabul edildi.*