

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ (IDH) GENİNDE MUTASYON
TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE
FLAVOPİRİDOLÜN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan
Ahsen GÜLER

Danışman
Doç. Dr. Zühal HAMURCU

Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2021
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ (IDH) GENİNDE MUTASYON
TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE
FLAVOPİRİDOLÜN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Ahsen GÜLER

Danışman
Doç. Dr. Zühal HAMURCU

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2019-9506 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

Ocak 2021
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Ahsen GÜLER

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Geninde Mutasyon Taşıyan ve Taşımayan Glioblastoma Hücrelerinde Flavopiridolün Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisinin Araştırılması” adlı **Yüksek Lisans tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Ahsen GÜLER

İmza

Danışman

Doç. Dr. Zühal HAMURCU

İmza

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

İmza

KABUL ONAY SAYFASI

Doç.Dr. Zühal HAMURCU danışmanlığında **Ahsen GÜLER** tarafından hazırlanan **“İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Geninde Mutasyon Taşıyan ve Taşımayan Glioblastoma Hücrelerinde Flavopiridolün Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisinin Araştırılması”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

05/01/2021

JÜRİ

İmza

Danışman: Doç. Dr. Zühal HAMURCU (Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı).....

Üye : Prof.Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ (Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı).....

Üye : Doç. Dr. Elif Funda ŞENER (Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı).....

Üye : Doç.Dr. Nilgün GÜRBÜZ (Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı).....

Üye :Doç. Dr. Mümin Alper ERDOĞAN (Fizyoloji Anabilim Dalı).....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

//2021

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez dönemim boyunca engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her zaman güler yüzlü ve hoşgörü ile yaklaşan, yanımda olan, desteğini ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen, çok değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. Zühal HAMURCU'ya

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca emeğini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye ve değerli hocam Doç. Dr. Elif Funda ŞENER'e

Yüksek lisans eğitim sürecinde emeğini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Hamiyet Dönmez ALTUNTAŞ hocama ve diğer hocalarıma,

Değerli ekip arkadaşlarım Nursultan NURDİNOV'a, Venhar ÇINAR'a ve yanımda olan desteğini hissettiren arkadaşlarıma,

Çalışmamı yürüttüğüm Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)'ne,

TYL-2019-9506 kodlu bu projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Tüm hayatım ve eğitim sürecimde yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman bana inanan ve güvenen canım aileme; canım babam Mükremin GÜLER'e, canım annem Gülnihal GÜLER'e teşekkür ederim.

Ahsen GÜLER

Kayseri, Ocak 2021

**İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ (IDH) GENİNDE MUTASYON TAŞIYAN VE
TAŞIMAYAN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE FLAVOPİRİDOLÜN
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ahsen GÜLER

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2021

Danışman: Doç. Dr. Zühal HAMURCU

ÖZET

Glioblastoma multiform (GBM) erişkinlerde en sık görülen primer malign beyin tümörüdür. GBM'ler, heterojen olmaları, yüksek proliferasyon oranları, agresif özellikleri nedeniyle tedavilere büyük ölçüde dirençlidir ve ortalama sağkalım süreleri bir yıldan azdır. Bu yüzden yeni tedavi stratejilerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

Endoplazmik retikulum (ER), protein sentezi, kalsiyum homeostazı ve fosfolipid sentezi gibi birçok hücresel fonksiyonda yer almaktadır. Bozulmuş ER işlevi, ER stresine (ERS) yol açar ve ERS cevap olarak hücrelerde, katlanmamış protein cevabını oluşturan (UPR) sinyal yolağı aktiveleşir.

GBM hücrelerinde UPR sinyal yolağının aktiveleştiği ve aktiveleşen UPR yolağının, GBM hücreleri için çok önemli bir sağkalım mekanizması olduğu gösterilmiştir. Flavopiridol, bir Hindistan bitkisinden türetilen ve ilk siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan yarı sentetik bir flavonoiddir. Flavopiridolün hücre döngüsünün ilerlemesini belirgin bir şekilde bloke ettiği ve böylece hücre çoğalmasını baskıladığı bildirilmiştir. Bu yüzden sunulan tez çalışmasında flavopiridolün izositrat dehidrogenaz (IDH) mutant ve izositrat dehidrogenaz (IDH) mutant olmayan GBM hücrelerinde ERS ile aktiveleşen UPR sinyal yolağı üzerine etkisinin karşılaştırılmalı olarak araştırılması amaçlandı. Bu amaç için iki farklı GBM hücrelerine farklı zaman ve konsantrasyonlarda flavopiridol uygulandı. Flavopiridol uygulanan iki farklı GBM hücrelerinde UPR sinyalini düzenleyen IRE1α, PERK, GRP78 ve CHOP proteinlerinin, onkogenik transkripsiyon faktörü olan FOXM1 proteininin ve DNA tamirinde görev alan PARP protein ekspresyonunun baskılandığı

bulundu. Ayrıca flavopiridol uygulanan iki farklı GBM hücrelerinde proliferasyonun, klon oluşumun ve migrasyonun azaldığı bulunurken genomik kararsızlığın arttığı bulundu. Sonuçlarımız, Flavopiridolün ERS'yle aktiveşen UPR sinyal yolağını baskılayarak GBM'lerin tedavisi için umut verici olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anantar Kelimeler: Flavopiridol, IDH-mutant GBM, GBM, UPR, FOXM1, PARP



**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FLAVOPIRIDOL ON
ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN GLIOBLASTOMA CELLS WITH
AND WITHOUT MUTATION IN THE ISOCITRATE DEHYDROGENASE
(IDH) GENE**

AHSEN GÜLER

Erciyes University, Institute Of Health Sciences

Department of Medical Biology

Master Thesis, January 2021

Supervisor: Assoc.Prof. Zuhale HAMURCU

ABSTRACT

Glioblastoma multiform (GBM) is the most common primary malignant brain tumor in adults. GBMs are highly resistant to treatments due to their heterogeneity, high proliferation rates, and aggressive properties, and their average survival time is less than one year. Therefore, new treatment strategies are urgently needed.

The endoplasmic reticulum (ER) is involved in many cellular functions such as protein synthesis, calcium homeostasis, and phospholipid synthesis. Impaired ER function leads to ER stress (ERS), and in response to ERS, the signaling pathway that creates the unfolded protein response (UPR) is activated in cells.

It has been shown that the UPR signaling pathway is activated in GBM cells and the UPR pathway is a very important survival mechanism for GBM cells. Flavopiridol is a semi-synthetic flavonoid derived from an Indian plant and was the first cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor. Flavopiridol has been reported to significantly block the progression of the cell cycle and thus suppress cell proliferation. Therefore, in the presented thesis study, it was aimed to comparatively investigate the effect of flavopiridol on the ERS-activated UPR signaling pathway in isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant and non-isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant GBM cells. For this purpose, flavopiridol was applied to two different GBM cells at different time and concentrations. It was found that the expression of IRE1 α , PERK, GRP78 and CHOP proteins regulating UPR signal, FOXM1 protein which is an oncogenic transcription

factor and PARP protein involved in DNA repair were suppressed in two different GBM cells treated with flavopiridol. In addition, it was found that proliferation, clone formation and migration decreased in two different GBM cells treated with flavopiridol, while genomic instability increased. Our results suggest that Flavopiridol may be promising for the treatment of GBMs by suppressing the UPR signaling pathway activated by ERS.

Key words: Flavopiridol, IDH-mutant GBM, GBM, UPR, FOXM1, PARP



İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Gliomalar	3
2.3.Glioblastoma multiform (GBM)	4
2.3.1.Glioblastoma multiform (GBM) Histolojisi.....	5
2.3.2.Glioblastoma multiform (GBM) Etiyolojisi.....	5
2.3.3.Glioblastoma multiform (GBM) Epidemiyolojisi	6
2.3.4.Glioblastoma Multiform (GBM) Sınıflandırılması.....	6
2.3.4.1.İzositrat Dehidrogenaz (IDH)-Yabanıl Tip GBM	7
2.3.4.2.İzositrat Dehidrogenaz (IDH)-Mutant GBM.....	8
2.3.5.İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Enzimi.....	9
2.3.5.1.İzositrat dehidrogenaz (IDH) gen mutasyonu ve Kanseri arasındaki ilişki.....	10
2.3.6.Glioblastoma Multiform (GBM) Güncel Tedavisi	12
2.4.Endoplazmik Retikulum	13
2.4.1.Endoplazmik Retikulum Stresi (ERS).....	13
2.4.2. Endoplazmik Retikulum Stres Sensörleri.....	15
2.4.2.1. Protein Kinaz R-benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz (PERK).....	15
2.4.2.2.İnozitol Gerektiren Enzim 1α (IRE1α)	15
2.4.2.3. Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6)	16

2.4.3.Glioblastoma multiform (GBM) ve Endoplazmik Retikulum Stresi (ERS) ..	16
2.6.Forkhead (Fox) Transkripsiyon Faktörleri.....	18
2.6.1.Forkhead box protein M1 (FOXM1) transkripsiyon faktörü.....	18
2.7.Flavopiridol.....	21
2.8.Glioblastoma multiform (GBM) Hücre Hatları	21
2.8.1.U-87 MG(ATCC® HTB-14™)	21
2.8.2.IDH mutant-U-87(ATCC® HTB-14IG™)	22
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	23
3.1. GEREÇ	23
3.1.1.Kullanılan cihaz, alet ve sarf malzemeler.....	23
3.2. YÖNTEM.....	24
3.2.1. Hücre Kültürü	24
3.2.1.1.Besiyer hazırlama	24
3.2.1.2.Hücre pasajlama	25
3.2.1.3.Hücre sayımı	25
3.2.1.4.Hücreleri Dondurma	26
3.2.2.Flavopiridol ile hücrelerin muamele edilmesi	26
3.2.2.1.Flavopiridolün hazırlanması.....	26
3.2.3.MTS Analizi	27
3.2.4.Klonojenik testi.....	28
3.2.5.Migrasyon analizi.....	28
3.2.6.Western Blot Analizi.....	28
3.2.6.1.Deneyin kurulması.....	29
3.2.6.2.Hücrelerin toplanması ve lizis aşaması.....	29
3.2.6.3.Protein Konsantrasyonlarının Hesaplanması	29
3.2.6.4. Proteinlerin jele yüklenmesi ve Elektroforez	30
3.2.6.5.Jelden Membrana Transfer.....	30
3.2.6.6.Proteinlerin ekspresyon analizi	30
3.2.7.Morfolojik hücre ölüm analizi (Höst (Hoechst) boyama)	31
3.2.8.İstatistiksel Analiz.....	31
4.BULGULAR	32
4.1. Flavopiridolün GBM hücrelerinde proliferasyona/canlılığa etkisi.....	32
4.2. Flavopiridolün GBM hücrelerinde klon oluşumuna etkisi	34

4.3. Flavopiridolün GBM hücrelerinde mobileteye/ migrasyona etkisi.....	36
4.4. Flavopiridolün GBM hücrelerinde morfolojik olarak apoptotik değişime etkisi.	45
4.5. Flavopiridolün GBM hücrelerinde UPR sinyal yolağına etkisi	47
4.6. Flavopiridolün GBM hücrelerinde DNA tamirinde görev alan PARP ve FOXM1 proteinlerinin ekspresyonlarına etkisi	51
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
6. KAYNAKLAR.....	58

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



KISALTMALAR ve SİMGELER

DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
GBM:	Glioblastoma multiform
IDH:	İzositrat dehidrogenaz
TP53:	Transkripsiyon faktör 53
PTEN:	Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu
ER:	Endoplazmik Retikulum
ERS:	Endoplazmik Retikulum Stresi
UPR:	Unfolded protein response (Katlanmamış protein cevabı)
TMZ:	Temozolomid
α-KG:	Alfa-ketoglutarat
2-HG:	2-hidroksiglutarat
NADP +:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
MSS:	Merkezi sinir sistemi
HIF-1 α:	Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
GRP78:	Glikoz düzenleyen protein 78
BİP:	Bağlayıcı immünoglobulin proteini
PERK:	Protein kinaz R-benzeri ER kinaz
IRE1α:	İnositol gerektiren enzim 1 α
ATF6:	Transkripsiyon faktörü 6
CDK:	Siklin bağımlı kinaz
PARP:	Poli ADP-riboz polimeraz
FOX:	Forkhead box transkripsiyon faktörü
ASK1:	Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1

AML:	Akut miyeloid lösemi
KML:	Kronik miyeloid lösemi
MMP-2:	Matris metaloproteinaz-2
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
LOH 10q:	10q kromozomunda heterozigotluk kaybı
ATCC:	American Type Culture Collection



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. DSÖ'ye göre IDH (-) ve IDH (+) glioblastomaların özellikleri.....	7
Tablo 2. Kullanılan Cihazlar.....	23
Tablo 3. Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	24
Tablo 4. U87 ve IDH mutant U87 hücre hatları için belirlenen flavopiridol konsantrasyonları.....	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Glioblastomanın histolojisi.....	5
Şekil 2. Primer ve sekonder glioblastoma multiformda görülen mutasyonlar.....	9
Şekil 3. Normal hücrelerde ve kanser hücrelerinde izositrat metabolizması.....	12
Şekil 4. GBM için standart güncel tedavi.....	13
Şekil 5. ER stresi sırasında UPR ve ER stres sensörlerinin aktivasyonu.....	16
Şekil 6. FoxM1, fizyolojik ve onkojenik sürece aracılık eder.....	19
Şekil 7. FoxM1 regülatörleri ve hedef genleri.....	20
Şekil 8. Flavopiridolün moleküler yapısı.....	21
Şekil 9. Thoma lamında sayım yapılan kareler.....	26
Şekil 10. Proteinlerin jele yüklenmesi.....	30
Şekil 11. 24 saat flavopiridolle muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde proliferasyon oranı.....	32
Şekil 12. 48 saat flavopiridolle muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde proliferasyon oranı.....	33
Şekil 13. 72 saat flavopiridolle muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde proliferasyon oranı.....	34
Şekil 14. Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde	35
Şekil 15. 24 saat Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde migrasyon oluşum oranı.....	37
Şekil 16. 24 saat Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinde migrasyon oluşum oranı.....	38
Şekil 17. 48 saat Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde migrasyon oluşum oranı.....	40

Şekil 18. 48 saat Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinde migrasyon oluşum oranı.....	41
Şekil 19. 72 saat Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde migrasyon oluşum oranı.....	43
Şekil 20. 72 saat Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinde migrasyon oluşum oranı.....	44
Şekil 21. 24, 48 ve 72 saat Flavopiridol ile muamele edilen U87 hücrelerinin morfolojik olarak apoptotik değişime uğrama oranı.....	46
Şekil 22. 24, 48 ve 72 saat Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinin morfolojik olarak apoptotik değişime uğrama oranı.....	47
Şekil 23. Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde UPR sinyal yolağında görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri... ..	49
Şekil 24. U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerde bazal seviyede UPR sinyal yolağında görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri.....	50
Şekil 25. Flavopiridol uygulanan GBM hücrelerinde DNA tamirinde görev alan PARP ve FOXM1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri.....	52

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Glioblastoma multiform (GBM)'lar Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün sınıflandırmasında evre IV gliomalar olup tüm gliomaların en yaygınıdır ve 5 yıllık sağkalımları %5'den az olan en yüksek dereceli alt tipidir. Glioblastoma yüksek proliferatif aktivitesi ile karakterizedir. Ortalama sağkalım süreleri genellikle tanı tarihinden itibaren bir yıldan azdır ve en elverişli durumlarda bile çoğu hasta iki yıl içinde yaşamını kaybeder (Stupp ve ark., 2005). Bu yüzden yeni tedavi stratejilerine acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

Endoplazmik retikulum (ER), protein sentezi, kalsiyum homeostazı ve fosfolipid sentezi gibi birçok hücresel fonksiyonda yer almaktadır. ER'nin uygun işleyişi hücresel aktiviteler ve sağkalım için çok önemlidir, ancak bozulmuş ER işlevi, ER stresi (ERS) olarak adlandırılan bir durum olan katlanmamış proteinlerin toplanmasına neden olur. ERS durumunda, hücrelerde, katlanmamış protein cevabını oluşturan (UPR) sinyal yolağı aktifleşir. Tümör hücrelerinde ERS ile aktif olan UPR'nin, tümör büyümesini ve malign hücre dönüşümünü destekleyen bir mekanizma olarak davrandığı bildirilmiştir (Shi ve ark., 2020; Chen ve Cubillos-Ruiz, 2020). Tümör hücrelerinde ER stresi ile aktifleşen UPR, homeostaziyi sağlayarak hücrelerin hayatta kalması ve büyümesi için elverişli ortam oluşturur (Gundamaraju ve ark., 2020; Chen ve Cubillos-Ruiz, 2020). Bunun yanı sıra terapötik tedavi gören hücrelerde de aktif UPR'nin kemoteröpiye karşı direnç yol açtığı gösterilmiştir (Díaz-Bulnes ve ark., 2020).

Diğer kanser hücrelerinde olduğu gibi GBM hücrelerinde de ERS durumunda, UPR'nin aktifleştiği ve UPR'nin özellikle GBM'de büyüme, invazyon, terapötik direnç ve anjiyogenezde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Obacz ve ark., 2017). ERS'ne karşı aktifleşen UPR, zorlu koşullarda GBM hücrelerinin sağkalımı için çok önemli bir mekanizma olarak gösterilmiştir. Bu yüzden hem GBM hem de diğer tümörler için ERS hedefleyen bir düzenlemenin, kanserlerin tedavisi için yeni perspektif sağlayacağı ileri sürülmektedir (Shi ve ark., 2020).

Flavopiridol, bir Hindistan bitkisi *Dysoxylum binectariferum*'dan türetilen ve klinik araştırmalarda test edilen ilk siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olarak tanımlanan yarı sentetik bir flavonoiddir (Tan ve ark., 2004; Saisomboon ve ark., 2019). Flavopiridolün antiinflamatuvar, antioksidant ve antikanser etkileri olduğu bunun sonucunda tümör büyümesini ve hücre göçünü geciktirdiği gösterilmiştir (Mahoney ve ark., 2012, 2013; Shao ve ark., 2016). GBM'de ise flavopiridolün etkinliğini araştıran çok az sayıda çalışma mevcut olup, bu çalışmalar GBM hücre hattı olan U87 hücrelerinde ve murin glioma hücrelerinde flavopiridolün antiproliferatif olarak etkisinin olduğunu göstermiştir (Newcomb ve ark., 2003; Cobanoglu ve ark., 2016). Ancak flavopiridolün antiproliferatif etkisini hangi sinyal yolağı üzerinden gösterdiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Flavopiridolün ER stresine etkisi sadece kronik lenfositik lösemi hücrelerinde araştırılmış olup flavopiridolün ER stresini indükleyerek hücrelerin ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Mahoney ve ark., 2012, 2013). Literatürdeki bu verilerden yola çıkarak sunulan tez çalışmasında flavopiridolün IDH mutant ve IDH mutant olmayan GBM hücrelerinde ER stresi ile aktiveleşen UPR sinyal yolağı üzerine etkisinin karşılaştırılmalı olarak araştırılması amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser kelimesi “canker” veya “carcinos” kelimelerinden türemiştir ve Latinceye yengeç anlamına gelmektedir. MÖ 3. yüzyılda ilk kez Hipokrat tarafından kullanılmış; tümörün etrafındaki damarların şişmesi yengecin bacaklarına benzetilmesi ile ortaya çıkmıştır (Baykara, 2016).

Kanser, hücrelerin biyolojik süreçlerinde rol alan ve bunları kontrol eden genlerde oluşan kalıtsal ya da somatik değişikliklerin birikmesi ile meydana gelir. Böylece değişen hücre fonksiyonları hücrelerin kontrolsüz bölünmesine ve çoğalmasına yol açar. (Van Meir ve Hadjipanayis, 2010; Baykara, 2016). Kanser, altı ayırt edici biyolojik yeteneği ile bilinir; insan tümörlerinin gelişimi sırasında edinilen; proliferatif sinyalleme sürdürmeyi, hücre ölümüne direnmeyi, büyüme baskılayıcılarını atlatmayı, ölümsüzlüğü sağlamayı, istila ve metastazı aktive etmeyi, anjiyogenezi indüklemeyi içerir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.2. Gliomalar

Santral sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu, glial hücrelerden gelişen ve glioma olarak adlandırılan malin tümörler oluşturur. DSÖ glioma tümörlerini; tümör genişliğine, genetik değişikliklere, mikrovasküler proliferasyona, nekroz ve çoğalma indeksine göre 4 evreye ayırmıştır (Gargini ve ark., 2020; Sonoda, 2020): Evre-I pilositik astrositom, Evre-II düşük evre astrositom, Evre-III anaplastik astrositom ve Evre-IV glioblastoma multiform (GBM) olarak tanımlanmıştır. GBM, yetişkinlerde en sık görülen ve oldukça agresif glioma türünü temsil eder. GBM’ler, farklılaşmış ve farklılaşmamış hücrelerin belirteçlerini eksprese eden hücrelerden oluştuğu için oldukça

farklı bir hücre bileşimi sergiler ve fenotipik olarak heterojenite gösterir. Bu nedenle “glioblastoma multiform” olarak adlandırılır (Gargini ve ark., 2020; Sonoda, 2020).

2.3.Glioblastoma multiform (GBM)

Glioblastoma multiform (GBM)’ler, yüksek invazyon potansiyeli, apoptoza karşı direnç, yüksek anjiogenez kapasitesi ve hücre göçü yeteneğiyle diğer beyin tümörlerinden ve malign neoplazmalardan ayrılmaktadır. Özellikle GBM kötü prognoz ve yüksek nüks oranları ile karakterize agresif beyin tümörleri olup, tanıdan 14 ay sonra kötü prognozu olan primer beyin tümörlerinin en ölümcül tipidir (Kanderi ve Gupta, 2020).

GBM, 5 yıllık sağ kalımları % 5’den az olup, heterojen özellik göstermeleri, yüksek proliferasyon oranları, agresif davranışları, hücre göçü ve istilası ile karakterizedir. GBM tedavisinde ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, GBM’nin kötü prognozu, GBM hastalarında tedaviyi zorlaştırmaktadır; tedavi direnci ve yüksek infiltratif özelliğinden dolayı tam rezeksiyon imkansız hale gelmektedir ve GBM hastaları için ortalama sağkalım süresi 12-15 aydan daha az sürmekle birlikte en elverişli durumlarda bile çoğu hasta iki yıl içinde yaşamını kaybetmektedir. Bunun nedeni hastaların konvansiyonel kemoterapi ve radyasyona zayıf bir şekilde yanıt vermesidir. Bunun sonucunda yapılan standart tedaviden sonra hastalığın yeniden nüks geçirmesi izlenir. Bu nedenle tanı, prognoz ve tedavi açısından GBM patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılmasına ve bu mekanizmaları hedefleyen daha etkili tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Stupp ve ark., 2005; Pearson ve Regad, 2017; Shergalis ve ark., 2018; Fabian ve ark., 2019; Peñaranda-Fajardo ve ark., 2019)

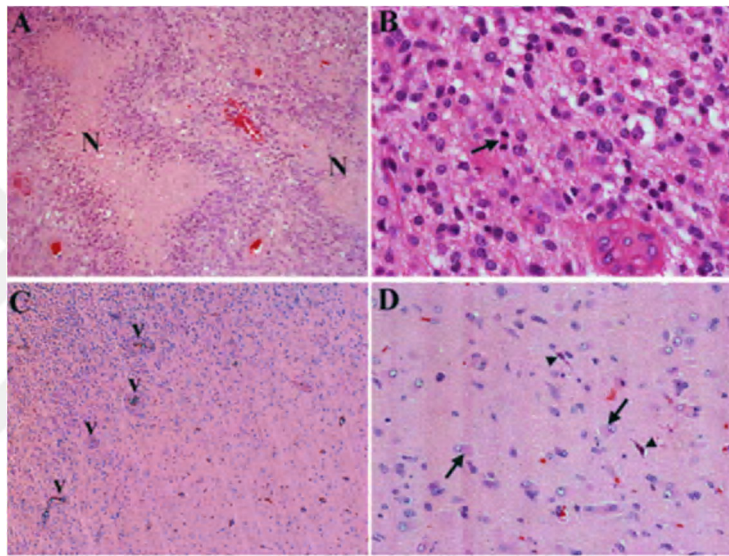
GBM’de görülen semptomlar kişiden kişiye değişmekle birlikte başlıca semptomlar; kusma, iştahsızlık, konuşma güçlüğü, baş ağrısı, hafıza kaybı, nöbetler, bulanık görme, mide bulantısı, kas zayıflığı, ruh hali değişiklikleri, düşünme ve öğrenme yeteneğindeki değişiklikler olarak sıralanabilir (Shah ve Kochar, 2018).

Farklı sonuçlara yol açan farklı yaşlardaki primer GBM’ler, GBM’lerin % 80’ini oluşturur ve yaşları ortalama 62 olan yaşlı hastalarda görülürken, düşük dereceli astrositomdan veya oligodendrogliomdan kaynaklanan sekonder GBM’ler ise yaşları ortalama 45 olan genç hastalarda görülür. Sekonder GBM’ler genellikle frontal lobda bulunur, daha az nekroz derecesine sahiptir ve primer GBM’lerden daha iyi bir prognoz

sergilerler (Ostrom ve ark., 2016; Gargini ve ark., 2020; Sonoda, 2020; Kanderi ve Gupta, 2020).

2.3.1. Glioblastoma multiform (GBM) Histolojisi

GBM'nin yaklaşık %95'nin serebral hemisferlerde görüldüğü ve malignite derecesi mitotik aktivite, nükleer atipik hücreler, endotel hiperplazi, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz alanları gibi özelliklerin varlığı ile bilinmektedir (Şekil 1) (Nakada ve ark. 2007; Tea ve ark., 2020).



Şekil 1. Glioblastomanın histolojisi A. Glioma hücreleri ve mikrovasküler proliferasyonlu tümör nekrozu gösterir. B. Pleomorfik ve nükleer atipik hücreleri gösterir. C. Tümör kütlesi ile tümör olmayan beyin arasındaki sınır bölgesini gösterir. D. Atipik çekirdeğe sahip ve uzantılı istilacı glioma hücrelerini ve hücrelerin reaktif astrositlerle çevrili olduğunu gösterir (Nakada ve ark., 2007).

2.3.2. Glioblastoma multiform (GBM) Etiyolojisi

GBM'de birçok genetik ve çevresel faktörler incelenmiştir ancak hastalarda GBM'e neden olan hiçbir risk faktörü tanımlanmamıştır. Birçok kanser gibi GBM de sporadik gelişimlidir (Kanderi ve Gupta, 2020). Bazı çalışmalarda çevresel faktörlerden iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalmanın GBM riskini artırdığı gösterilmiştir. Radyasyonun hem düşük hem de yüksek dozu etkili olup DNA hasarı oluşturmakta ve GBM gelişimine neden olmaktadır. Alerji (astım, solunum yolu alerjileri ve egzamalar) ve atopik hastalık hikayesi olanlarda daha düşük oranda GBM riski olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Özduman ve ark., 2019). Ayrıca, 10 yıldan az kullanımda anti-inflamatuar ilaçların GBM üzerinde koruyucu bir etkisi bildirilmiştir (Scheurer ve

ark., 2011). Ailesel yatkınlıkta GBM gelişmesinin genetik kod bozukluklarının aktarılmasından kaynaklandığı düşünülmekle birlikte vakaların sadece %1'i ailesel formda tanımlanmıştır (Schwartzbaum ve ark., 2006). Sadece çok az sayıda GBM'li hastada (% 1-2) Li-Fraumeni Sendromu, Turcot Sendromu gibi kalıtsal sendromlarla GBM geliştiği bildirilmiştir (Lütgendorf-Caucig ve ark., 2020). GBM'nin yaşam tarzı faktörlerinden; sigara, alkol tüketimi, ilaç kullanımı ya da N-Nitroz bileşiklere maruz kalma ile ilişkisi olduğuna dair kanıtlar bulunmamaktadır (Hochberg ve ark., 1990). GBM gelişmesinde cep telefonu kullanımının GBM riskini artırmadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ancak uzun süreli kullanımıyla ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Urbańska ve ark., 2014).

2.3.3.Glioblastoma multiform (GBM) Epidemiyolojisi

Dünya istatistiklerine göre GBM en çok görülen malin primer beyin tümörüdür. İstatistiklere göre GBM'nin yıllık ortalama insidans oranı 5-8/100.000 olarak bilinmektedir. GBM'nin görülme sıklığının, çalışma yapılan ülkenin tıbbi imkanlarına ya da sağlık politikalarına göre değişimler göstereceği bildirilmiştir. (Özduman ve ark., 2019; Escamilla-Ramírez ve ark., 2020). GBM'nin insidansı yaşla birlikte artmaktadır ve ortalama yaş 64'tür. GBM'nin erkeklerde daha fazla olduğu rapor edilmiştir ve erkeklerdeki görülme oranı kadınlara göre %1.57 daha fazladır (Özduman ve ark., 2019; Kanderi ve Gupta, 2020). Primer GBM'nin erkeklerde, sekonder GBM'nin de kadınlarda daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Thakkar ve ark., 2014). GBM insidansının gelişmiş ülkeler ile yüksek sosyo-ekonomik düzeydeki toplumlarda daha yüksek olduğu, ayrıca beyaz ırkta diğer ırklardan daha fazla görüldüğü de rapor edilmiştir (Porter ve ark., 2015). TC Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre Türkiye'de santral sinir sistemi kanserlerinin görülme sıklığı bu sonuçları desteklemektedir (<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri> Erişim tarihi: 20.11.2020).

2.3.4.Glioblastoma Multiform (GBM) Sınıflandırılması

2016 yılında DSÖ, Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'ni histolojik ve moleküler özelliklerine göre sınıflandırmış ve glioblastomalar İzositrat Dehidrogenaz (IDH) genindeki mutasyon durumuna göre; IDH geninde mutasyon taşımayan-yabanıl tip glioblastoma (IDH (-) GBM) ve IDH geninde mutasyon taşıyan-IDH-mutant glioblastoma (IDH (+) GBM) olarak iki sınıfa ayrılmıştır. (Tablo 1) (Louis ve ark., 2016; Gargini ve ark., 2020).

Tablo 1. DSÖ'ye göre IDH (-) ve IDH (+) glioblastoma multiformlarının özellikleri (Louis ve ark.,2016).

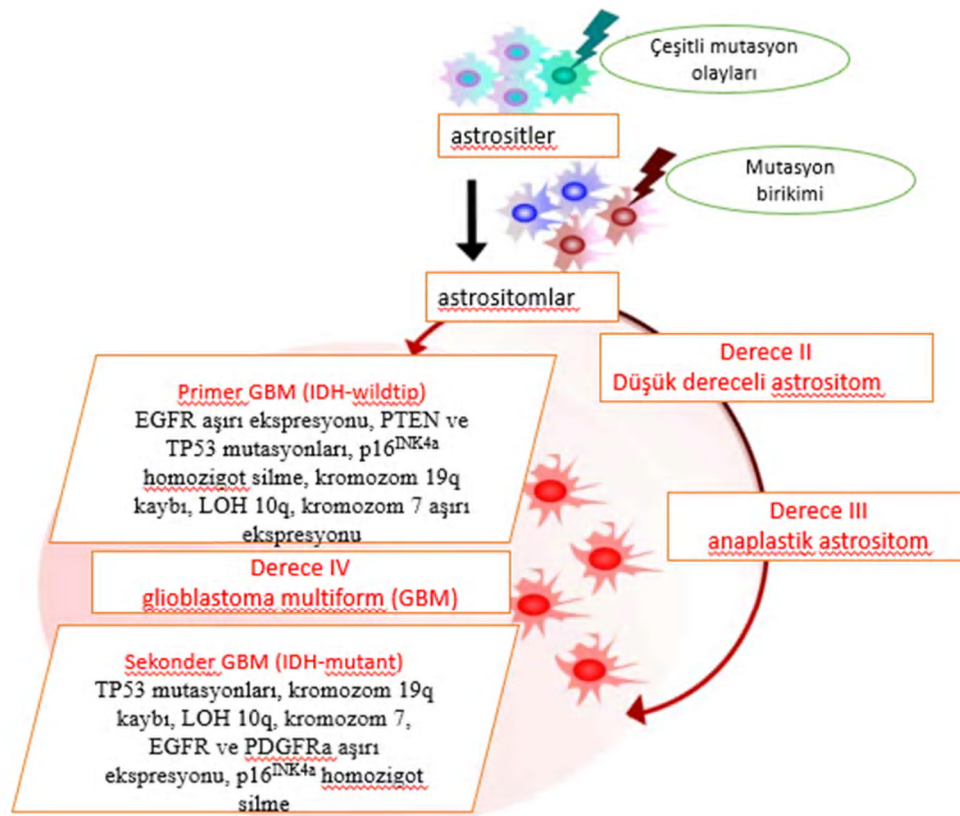
	IDH (-) GBM	IDH (+) GBM
Sinonim	Primer Glioblastoma, IDH yabancı tip	Sekonder Glioblastoma, IDH mutant tip
Prekürsör Lezyon	De novo	Diffüz astrositom Anaplastik astrositom
Glioblastomların oranı	%90	%10
Ortalama tam yaşı	62 yıl	44 yıl
Erkek / Kadın oranı	1,42: 1	1,05: 1
Tamda klinik öykünün ortalama süresi	4 ay	15 ay
Ortalama genel sağkalım; Cerrahi + Radyoterapi : Cerrahi + Radyoterapi + Kemoterapi :	9,9 ay 15 ay	24 ay 31 ay
Lokalizasyon	Supratentorial	Genelde frontal
Nekroz	Yaygın	Sınırlı
TERT promotor mutasyonları	%72	%26
TP53 mutasyonları	%27	%81
ATRX mutasyonları	Nadiren	%71
EGFR amplifikasyonu	%35	Nadiren
PTEN mutasyonları	%24	Nadiren

2.3.4.1. İzositrat Dehidrogenaz (IDH)-Yabancı Tip GBM

IDH-yabancı tip GBM “de novo glioblastoma” veya “primer glioblastoma” olarak bilinmektedir. Primer GBM'ler hızlı gelişir ve klinik olarak düşük dereceli öncülleri olmamakla birlikte moleküler açıdan da sekonder GBM'den farklıdır. IDH-yabancı tip GBM vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturmakla birlikte 55 yaşın üzerindeki hastalarda görülür (Louis ve ark., 2016; Pisapia, 2017; Wang ve ark., 2018; Wu ve ark., 2019; Sonoda, 2020). Primer GBM'de görülen genetik değişiklikler, 10q kromozomunda heterozigotluk kaybı (LOH 10q) (% 69), epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) aşırı ekspresyonu (% 34), TP53 mutasyonları (% 31), p16^{INK4a} homozigot delesyon (% 31), fosfat ve tensin homologu olan PTEN geninde mutasyonlar (% 24) olarak tespit edilmiştir (Şekil 2) (Ohgaki ve Kleihues, 2005; Davis, 2016).

2.3.4.2. Izositrat Dehidrogenaz (IDH)-Mutant GBM

IDH-mutant GBM'ler, vakaların yaklaşık %10'unu oluşturmakta ve IDH-yabanıl tip GBM'e göre daha genç yaşlarda ortaya çıkmaktadır (Louis ve ark., 2016). IDH (+) ve IDH (-) GBM'ler histolojik olarak birbirleriyle benzerlik göstermelerine rağmen, prognozu daha iyi olan IDH (+) GBM'ler tipik olarak genç hastaları etkiler ve düşük dereceli yaygın astrositom veya oligodendrogliomdan gelişirler. Dolayısıyla, IDH (+) GBM'ler, düşük dereceli diffüz glioma öykülerinden gelişen sekonder glioblastoma ile yakından ilişkilidir ve daha çok genç hastalarda ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden IDH-mutant GBM, klinik olarak düşük dereceli bir gliomdan ilerleyerek ortaya çıkmakta ve "sekonder glioblastoma" olarak adlandırılmaktadır (Pisapia, 2017). İlginç bir şekilde, yapılan klinik araştırmalara göre, IDH mutasyonu taşıyan hastaların, mutasyon taşımayan glioblastomalı hastalara göre nispeten olumlu bir sağkalım gösterdikleri ortaya çıkmıştır (Louis ve ark., 2016; Sonoda, 2020; Mirchia ve Richardson, 2020). Günümüzde IDH mutasyonu sekonder GBM'in (ikincil GBM'nin ~% 70'i, birincil GBM'de %5-20'si) ayırt edici bir moleküler özelliği olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İlaveten, sekonder GBM'de izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) mutasyonları, TP53 mutasyonları ve kromozom 19q kaybı sıklıkla görülür (Davis, 2016). Özellikle IDH-mutant GBM'de TP53 (% 65) ve LOH 10q (% 63) mutasyonları daha çok görülmektedir (Şekil 2) (Ohgaki ve Kleihues, 2005). IDH mutant GBM'lerin, CpG adalarında DNA hipermetilasyonu ile karakterize olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar IDH mutasyonunun, epigenetik değişiklikler, metabolik yollar ve tümör gelişmesine bağlı transkripsiyonel programlar da dahil birçok biyolojik süreçleri etkilediğini göstermektedir (Hersh ve ark., 2018).



Şekil 2. Primer ve sekonder glioblastoma multiformda görülen mutasyonlar (Pawlowska ve ark., 2018).

2.3.5. İzositrat Dehidrogenaz (IDH) Enzimi

IDH enzimleri, IDH1 ve IDH2 genleri tarafından kodlanan metabolik enzimlerdir. Üç izoformu bulunan IDH enzimleri Krebs döngüsü, glutamin metabolizması, lipogenez ve redoks regülasyonu gibi birçok metabolik sürece katılan enzimlerdir. IDH1 sitoplazma ve peroksizomlarda bulunurken, IDH2 ve IDH3 mitokondri matriksinde bulunur (Waitkus ve ark., 2016; Han ve ark., 2020).

Normal hücrelerde, IDH enzimleri, enerji üretimi sırasında NADPH oluşturmak için bir nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺)'ı kofaktör olarak kullanarak krebs döngüsü içinde Alfa-ketoglutarat (α -KG) oluşturmak için substratı olan izositratın oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eder. IDH3, kofaktörü olarak nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) kullanarak izositrattan α -KG'ye dönüşümünü katalize eder (Reitman ve Yan, 2010; Waitkus ve ark., 2016; Han ve ark., 2020).

α -KG'a dönüşümünü IDH1'in aktif bölgesinde meydana gelen tek bir amino asit değişikliği ile 132. kodonunun argininden histidine dönüşümü sonucunda, α -KG'nin yeni bir ürüne, 2-hidroksigluterata (2-HG) dönüştürülmesini sağlayarak enzimin katalitik özelliklerini değiştirir (Şekil 3) (Van Meir ve ark., 2010; Pisapia, 2017).

IDH enzimleri normalde izositratın α -KG'ye dönüştürülmesini sağlarken, NADP+'dan da NADPH'ye dönüştürülmesini sağlayan homodimerik enzimlerdir. Ancak IDH mutasyonu sonucunda NADP +/NADPH oranında dengesizlik meydana gelir ve gen düzenlenmesinde, doku homeostazında önemli rolleri olan α -KG'deki azalma ve onkometabolit 2-HG üretimindeki artma sonucundaki bu fonksiyonel kazanım ile hem DNA demetilasyonunda hem de histonda rol oynayan enzimler inhibe edilerek epigenetik değişikliklere yol açmakta ve onkogenezi desteklemektedir (Clark ve ark., 2016; Fujii ve ark., 2016; Ferris ve ark., 2017; Pisapia, 2017).

Ayrıca hücre içinde IDH enzimlerinin, insülin salgılanmasını pozitif bir şekilde düzenleyerek glikoza hücresel yanıtı düzenlediği, son zamanlarda, IDH1'in çeşitli hücresel bağlamlarda lipid metabolizmasında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Hipoksi sırasında IDH1, lipid sentezi için asetil-CoA üretmek amacıyla α -KG'in indirgeyici karboksilasyonunu katalize ederek lipogenezi teşvik ettiği bildirilmiştir (Waitkus ve ark., 2016; Maus ve Peters, 2017).

IDH1 insanlarda NADPH beyin dokusunun ana kaynağı olup, IDH1 tarafından, izositratın oksidatif dekarboksilasyonu yoluyla üretilen NADPH, oksitlenmiş glutatyon ve tiyoredoksini azaltarak hücrelerde lipid peroksidasyonuna ve oksidatif DNA hasarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, normal hücrelerde, IDH1 ve IDH2, oksidatif stresin regülasyonunda önemli roller oynamaktadır (Waitkus ve ark., 2016).

2.3.5.1. Izositrat dehidrogenaz (IDH) gen mutasyonu ve Kanser arasındaki İlişki

Hücre metabolizmasında düzensizlik, kanser hücrelerinde en yaygın görülen özelliklerden biridir. NADP+ bağımlı izositrat dehidrogenazlar -1 ve -2 (IDH1 ve IDH2), lipid sentezinde, oksidatif strese karşı hücresel savunmada ve oksidatif solunum gibi hücresel metabolizmaların düzenlenmesinde görev alır (Reitman ve Yan, 2010). İzositrat dehidrogenaz (IDH) mutasyonu ilk olarak 2008'de araştırmacıların 22 insan glioblastoma (GBM) tümörlerinde yapılan yeni nesil sekanslama ile gen ekspresyon analizleri ve 20.661 protein kodlayan gen analiz çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar GBM'de IDH geninin aktif bölgesinde tekrarlayan mutasyonlar

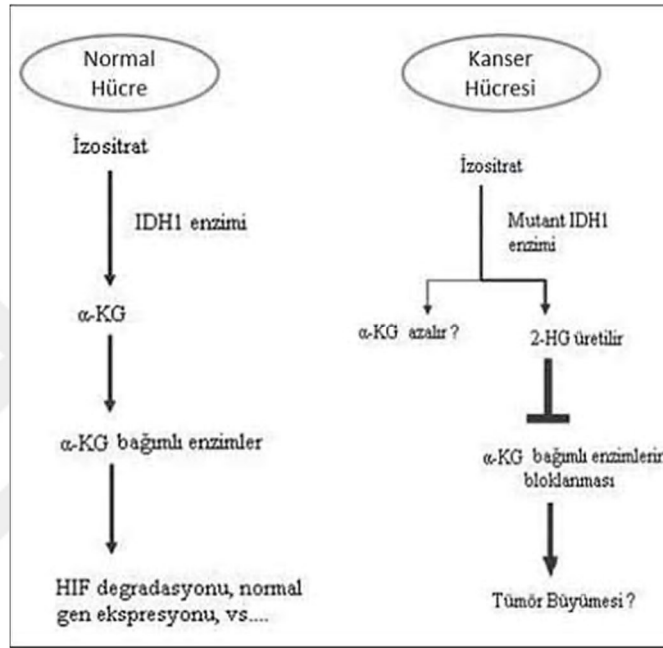
olduğunu ve oldukça sık görüldüğünü (%12) bulmuşlardır (Parsons ve ark., 2008; Clark ve ark., 2016).

Daha sonra yapılan çalışmalar, IDH mutasyonlarının derece II / III gliomaların ve sekonder GBM'lerin büyük çoğunluğunda, ayrıca akut miyeloid lösemi (AML), melanom dahil olmak üzere başka tümörlerde de oluştuğunu göstermiştir (Reitman ve Yan, 2010; Waitkus ve ark., 2016). Daha sonraki yapılan çalışmalar ise, gliomaların derece-derece karşılaştırmasında, IDH-mutant tümörlerin, IDH-yabanıl tip tümörlere kıyasla anlamlı ölçüde daha uzun genel sağkalıma sahip olduğunu göstermiştir. IDH (-) GBM'ler 9-15 ay kadar bir sağkalım gösterirken, histolojik olarak benzer IDH (+) GBM'lerin ortalama 24-31 aylık bir sağkalım gösterdikleri rapor edilmiştir (Mirchia ve Richardson, 2020). IDH1 ve IDH2'de oluşan mutasyonlar, bu enzimlerin aktif bölgelerindeki spesifik arginin kalıntılarındaki meydana gelir (Clark ve ark., 2016). Kanserde, IDH1 mutasyonları tek bir allelde meydana gelir (heterozigottur). Gliomalar en çok R132H IDH1 mutasyonu içerirken, AML'lerin çoğunluğunun R132C mutasyonu içerdiği gösterilmiştir (Reitman ve Yan, 2010).

IDH1/2'inin mutasyonu sonucu onkometabolit olan 2-hidroksiglutarat (2-HG) üretilir. 2- HG, gen regülasyonunda ve doku homeostazında önemli roller oynayan α -KG'ye bağımlı enzimleri inhibe eder. Aynı zamanda histon de-metilazları inhibe ederek DNA ve histon metilasyonunu değiştirerek farklılaşma sürecini inhibe ettiği bildirilmiştir (Clark ve ark., 2016).

HIF1- α , hipoksiyle indüklenen onkogenik bir transkripsiyon faktörüdür. VEGF dahil oksijenasyon ve vaskülarizasyon da rol oynayan modülatör genlerin ekspresyonunu düzenler. IDH (+) hücrelerde, IDH1 fonksiyon kaybına ve hücre içi α -KG seviyelerinin azalmasına bağlı olarak HIF1- α protein ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Waitkus ve ark., 2016). Tam olarak anlaşılmamasına rağmen, IDH mutasyonu, gliomalarda, 2-HG aracılığıyla tümörögenezise katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir. Doğal olarak, IDH-mutant hastaların, IDH mutant olmayan hastalara göre daha kötü prognoz göstermesi beklenir. Ancak, IDH-mutasyonlu hastaların genellikle IDH mutant olmayanlara göre daha iyi sonuçlara sahip olduğu bilinmektedir. Bu fenomen henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat, IDH mutasyonu sonucunda, α -KG'in 2-HG dönüşümü için NADPH kullanılır, hücrelerde NADPH seviyesi azalır ve hücreler serbest radikaller ve ROS yoluyla strese daha duyarlı hale gelir. Ayrıca 2-HG, ATP sentaza bağlanarak

doğrudan onu inhibe eder ve kanser hücrelerinde istenmeyen durumlara yol açar. Dolayısıyla IDH-mutasyonlu hastaların daha iyi sonuçlar sergilemesinin IDH mutasyonu sonucu hücre içindeki metabolik yolların inhibisyonuna bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (Şekil 3) (Maus ve Peters, 2017).



Şekil 3. Normal hücrelerde ve kanser hücrelerinde izositrat metabolizması (Kalkan ve Atlı, 2014).

2.3.6.Glioblastoma Multiform (GBM)'ların Güncel Tedavisi

GBM'de standart tedavi; maksimal cerrahi rezeksiyon, ardından radyoterapi ve alkileyici ajan temozolomid (TMZ) kemoterapiyi içermektedir (Zhao ve ark., 2020). Hastalarda mümkün olduğunca tümörü çıkarmak için maksimum güvenli cerrahi rezeksiyon yapılır ve ameliyattan 2-4 hafta sonra iyileşme dönemi olur. Daha sonra, 6 haftalık sürede 60 Gy dozda, seans başına 2 Gy fraksiyonlu tümör hacminden 2-3 cm'lik bir fazlalık ile radyoterapi ile eşzamanlı günlük 75 mg/m²'lik TMZ (temozolomid, kan-beyin bariyerini (BBB) geçebilen DNA-alkilleme ajanı) adjuvan kemoterapisi verilir. Sonraki süreçte hastalara 6 ay yalnızca 150-200 mg/m²'lik bir dozda TMZ adjuvan kemoterapisi verilir (Şekil 4). Kemoterapi tedavisini bitirmede, nöroşirurji tarafından hastaların tedaviye yanıtı izlenerek karar verilir (Tea ve ark., 2020).



Şekil 4. GBM için standart güncel tedavi (Tea ve ark., 2020).

GBM hızlı yayılması ve yoğun anjiyogenez ile radyoterapi ve kemoterapi gibi agresif tedavilere karşı hem direnç geliştirmesi hem de hastalığın yüksek oranda nüks etmesi ile bilinmektedir. Bu nedenle günümüzde daha etkili hedefe yönelik tedavi seçeneklerine acil ihtiyaç vardır (Campanella ve ark., 2020).

2.4. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik Retikulum (ER) organeli protein sentezlenmesinde, lipid metabolizmasında, protein katlanmasında, proteinin translasyon sonrası işlenmelerinde ve hücre içindeki kalsiyum (Ca^{2+}) dengesini sağlamada rolleri olan büyük dinamik bir yapıdır (Lin ve ark., 2015). Ayrıca protein sentezi için ER kalite kontrol merkezi olarak da bilinmektedir (Szegezdi ve ark., 2006). ER’de çeşitli modifikasyonlar ile yeni sentezlenen proteinlerin katlanması gerçekleştirilir. Ayrıca, N-glikozilasyon, hidroksilasyon, disülfid oluşumu, oligomerizasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonların birçoğu ER’de gerçekleştirilir (Düzgün ve ark., 2012).

ER, hücredeki organeller ile sürekli iletişim halinde olup, hücredeki düzensizlik ya da stres durumunda bu süreçleri düzenler. Böylece hücresel dengeyi korumada önemli bir görevi yerine getirmektedir (Moon ve ark., 2018).

2.4.1. Endoplazmik Retikulum Stresi (ERS)

Ca^{2+} dengesizliği, hipoksi, amino asit veya glikoz yoksunluğu, oksidatif stres ve protein katlanmasındaki bozulmalar nedeniyle Endoplazmik Retikulum (ER) lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir ve bu durum ER

stresi (ERS) olarak isimlendirilmektedir (Song ve ark., 2018; Díaz-Bulnes ve ark., 2020).

Hücrede ER'nin protein katlamasında sınıra ulaşıldığında veya katlanacak proteinler için gerekli enerji sağlanamadığında yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikimi meydana gelir (Sisinni ve ark., 2019). Bu durumda, ER meydana gelen strese cevap olarak, homeostazı sağlayabilmesi için ER transmembranında bulunan, inozitol gerektiren enzim 1 α (IRE1 α), transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK) olarak adlandırılan 3 ER stres sensör proteinleri aktifleşir ve katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan sinyal yolağını aktive eder (Le Reste ve ark., 2016).

UPR, ER'de meydana gelen stresi denetleyen ve yanıt veren çok sayıda alt basamağı olan moleküler bir sistemdir (Mou ve ark., 2020). UPR, ER'de biriken yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinleri belirleyerek ER'deki protein dengesini sağlamayı hedefleyen ve hücresel cevabı başlatan önemli bir sinyal sistemidir (Charonis ve ark., 2017). UPR, hücrede yaptığı değişiklikler sonucunda, hücrenin kaderini belirleyerek hayatta kalmasına ya da ölüme gitmesine neden olur (Sisinni ve ark., 2019).

ER stresi sonucunda hücrede meydana gelen hasar UPR sinyali ile kurtarılır ve fazla ER stresi durumunda UPR yetersiz kalırsa hücre apoptoza gider (Díaz-Bulnes ve ark., 2020).

Bu amaçla UPR ile hücredeki ER stres durumunda, geçici olarak translasyon inhibe edilerek katlanacak protein miktarı azaltılır, proteinlerin doğru katlanması için katlanmaya yardımcı enzimlerin ve şaperonların transkripsiyonu artırılarak doğru katlanmaları sağlanır, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin yıkılması için hücrelerin bozunma kapasitesi artırılarak bunların hücreden temizlenmesi sağlanır ve bunların sonucunda UPR ER'nin homeostazını geri kazanmasına yardımcı olur (Le Reste ve ark., 2016; Schwarz ve Blower, 2016). Özetle, UPR ile ER lümeninde bulunan üç ER stres sensörü proteinleri, PERK, IRE1 ve ATF6 aktif edilir ve hücre stresine cevap oluşturulur (Mou ve ark., 2020).

UPR, onkogeneze, hipoksi, glikoz yoksunluğu ve kemoterapinin neden olduğu çeşitli iç ve dış stres koşullarında hücre sağkalımını destekleyen önemli bir mekanizmadır. UPR kanserde kemoterapötiklere karşı dirence neden olarak önemli bir rol oynar. UPR'nin hedeflenmesi ya UPR sağkalımını inhibe ederek ya da ER stresini artırarak iki yol ile sağlanabilir. Bu yüzden tümör hücrelerinde var olan ER stresi koşullarını ortaya

çıkarmak ve hücreyi ölüme götürmek için umut verici terapötik stratejiler geliştirilmiştir (Peñaranda-Fajardo ve ark., 2019).

2.4.2. Endoplazmik Retikulum Stres Sensörleri

Endoplazmik Retikulum Stres sensörleri olan IRE1 α , ATF6 ve PERK normal şartlarda, ER transmembranında bulunan üç ER stres sensör proteinlerinin tamamı, ER’de BiP (bağlayıcı immünoglobulin proteini) olarak da bilinen glikozla düzenlenen protein 78 (GRP78) bağlı haldedir ve böylece ER stres sensörleri inaktif halde tutulur. Glikozla düzenlenen protein (BiP / GRP78), ER lümeninde bulunan bir şaperondur ve ER stresinde görev alan merkezi bir sensör olarak görev yapar (Peñaranda-Fajardo ve ark., 2019). ER stresi durumunda GRP78 ve üç sensör (IRE1 α , ATF6 ve PERK) arasındaki ilişki bozulur ve GRP78 üç transmembran reseptöründen ayrılır. GRP78’in ayrılmasıyla birlikte üç sensör (IRE1, ATF6 ve PERK) aktifleşerek UPR sinyal iletimini başlatır (Şekil 5) (Song ve ark., 2017).

2.4.2.1. Protein Kinaz R-benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz (PERK)

Protein kinaz R (PKR) benzeri endoplazmik retikulum kinaz veya ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2-alfa kinaz 3 (EIF2AK3) olarak bilinen PERK tip I transmembran proteinidir ve ER membranında lokalizedir (Ramirez ve ark., 2019; Düzgün ve ark., 2012).

Katlanmaya yardımcı olması ve aktifleşmesi için PERK’in GRP78’den ayrılması gerekir. PERK aktifleştiğinde, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2a (eIF2a)’yı fosforilleyerek mRNA translasyonunun baskılanmasına yol açar ve böylece ER’de hücrenin protein yükü azaltılarak katlanmamış proteinlerin düzeltilmesi sağlanmış olur. Sonuç olarak, PERK sinyal yolunun aktivasyonu, ER stres cevabında protein sentezinin inhibisyonu ile hücreleri korur ve hücre yaşamını düzenler (Díaz-Bulnes ve ark., 2020). Fakat ER stres durumu arttığında, PERK, ATF4 ve CHOP’un ifadelerinin artmasını sağlar ve hücre ölüme gider (Lei ve ark., 2017).

2.4.2.2.İnozitol Gerektiren Enzim 1 α (IRE1 α)

IRE1, Endoplazmik retikulumdan çekirdeğe sinyalleşme 1 (Ern1) geni tarafından kodlanan, ER tip I transmembran proteini olup ER’de lokalizedir. IRE1’in protein serin/treonin kinaz ve endoribonükleaz (RNaz) aktiviteleri vardır. IRE1 α ve IRE1 β olmak üzere iki IRE1 izoformu vardır ve IRE1 α formu daha çok ifade edilir. ER

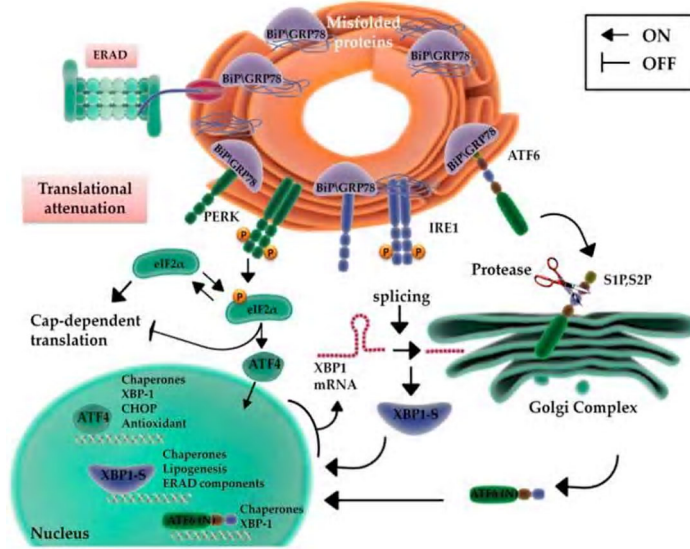
stresinde, IRE1α GRP78'den ayrılarak aktifleşir (Huang ve ark., 2019; Moore ve Hollien, 2015).

Aktifleşen IRE1, ER'de nükleaz işlevi ile düzenlenmiş IRE1'e bağlı bozunma (RIDD) yoluyla ribozomal ilişkili mRNA'yı bozar. Bu bozulma ile, translasyon ve katlanmamış proteinlerin ER'de birikmesi önlenir (Ramirez ve ark., 2019).

2.4.2.3. Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6)

ATF6, tip II transmembran proteindir. ATF6, ATF6α ve ATF6β olmak üzere iki izoforma sahiptir, bunlardan ATF6α UPR'yi etkinleştirmede görevlidir (Díaz-Bulnes ve ark., 2020).

ATF6, ER stresi oluştuğunda, GRP78'den ayrıldıktan sonra golgi'ye taşınır ve site-1 proteaz (S1P) ve site-2 proteaz (S2P) ile ayrılmasının ardından aktif edilir. Aktifleşen transkripsiyon faktör ATF6 çekirdeğe gider ve lipid biyosentezi, ERAD proteinlerinin, GRP78, GRP94, p58IPK, protein disülfidizomeraz, CHOP, kalretikulin, Herp ve XBP1 gibi proteinleri kodlayan genlerin ifadelerini arttırır (Díaz-Bulnes ve ark., 2020; Ramirez ve ark., 2019; Seydel ve Aksoy, 2012).



Şekil 5. ER stresi sırasında UPR ve ER stres sensörlerinin aktivasyonu (Sisinni ve ark., 2019).

2.4.3. Glioblastoma multiform (GBM) ve Endoplazmik Retikulum Stresi (ERS)

Tümör hücrelerinin olumsuz şartlara dayanması UPR sinyali ile ilgilidir. Bu nedenle kanser hücrelerini yok etmek için UPR'yi hedef almak önemli olabilir. UPR, tümör hücrelerinin hayatta kalması için çalışır. UPR kansere karşı uygulanan tedavinin etkisini

azaltıp, tedavi direnci oluşturan mekanizma da oluşturabilir. ERS'ye cevapta otofaji ve proteazom önemli olduğundan dolayı bu yolları da hedef almak faydalı sonuçlar doğurabilir (Nagelkerke ve ark., 2015).

Genel sinyal yolları iyi tanımlanmış olsa da ERS'yle uyarılan apoptoz mekanizması hala iyi anlaşılabilmiş değildir. ERS ile kanser hücrelerinde apoptozun devamı ve gelişiminin bağlantılı olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle hastalıkların patolojisinde ERS ile uyarılan hücre ölümü yeni bir apoptotik yoldur. Böyle koşulların gelişimini durdurmak veya tedavi edebilmek için ERS ile uyarılan apoptozun mekanizmasını anlamak önemlidir. ERS ile bağlantılı apoptoz hakkında hangi kaspazların hücre ölümüyle bağlantılı olduğu, hücrelerin geriye dönmeme noktasını neyin belirlediği gibi birçok cevaplanamamış sorular bulunmaktadır. Bundan dolayı son yıllarda ERS ile bağlantılı apoptoz çalışmalarında artış görülmektedir (Szegezdi ve ark., 2006).

GBM, meme kanserleri, akciğer kanseri, lenfoma, miyelom ve adeno karsinomlar dahil olmak üzere birçok insan tümörlerinde güçlü bir ERS yanıtı olan UPR sinyalizasyonunun aktif olduğu bildirilmiştir. ER stresi çoğunlukla ileri evrelerdeki kanser tipleriyle ve kemoterapi direnci ile ilişkilidir. Kanser hücrelerinden, özellikle de GBM, UPR'nin hayatta kalma sinyallerini, içsel ve dışsal streslerle başa çıkabilmek ve apoptozdan kaçmak için kullanmaktadır. Ayrıca invazyon, migrasyon ve anjiyogenez için kullandığı da kabul edilmektedir. GBM'de ERS'ne karşı aktifleşen UPR, zorlu koşullarda hücrenin sağkalımı için çok önemlidir. GBM hücreleri, ER stresini avantaja çevirip kontrol altında tutarak, UPR ile homeostaziyi geri sağlayıp tümörün hayatta kalmasını ve dolayısıyla çoğalmasını elverişli hale getirmektedir. (Cubillos-Ruiz ve ark., 2017; Obacz ve ark., 2017). Bununla beraber, UPR sinyalinin uzun süreli aktivasyonu apoptoza neden olmaktadır. GBM'de UPR ve ER stres sinyalinin aktif olmasının tedaviye karşı direnç gelişmesine yol açtığı ve UPR aktivasyonunda görev alan GRP78'in GBM hücrelerinde fazla ifade edilmesi ile kanserin ilerlemesine yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca, GBM hücrelerinin UPR aracılığıyla transkripsiyon faktörlerini indükleyerek hücrelerin hayatta kalmasını sağladığı ve ölüm mekanizmalarını kontrol ettiği bildirilmiştir (Obacz ve ark., 2017).

Normal yetişkin beyin hücrelerinde PERK ve GRP78'in düşük oranda ifade edildiği, GBM hücre hatları ve GBM hastalarında ise GRP78'in yüksek seviyelerde ifade

edildiği gösterilmiştir. Yine başka bir çalışmada, ER stres durumunda GBM hücrelerinde, PERK seviyelerinin arttığı ve GRP78'in aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Tsai ve ark., 2017).

Kanser hücreleri UPR ile stres şartlarında hayatta kalmayı başarırlar. GBM'nin ilerlemesinde de UPR'nin önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. Hatta, GBM hasta örneklerinde UPR sinyal seviyelerinin yüksek olması GBM hücrelerinin tümör mikroçevresinin zorlu şartlarına dayanmak için UPR yolunu kullandığı görüşünü desteklemektedir. Yapılan diğer çalışmalarda da ERS sensörlerinden; IRE1 α yolunun GBM'de tümör büyümesine, migrasyona ve anjiyogeneze katkı sağladığı, PERK yolunun GBM hücrelerinde tedaviye yanıtın ve metabolizmanın kontrolünde yer aldığı, ATF6 yolunun da GBM'de radyoterapi direncine neden olduğu bildirilmiştir. (Peñaranda Fajardo ve ark., 2016).

2.6.Forkhead (Fox) Transkripsiyon Faktörleri

Forkhead (fkh) geni ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de mutagenез çalışmasında keşfedilmiştir ve sonrasında mayalar ve insanlarda Fox genleri olarak adlandırılan bir dizi gen tanımlanmıştır. Fkh proteinleri winged heliks DNA bağlanma bölgeleri içermektedir ve bu bölgelere 'forkhead kutusu (box)' denilmiştir (Golson ve Kaestner, 2016).

Fox transkripsiyon faktörleri, karaciğer, pankreas, yumurtalıklar, akciğer, böbrek, bağırsak, prostat, beyin, tiroid, iskelet ve kalp kası, damar doku gibi dokuların farklılaşması, bakımı ve işlevi için gereklidir (Zhu, 2016). FOX transkripsiyon faktörleri, metabolizma, gelişme, çoğalma, farklılaşma, apoptoz, göç, istila olmak üzere birçok biyolojik süreçlerde önemli roller oynarlar (Wang ve ark., 2018).

Fox transkripsiyon faktörleri sayılarının çok olmasından dolayı dört aileye ayrılabilir: FoxA çoklu hücre tiplerinin farklılaşmasında, FoxM1 hücre döngüsü kontrolünde, FoxO metabolizma ve uzun ömürlülükte ve FoxP konuşma ediniminde rol alırlar (Golson ve Kaestner, 2016).

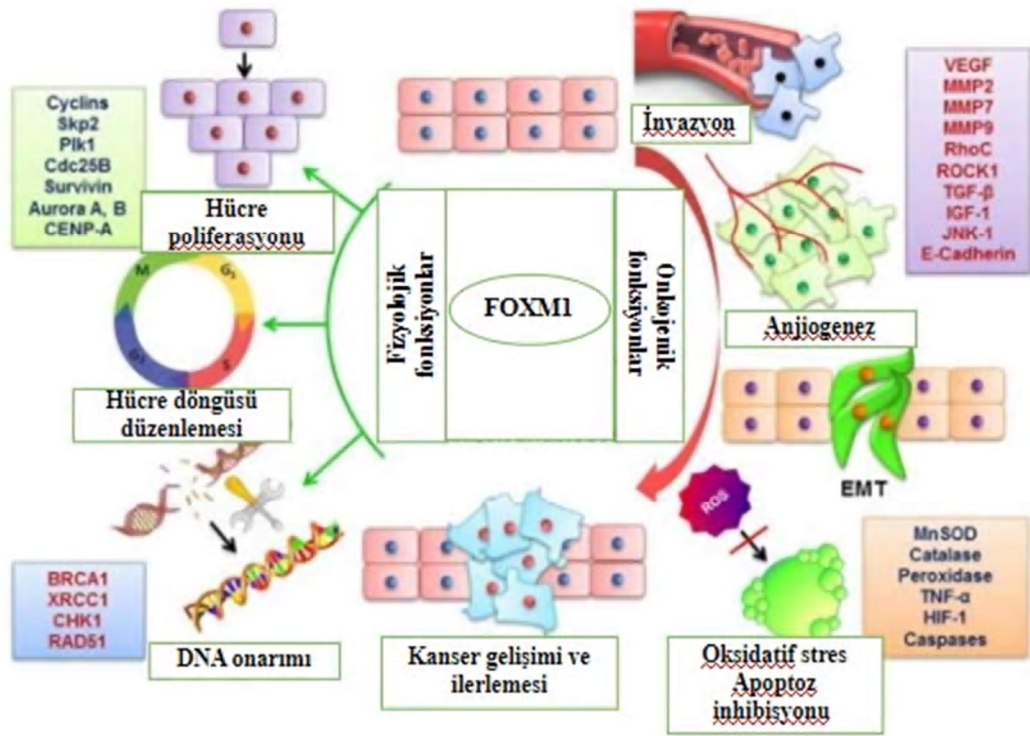
2.6.1.Forkhead box protein M1 (FOXM1) transkripsiyon faktörü

Forkhead box protein M1 (FOXM1), evrimsel olarak korunan Fox transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. FoxM1'nin, hücre döngüsü ilerlemesinde G1 / S, G2 / M fazına geçişinde düzenleyici işlevi ile önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. FOXM1, hücre

proliferasyonunda ve kanser büyümesinde birçok rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür (Li ve ark., 2012; Wang ve ark., 2015; Tao ve ark., 2020).

FoxM1 geni, 12.kromozomda kısa kolun 13.33 bandında yer alır ve 10 ekzondan oluşur. FoxM1a, FoxM1b ve FoxM1c olmak üzere üç farklı FoxM1 proteini vardır. FoxM1a'nın transkripsiyonel baskılayıcı olduğu, FoxM1b ve FoxM1c'nin de transkripsiyonel aktivatör olduğu gösterilmiştir (Koo ve ark., 2012; Li ve ark., 2012)

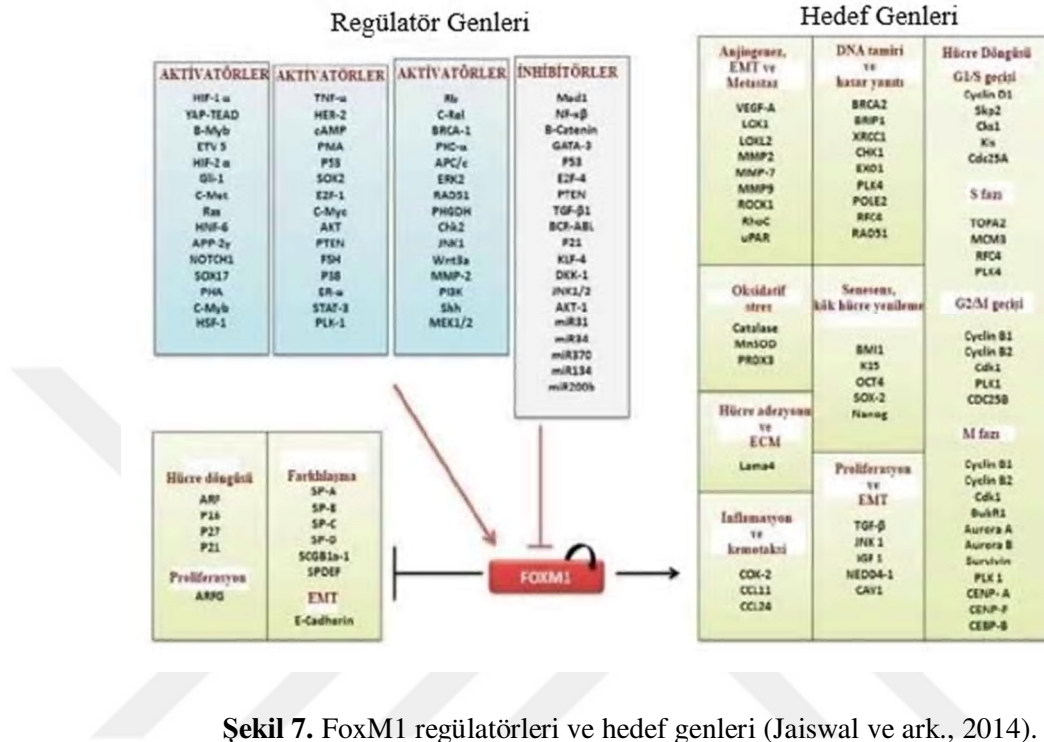
FoxM1, fizyolojik süreçlerde olumlu rol oynarken, kanser hücrelerinde onkojenik süreçlerde rol oynar (Şekil 6) (Koo ve ark., 2012; Nandi ve ark., 2018).



Şekil 6. FoxM1, fizyolojik ve onkojenik sürece aracılık eder (Nandi ve ark., 2018).

FoxM1 proteini çok sayıda hedef genin ifadesinin düzenlenmesinde rol alır. G1 / S, G2 / M ilerlemesi, kromozomal ayrılmada ve sitokinezde gerekli olan hücre döngüsü genlerinin transkripsiyonunu düzenlemede görev alır. FOXM1 ayrıca; farklılaşma, senesens, hücre yenilenmesi, hücre proliferasyonu, DNA hasar yanıtı, oksidatif stresin zayıflaması, epitelyal mezenkimal geçiş, anjiyogenez, metastaz ve pre-metastatik niş gibi birçok geni hedef almaktadır (Şekil 7) (Jaiswal ve ark., 2014; Zona ve ark., 2014). FOXM1 eksikliğinde; DNA kırıkları, poliploidi, anöploidi, sitokinez kusurları,

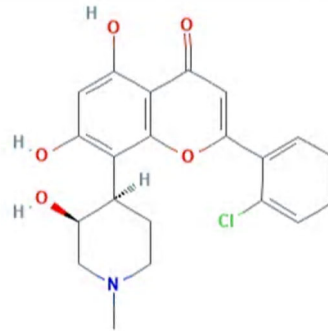
kromozom yanlış gruplaşması gibi anormallikler ortaya çıkmaktadır (Jaiswal ve ark., 2014).



Şekil 7. FoxM1 regülâtörleri ve hedef genleri (Jaiswal ve ark., 2014).

2.7.Flavopiridol

Flavopiridol, bir Hindistan bitkisi *Dysoxylum binectariferum*'dan türetilen ve ilk siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan yarı sentetik bir flavonoiddir (Şekil 8). Flavopiridol özellikle CDK'lerin aktivite bölgesi için ATP'yle rekabet ederek G1 / S veya G2 / M'de CDK'ler yoluyla hücre döngüsünün ilerlemesini belirgin bir şekilde bloke ettiği ve böylece apoptozu indüklediği bildirilmiştir. (Tan ve ark., 2004; Shao ve ark., 2016; Zocchi ve ark., 2018; Saisomboon ve ark., 2019; Dogan Turacli ve ark., 2019). Ayrıca, Flavopiridol, apoptozu indüklemesi ve CDK'lerin neredeyse tamamını inhibe etmesiyle tanımlanmış olan tek bileşiktir. (Sedlacek ve Czech, 1996).



Şekil 8. Flavopiridolün moleküler yapısı

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5287969#section=2D-Structure>, Erişim tarihi: 11.11.2020)

2.8.Glioblastoma multiform (GBM) Hücre Hatları

İnsan tümöründen türetilmiş olan hücre hatları; sınırsız çoğalabilmeleri, kullanımlarının kolay olması ve yüksek tekrarlanabilirliği ile in vitro kanser araştırmaları için vazgeçilmez kaynaklardır.

2.8.1.U-87 MG(ATCC® HTB-14™)

U87MG hücre hattı hasta orijini bilinmeyen MSS (Merkezi Sinir Sistemi) kökenli insan glioblastoma hücre dizisidir. 1966-1979 yılları arasında donmuş stoklardan alınıp daha sonra ATCC'ye aktarılan bu hücreler % 10 fetal sığır serumu ve antibiyotiklerle desteklenerek medyumda çoğaltılmıştır (Allen ve ark., 2016).

2.8.2.IDH mutant-U-87(ATCC® HTB-14IG™)

IDH mutant-U-87 hücre hattı, U-87MG hücre hattından türetilen glioma olup IDH1R132H mutant izojenik hücre hattıdır. IDH heterozigot mutasyonu, CRISPR / Cas9 gen düzenleme teknolojisi kullanılarak ATCC'de oluşturulmuştur. IDH mutant-U-87 hücre modeli, kanserde farklılaşma, tümörün oluşumu, ilaç geliştirilmesi için anti-kanser bileşiklerinin taranmasında kullanılan mekanizmaları aydınlatmak amacıyla klinik teşhis için in vitro hücre tabanlı bir araçtır (https://www.lgcstandards-atcc.org/Global/Products/HTB-14IG.aspx?geo_country=tr#characteristics, Erişim tarihi: 29 Kasım 2020).



3.GEREÇ ve YÖNTEM

TYL-2019-9506 kodlu bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenip, projenin deneysel aşamaları Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. GEREÇ

3.1.1.Kullanılan cihaz, alet ve sarf malzemeler

Tablo 2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihaz	Amacı
-80°C Derin dondurucular	Hücrelerin dondurulması, numunelerin saklanması
-20°C Derin dondurucular	Numunelerin ve sarf malzemelerin saklanması
Azot tankı	Hücrelerin dondurulması
Buzdolabı	Sarf malzemelerin saklanması
CO ₂ İnkübatörleri	Hücre kültür ortamı
Steril Kabin Lamin Air Class II	Hücre kültür ortamı
Glomax ELISA Reader	Hücre canlılık testi,MTS
Santrifüj	Santrifüj ve hücre kültürü
İnvert Mikroskop	Hücrelerin görüntülenmesi
Floresan Mikroskop	Höst boyama analizinde
Tek kanallı pipet seti	Hücre kültür çalışmalarında
Su banyosu	Hücre kültür çalışmalarında
Hassas terazi	Tartma işleminde
Pipet tabancası	Hücre kültür çalışmalarında
Elektroforez Tankı	Western Blot
BioRad, ChemiDoc Görüntüleme Sistemi	Western Blot

Tablo 3. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Kullanılan Sarf Malzemeleri	Amacı
DMEM F12 Medya	Besiyer hazırlanmasında
Fetal Bovine Serum	Besiyer hazırlanmasında
Penicillin-Streptomycin	Besiyer hazırlanmasında
L-glutamine	Besiyer hazırlanmasında
Trypsin-EDTA	Hücre pasajlamada
25'lik Ve 75'lik Hücre Kültür Flaskı	Hücrelerin çoğaltılacağı kültür kapları
6 Kuyucuklu Hücre Kültür Plakaları	Klonojenik ve migrasyon tespit için kullanılan ekim kapları
96 Kuyucuklu Hücre Kültür Plakaları	Sitotoksikite tespit için kullanılan ekim kapları
Flavopiridol	Hücre kültürü
Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin (DPBS)	Hücre kültürü
MTS	Hücre canlılık testi
PMS	Hücre canlılık testi
DMSO	Hücre kültürü
15 ml'lik ve 50 ml'lik Falcon Tüp	Hücre kültürü
Cryo Tüp	Hücre dondurma
5,10 ve 25 ml'lik Serolojik Pipet	Hücre kültürü
Thoma Lami	Hücre sayımı
Höst (Hoechst) boyası	Morfolojik hücre ölümü analizinde
Cristal violet	Klonojenik test
Restore Western Blot Stripping Buffer	Western Blot
Ready Gel Tris-HCl Gel	Western Blot
Western ECL Substrate	Western Blot
Protein Ladder	Western Blot
DC Portein Assay Reagent Kit	Western Blot
Phosphatase Reaction Buffer	Western Blot
Protease İnhibitör Coctail	Western Blot
Thick Blot Paper-Filter Paper	Western Blot
Cell Lyzis Buffer	Western Blot
Sodium Florür	Western Blot

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

Sunulan tez çalışmamızda GBM hücre hattı olarak, U-87 MG(ATCC® HTB-14™) ve IDH mutant-U-87(ATCC® HTB-14IG™) kullanıldı. Hücreler ATCC (American Type Culture Collection) firmasından satın alındı ve çoğaltılarak -196°C'de azot tankında muhafaza edildi.

3.2.1.1.Besiyer hazırlama

IDH mutant-U-87 ve U-87 MG hücre hatlarının çoğaltılması, pasajlanması ve dondurulması için besiyer olarak Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

kullanıldı. Hücrelerin besiyeri (DMEM F12, 500 ml) içerisine, 50 ml fetal sıgır serum (FBS, %10), 5 ml L-glutamin (%1) ve 5 ml Penisilin-Streptomisin (%1) ilave edilerek hazırlandı. Tüm işlemler steril şartlarda laminar air flow kabin içerisinde yapıldı.

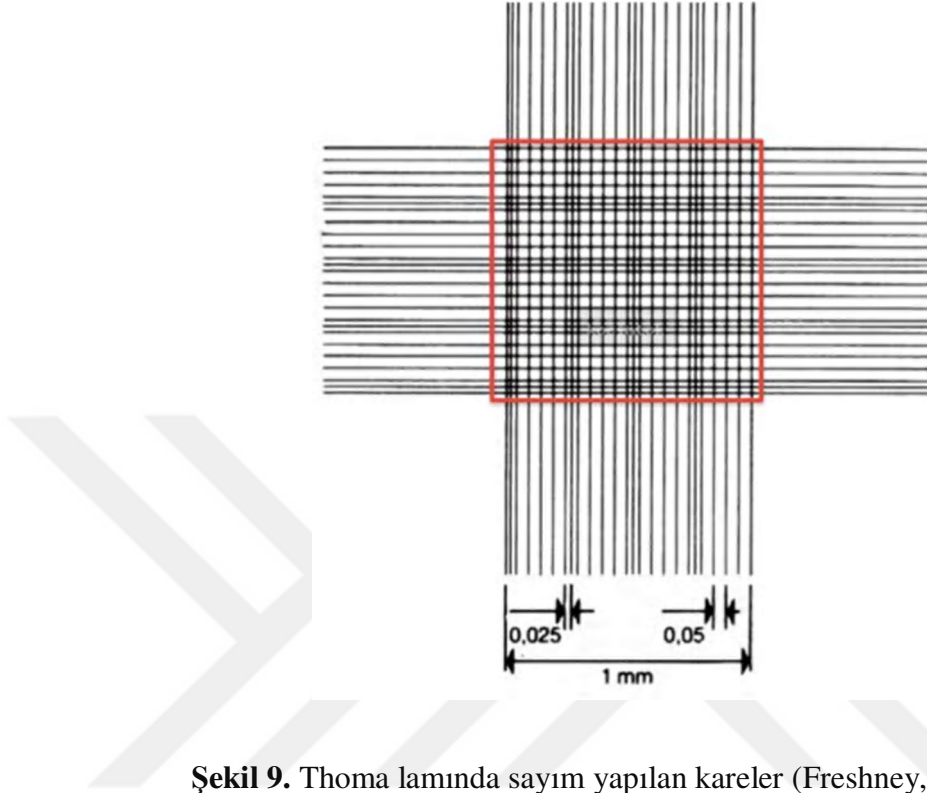
3.2.1.2.Hücre pasajlama

Çalışmamızda kullanılacak hücreler uygun büyüme besiyeri kullanılarak 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı ve hücreler % 70-80 yoğunluğa ulaştıncaya kadar pasaj işlemi yapıldı. Hücre kültür işlemleri Laminar air flow içinde steril bir ortamda steril malzemeler kullanılarak yapıldı. Pasajlama için uygun miktarlarda medya içeren kültür flasklarına uygun miktarda hücreler çoğaltılması için ilave edilerek inkübatöre kaldırıldı. Daha sonra çoğalan hücreler tripsin kullanılarak yapıştığı kültür flaskının yüzeyinden kaldırıldı ve kalkan bu hücreler, steril tüplere transfer edildi, üzerine uygun miktarda medya eklendi ve santrifüj yapıldı. Sonra süpernatant atıldı, dipte kalan pellet medya ile karıştırıldı ve daha sonra içinde medya bulunan yeni hazırlanmış kültür flasklarına uygun miktarlarda konuldu ve tekrar çoğaltılması için inkübatörde inkübe edildi.

3.2.1.3.Hücre sayımı

Hücre kültürü deneylerinde kullanılacak olan hücre sayısını saptamak için hücre sayım işlemi yapıldı. Hücre sayımı için thoma lamı kullanıldı. Bu lam yardımıyla mikroskop altında yapılan sayımda 0,1 mm³ hacimde 1 ml'deki hücre sayısı belirlendi. Aşağıda thoma lamında sayım yapılan yüzey gösterilmiştir (Şekil 9) (Freshney, 2000). Thoma lamının üzerine lamel konuldu ve lamda bulunan iki bölmeye de 1 ml'de çözünen hücrelerden 10 µl eklendi. Kırmızı işaretli alanda bulunan hücreler mikroskop altında sayıldı ve aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı hesaplandı.

1 ml'deki hücre sayısı = sayılan bölgelerin ortalama sayısı $\times 10^4$



Şekil 9. Thoma lamında sayım yapılan kareler (Freshney, 2000).

3.2.1.4. Hücreleri Dondurma

Hücreler pasaj işlemleri sonrası bazı değişikliklere uğramaktadır. Bu nedenle ihtiyaçtan fazla sayıdaki hücreler daha sonra kullanılmak üzere stok amaçlı donduruldu. Hücreler kullanılmak için çözündüğünde canlılıklarının iyi olması ve kullanılması için dondurma işlemi uygun şartlarda yapılmalıdır; bu amaçla hücrelerin dondurulma aşamasında zarar görmesini önlemek ve hücre içi metabolik aktiviteyi durdurmak için DMSO kullanıldı. Önceden medyum içerisinde çözdürülen hücrelere DMSO eklendi ve hücreler önce -80°C'de daha sonra -196°C'lik sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.2.2. Flavopiridol ile hücrelerin muamele edilmesi

3.2.2.1. Flavopiridolün hazırlanması

Çalışmamız için ticari olarak satın alınan flavopiridol firmanın önerisi doğrultusunda uygun çözelti kullanılarak solüsyon haline getirilip hazırlanmıştır. Flavopiridol, Sigma-Aldrich (25mg) firmasından temin edildi. Toz halinde olan flavopiridol distile suda vorteks yardımıyla çözülerek stok solüsyon haline getirildi ve 2-8°C koşullarında

saklandı. Daha sonra deneylerde kullanılmak üzere istenilen konsantrasyonlar için stok flavopiridol solüsyonundan uygun miktarda alınarak FBS (-) medya ile seyreltme işlemi yapıldı.

3.2.3.MTS Analizi

3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4- sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) analizi hücre canlılığını tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir (Hamurcu ve ark., 2018, 2019; Ünal ve ark., 2020). Bunun için U87 ve IDH mutant U87 hücreleri uygun miktarda medyum içeren 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyuda 100 µl besiyeri içinde 1500 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Sonra hücreler 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 ve 400 nM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat flavopiridol ile muamele edilerek 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Kontrol grubu olarak herhangi bir uygulama yapılmayan (muamelesiz) hücreler kullanıldı. Daha sonra uygun zamanlarda hücrelerin inkübasyonları sonlandırılarak hücrelerin canlılık oranlarını belirlemek için her bir kuyucuğa 20 µl MTS/PMS solüsyon karışımından eklendi ve sonra ELISA reader'da 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Bu işlemler üç kez tekrarlandı. Ölçüm sonuçlarına göre hücrelerin %50'sinin öldüğü (IC: %50) konsantrasyon ve zaman aralığı belirlendi (Tablo 4) ve tabloda belirlenen zaman aralığı ve doz bundan sonraki tüm deneylerimizde kullanıldı.

Tablo 4. U87 ve IDH mutant U87 hücre hatları için belirlenen flavopiridol konsantrasyonları.

	U87 IC: %50	IDH MUTANT-U87 IC: %50
24 saat	300-400 nM	300-400 nM
48 saat	100-200 nM	100-200 nM
72 saat	50-100 nM	50-100 nM

3.2.4.Klonojenik testi

Klonojenik testi, kanser hücrelerinin klon oluşturma yeteneklerini test etmek için kullanılan bir analiz yöntemidir. U87 ve IDH mutant-U87 hücreleri uygun miktarda medyum içeren 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Hücreler inkübasyonlarının 48.saatinde 5,10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 150 ve 200 nM konsantrasyonlarda flavopiridol ile muamele edilerek 37°C %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücrelerin çoğalması takip edildi ve inkübasyonun 10-12. gününde kültür sonlandırıldı. Daha sonra hücreler metanol içeren %5'lik kristal viyole ile fikse edilip boyandı. Boyama sonrası hücreler distile su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Sonrasında oluşan koloniler sayıldı ve fotoğraflandı.

3.2.5.Migrasyon analizi

Migrasyon analizi, kanser hücrelerinin göç etme yeteneklerini test etmek için kullanılan bir yöntemdir (Hamurcu ve ark., 2016). U87 ve IDH mutant-U87 hücreleri uygun miktarda medyum içeren 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 150.000 hücre olacak şekilde ekildi. Sonra hücreler MTS analizi ile belirlenen konsantrasyon ve zaman aralığında (24. saatte 300, 400 nM, 48. saatte 100, 200 nM ve 72. saatte 50-100 nM) flavopiridol ile muamele edilerek 37°C %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, 20 µl'lik steril bir pipet ucu kullanılarak her kuyucukta tek tabakada bir çizik oluşturuldu. Daha sonra kalkan hücreleri uzaklaştırmak için kuyucuklar medya ile yıkandı ve yeni medya eklendi. Çizilen alandaki hücrelerin, mikroskop kullanılarak 0., 24. ve 48. saatlerde görüntüleri alındı ve her bir zaman noktasında yaranın ön kenarındaki hücreler tarafından kat edilen mesafe ölçüldü. Sonuçlar yüzde göç olarak ifade edildi.

3.2.6.Western Blot Analizi

Western blot analizi hücrelerde hedefe yönelik spesifik protein seviyelerini analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir (Hamurcu ve ark., 2017).

Western blot analizinin aşamaları;

- Deneyin kurulması
- Hücrelerin toplanması, lizis aşaması
- Protein konsantrasyonlarının hesaplanması
- Proteinlerin jele yüklenmesi ve Elektroforez

- Jelden Membrana Transfer
- Proteinlerin ekspresyon analizi

3.2.6.1.Deneyin kurulması

U87 ve IDH mutant-U87 hücreleri uygun miktarda medyum içeren 25 cm²'lik flasklara her flaskta 350.000 hücre olacak şekilde ekildi. Sonra hücreler MTS analizi ile belirlenen konsantrasyon ve zaman aralığında (24. saatte 300, 400 nM, 48. saatte 100, 200 nM ve 72. saatte 50-100 nM) flavopiridol ile muamele edilerek 37°C %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Zaman aralığı dolunca kültür sonlandırıldı ve hücreler toplandı.

3.2.6.2.Hücrelerin toplanması ve lizis aşaması

Her bir flasktan hücre besiyeri uzaklaştırıldı, 2 ml tripsin-EDTA eklendi ve 3 dk inkübatörde bekletildikten sonra 4 ml besiyeri eklenerek hücreler toplandı ve 15'lik falkonlara alınarak 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücreler lizis edildi.

Lizis işleminin amacı hücrelerin parçalanarak proteinlerin izole edilmesini sağlamaktır. Bu amaçla ticari olarak alınan 1 ml lizis solüsyonuna, 4 µl sodyum florür (NaF), 10 µl proteaz inhibitör ve 10 µl fosfataz inhibitör eklendi ve lizis solüsyonu hazırlandı. Toplanan hücrelere 80-100 µl lizis solüsyonu eklenerek hücreler lizis edildi.

3.2.6.3.Protein Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Protein konsantrasyon hesabı için ependorf tüplere 2 µl stok protein ve 12 µl dH₂O eklenerek proteinler seyreltildi. 96'lı plakalara seyreltme işlemi yapılan proteinlerden ve protein standartlarından 5'er µl dağıtıldı. Üzerine reagent A (980 µl) + reagent S (20 µl) karışımından 20 µl ve ardından reagent B (175 µl) eklendi. Daha sonra plaka 3 dk çalkalayıcıda bekletildi ve 750 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Ölçüm sonucuna göre her bir örnek için 40µg protein/40µl olacak şekilde hesaplama yapıldı.

3.2.6.4. Proteinlerin jele yüklenmesi ve Elektroforez

Her bir örnek için hesaplanan miktarlarda protein, loading buffer ve dH₂O ependorflara eklendi ve 40µg protein/40µl olacak şekilde jele yüklendi (Şekil 10). Daha sonra yürütme tamponu içerisinde elektroforez tankında 50 voltta 2-3 saat yürütülerek proteinlerin ayrışması sağlandı.



Şekil 10. Proteinlerin jele yüklenmesi

3.2.6.5. Jelden Membrana Transfer

Proteinlerin jelden PVDF membrana transferinde sünger-filtre kağıdı-membran-jel-filtre kağıdı-sünger olacak şekilde buz ve transfer solüsyonu içerisine yerleştirildi ve 24 voltta +4°C’de tüm gece boyunca transferi sağlandı. Ertesi gün membranlar transferden alınıp TBS-T + süt tozu ile 1,5 saat bloklandı ve TBS-T solüsyonu ile yıkama yapıldı.

3.2.6.6. Proteinlerin ekspresyon analizi

Membranlarda flavopiridolün ERS ile aktifleşen UPR yanıtında görev alan; GRP78 (Proteintech), PERK (Cell signaling), IRE1α (Cell signaling) ve CHOP (Proteintech) proteinlerinin ekspresyonları, DNA tamirinde rol alan PARP (Cell signaling) proteinin ve hücre çoğalmasında ve hücre döngüsünde görev alan onkogenik transkripsiyon faktörü FOXM1 (Cell signaling)’in ekspresyonlarına etkisini belirlemek için yukarıdaki hedefe yönelik primer antikörlerle muamele edildi. Primer antikoru membrana koymak için 7 ml TBS-T + 350 mg süt tozu hazırlandı ve primer antikör eklenip +4°C’de tüm gece çalkalayıcıda bekletildi. Sonrasında membran 3 kez TBS-T solüsyonu ile yıkandı ve sekonder eklenip 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi. Bir saatin sonunda

membranlar 3 kez TBS-T solüsyonu ile yıkandı ve ECL solüsyonu kullanılarak BIO-RAD (ChemiDoc MP Imaging System) görüntüleme cihazında görüntülendi. Yükleme kontrolü olarak β -aktin (Proteintech) kullanıldı. Daha sonrasında Image Lab programı ile bant yoğunlukları ölçüldü.

3.2.7.Morfolojik hücre ölüm analizi (Höst (Hoechst) boyama)

Höst boyama hücrelerde morfolojik olarak apoptotik değişimi belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Flavopiridol'ün apoptotik hücre ölümüne etkisini morfolojik olarak belirlemek için U87 ve IDH mutant U87 hücreleri uygun miktarda medyum içeren 6 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler MTS ile daha önceden belirlenen konsantrasyonda ve zamanda (24. saatte 300, 400 nM, 48. saatte 100, 200 nM ve 72. saatte 50-100 nM) flavopiridol ile muamele edildi. Sonra hücreler paraformaldehit ile fikse edilip PBS ile yıkandı ve höst boya ile boyanarak floresan mikroskopta görüntüleri alındı.

3.2.8.İstatistiksel Analiz

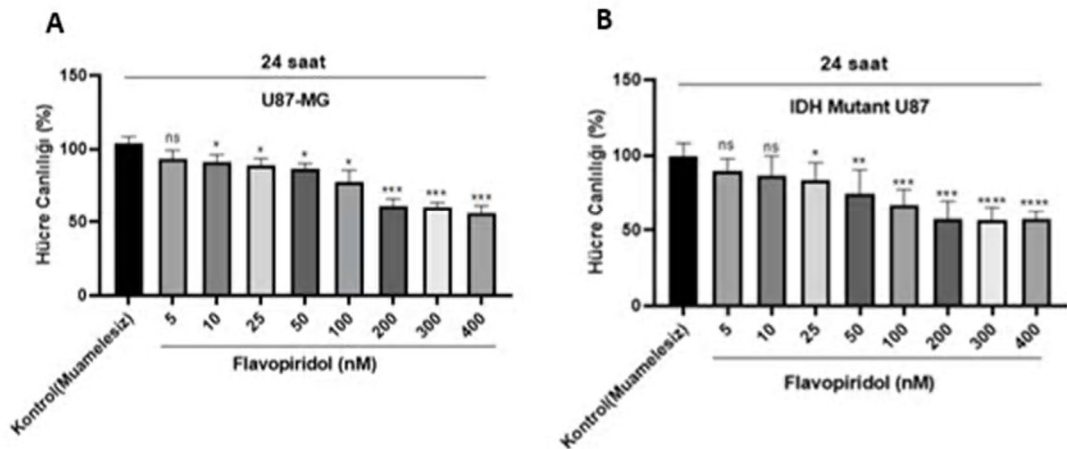
Tüm deneyler en az üç kez tekrarlandı ve elde edilen veriler Graphpad Prism 8.0 programı kullanılarak analiz edildi. Analizlerde Student t testi kullanıldı ve analiz sonuçlarına göre, $p < 0.05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Flavopiridolün GBM hücrelerinde proliferasyona/canlılığa etkisi

U87-MG ve IDH mutant U87 hücreleri 24, 48 ve 72 saat 5-400 nM arasında flavopiridol ile muamele edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolduğunda farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan flavopiridolün hücre canlılığına olan etkisi MTS analizi ile belirlendi.

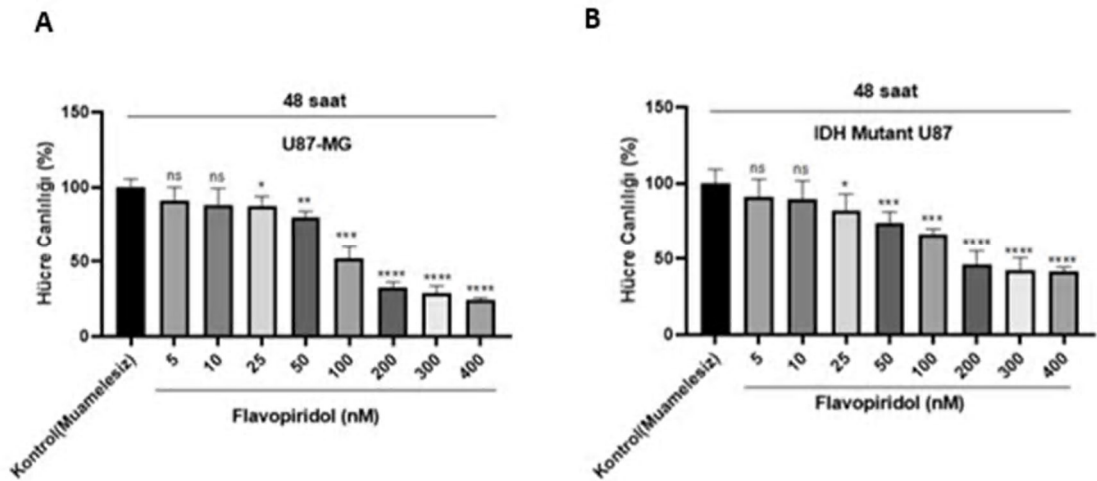
Yapılan analiz sonuçlarımıza göre 24 saat 5-400 nM arasında flavopiridol uygulanan; U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, hücre canlılığının kontrol hücrelerine kıyasla artan flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 11). 24 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 10-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 11A). 24 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 25-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 11B).



Şekil 11. 24 saat flavopiridol ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde proliferasyon oranı. A) 24 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 10-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu. B) 24 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu

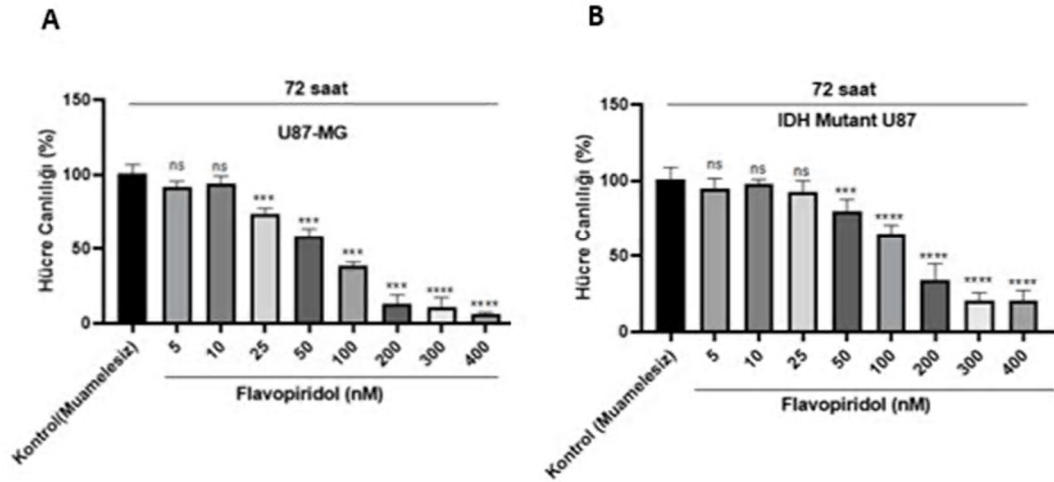
hücrelerine göre 25-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (ns: $p>0.05$; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$).

48 saat 5-400 nM arasında flavopiridol uygulanan; U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, hücre canlılığının kontrol hücrelerine kıyasla artan flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 12). 48 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 25-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 12A). 48 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 25-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 12B).



Şekil 12. 48 saat flavopiridolle muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde proliferasyon oranı. A) 48 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 25-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü. B) 48 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 25-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (ns (not significant): $p>0.05$; * $p<0.05$; ** $p<0.01$ *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$).

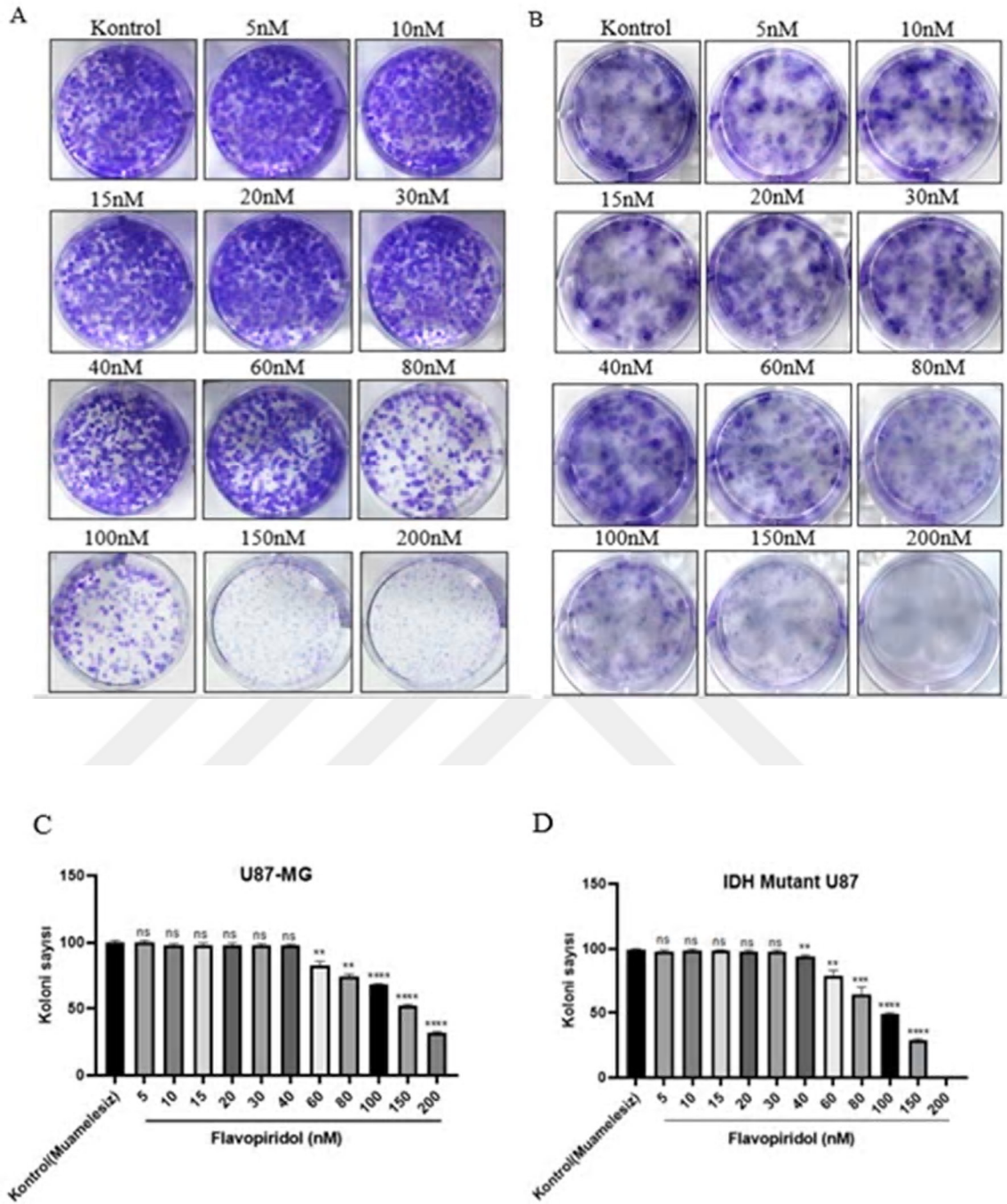
72 saat 5-400 nM arasında flavopiridol uygulanan; U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, hücre canlılığının kontrol hücrelerine kıyasla artan flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 13). 72 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 25-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 13A). 72 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 50-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 13B).



Şekil 13. 72 saat flavopiridolle muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde proliferasyon oranı. A) 72 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 25-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü. B) 72 saat 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre 50-400 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü (ns (not significant): $p > 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

4.2. Flavopiridolün GBM hücrelerinde klon oluşumuna etkisi

6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücreleri inkübasyonlarının 48. saatinde 5-200 nM arasında flavopiridol ile muamele edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolunca farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan flavopiridolün hücrelerin koloni oluşturma üzerine etkisini analiz etmek için kristal viyole ile boyanarak klonojenik test yapıldı. Yapılan analiz sonuçlarımıza göre 5-200 nM arasında flavopiridol uygulanan; U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, koloni oluşumunun kontrol hücrelerine kıyasla azaldığı, flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 14A, B). 5-200 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre koloni sayısında 60-200 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 14C). 5-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre koloni sayısında 40-200 nM konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma bulundu (Şekil 14D).

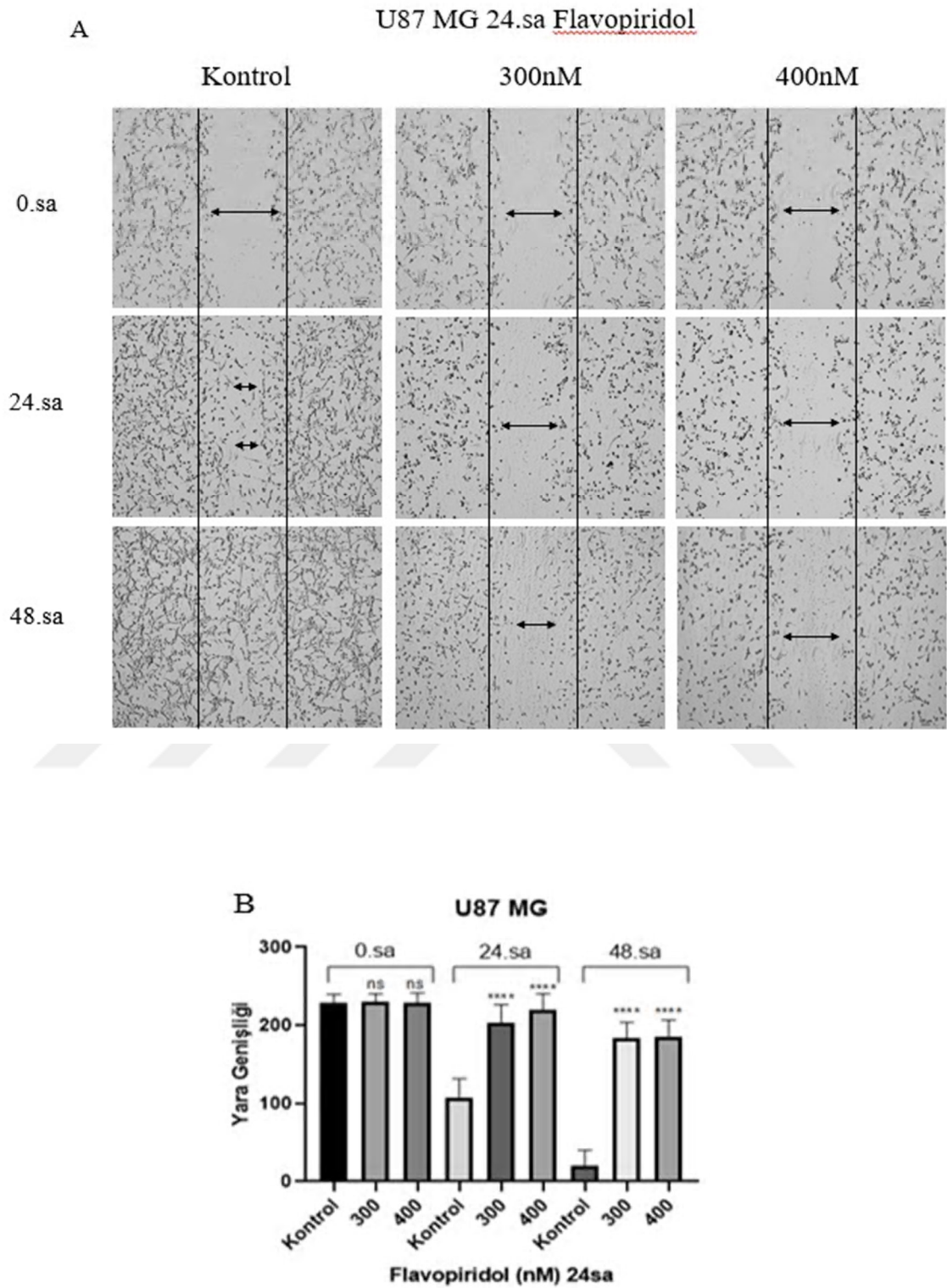


Şekil 14. Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde koloni oluşum oranı. A) 5-200 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. B) 5-200 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinin kristal viyole ile boyanmış görüntüleri. C) 5-200 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre 60-200 nM flavopiridol uygulanan hücrelerde önemli oranda koloni sayısının azaldığı bulundu. D) 5-200 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelere göre 40-200 nM flavopiridol uygulanan hücrelerde önemli oranda koloni sayısının azaldığı bulundu (ns (not significant): $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

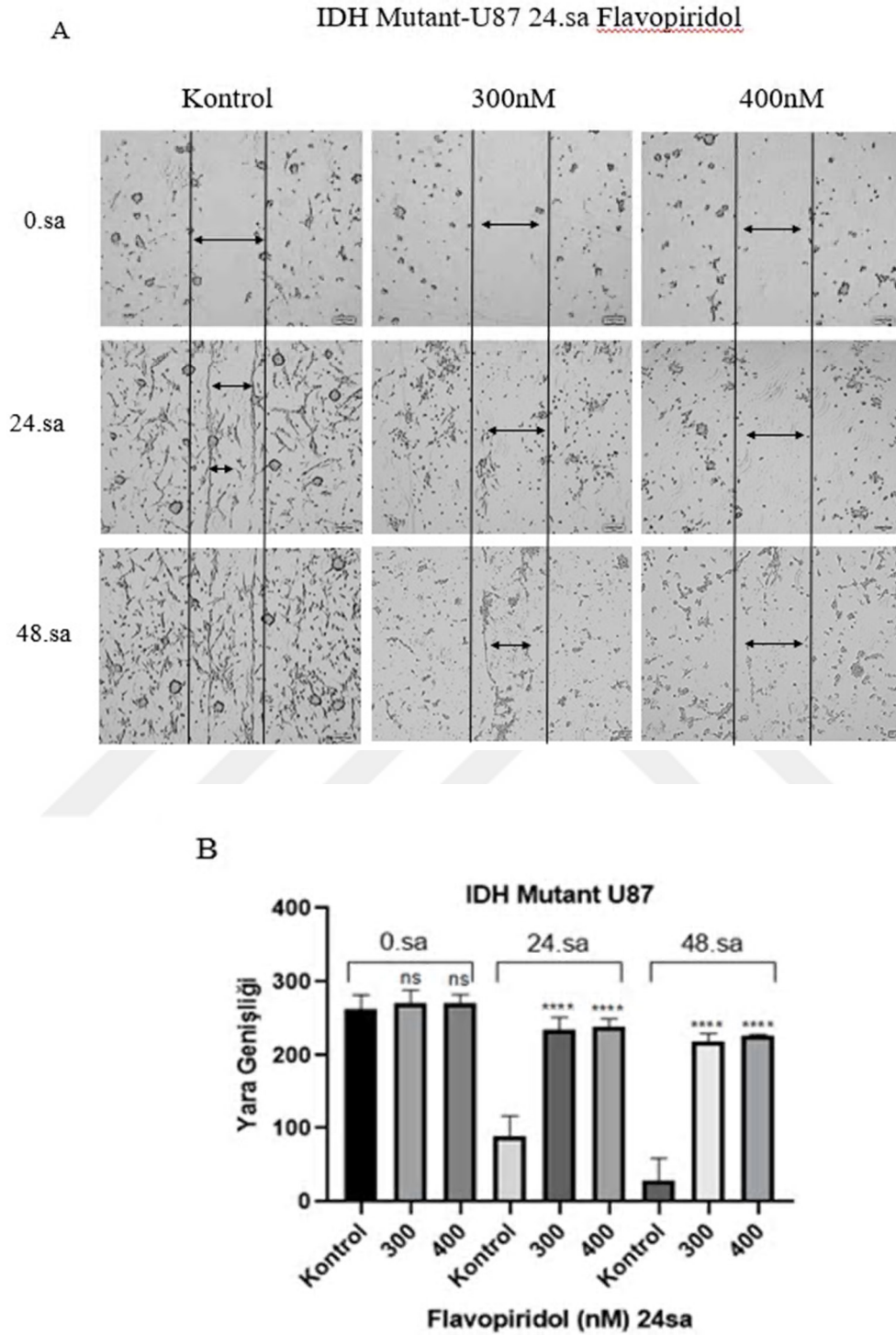
4.3. Flavopiridolün GBM hücrelerinde mobiletaye/ migrasyona etkisi

6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücreleri 24. saatte hücrelerin %50'sinin öldüğü 300, 400 nM, 48. saatte hücrelerin %50'sinin öldüğü 100, 200 nM ve 72. saatte hücrelerin %50'sinin öldüğü 50-100 nM flavopiridol ile muamale edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolduğunda farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan flavopiridolün hücre göçüne olan etkisini analiz etmek amacıyla, 20 µl'lik steril bir pipet ucu kullanılarak her kuyucukta tek tabakada bir çizik oluşturuldu. Daha sonra kalkan hücreleri uzaklaştırmak için kuyucuklar medya ile yıkandı ve yeni medya eklendi. Çizilen alandaki hücrelerin, mikroskop kullanılarak 0., 24. ve 48. saatlerde görüntüleri alındı ve her bir zaman noktasında yaranın ön kenarındaki hücreler tarafından kat edilen mesafe ölçüldü.

Yapılan analiz sonuçlarımıza göre yara oluşturulduktan 24 saat sonra, 24 saat 300, 400 nM flavopiridol uygulanan; U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, hücre göçünün kontrol hücrelerine kıyasla flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı, 48 saat sonra ise kontrol hücre grubunda yaranın tamamen kapanırken (hücrelerin göç ettiği), flavopiridol uygulanan hücrelerde yaranın kapanmadığı yani hücre göçünün önemli orada baskılandığı bulundu (Şekil 15,16).



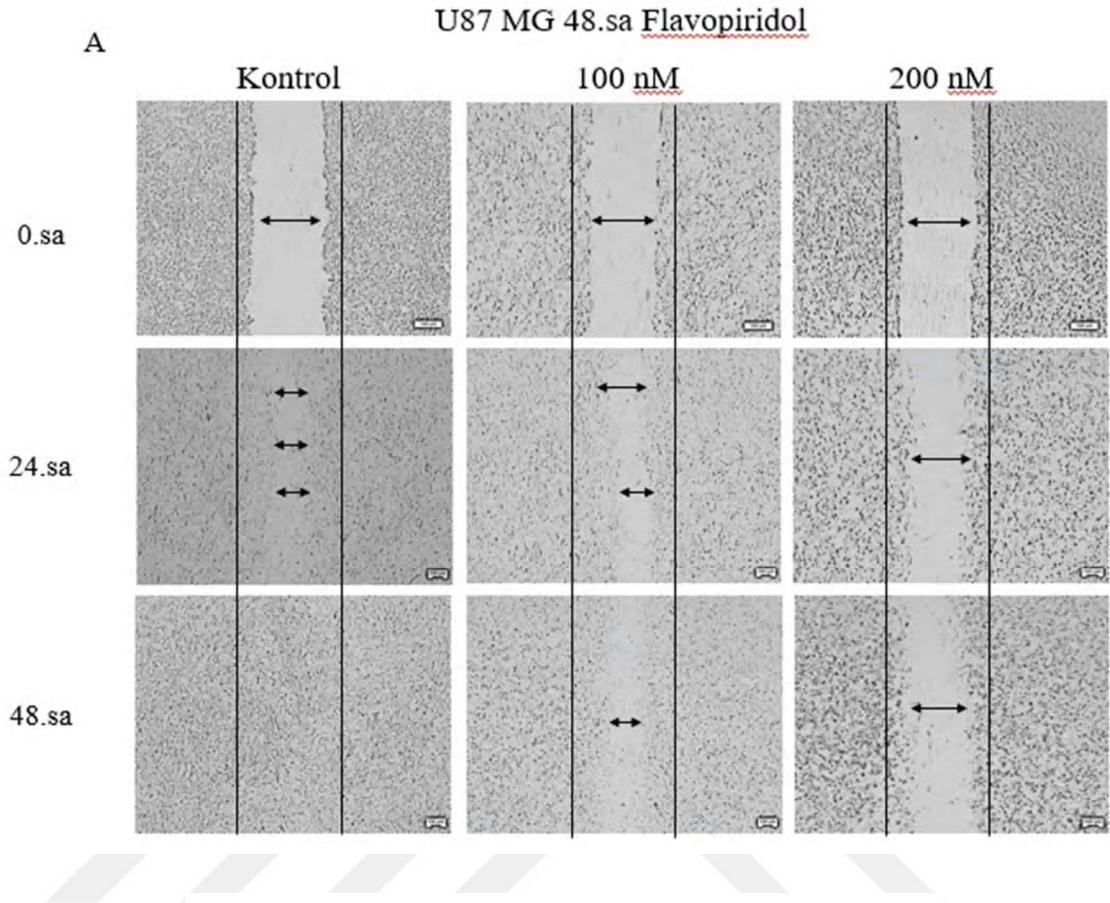
Şekil 15. 24 saat Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde migrasyon oluşum oranı. A) 24 saat 300-400 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin 0., 24., ve 48. saat çekilen görüntüleri. B) 24 saat 300-400 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre migrasyonda anlamlı bir azalma görüldü (ns (not significant): $p>0.05$; **** $p<0.0001$).



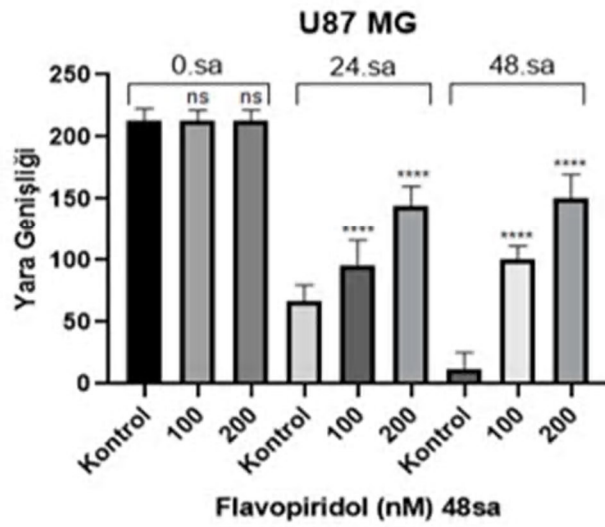
Şekil 16. 24 saat Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinde migrasyon oluşum oranı. A) 24 saat 300-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinin 0., 24., ve 48. saat çekilen görüntüleri. B) 24 saat 300-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre migrasyonda anlamlı bir azalma görüldü (ns (not significant): $p>0.05$; **** $p<0.0001$).

48 saat 100, 200 nM flavopiridol uygulanan U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, yara oluşturulduktan 24 saat sonra hücre göçünün kontrol hücrelerine kıyasla flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı, 48 saat sonra ise kontrol hücrelerinde oluşturulan yaranın tamamen kapandığı, flavopiridol uygulanan hücrelerde ise yaranın kapanmadığı hücre göçünün baskılandığı bulundu (Şekil 17,18).

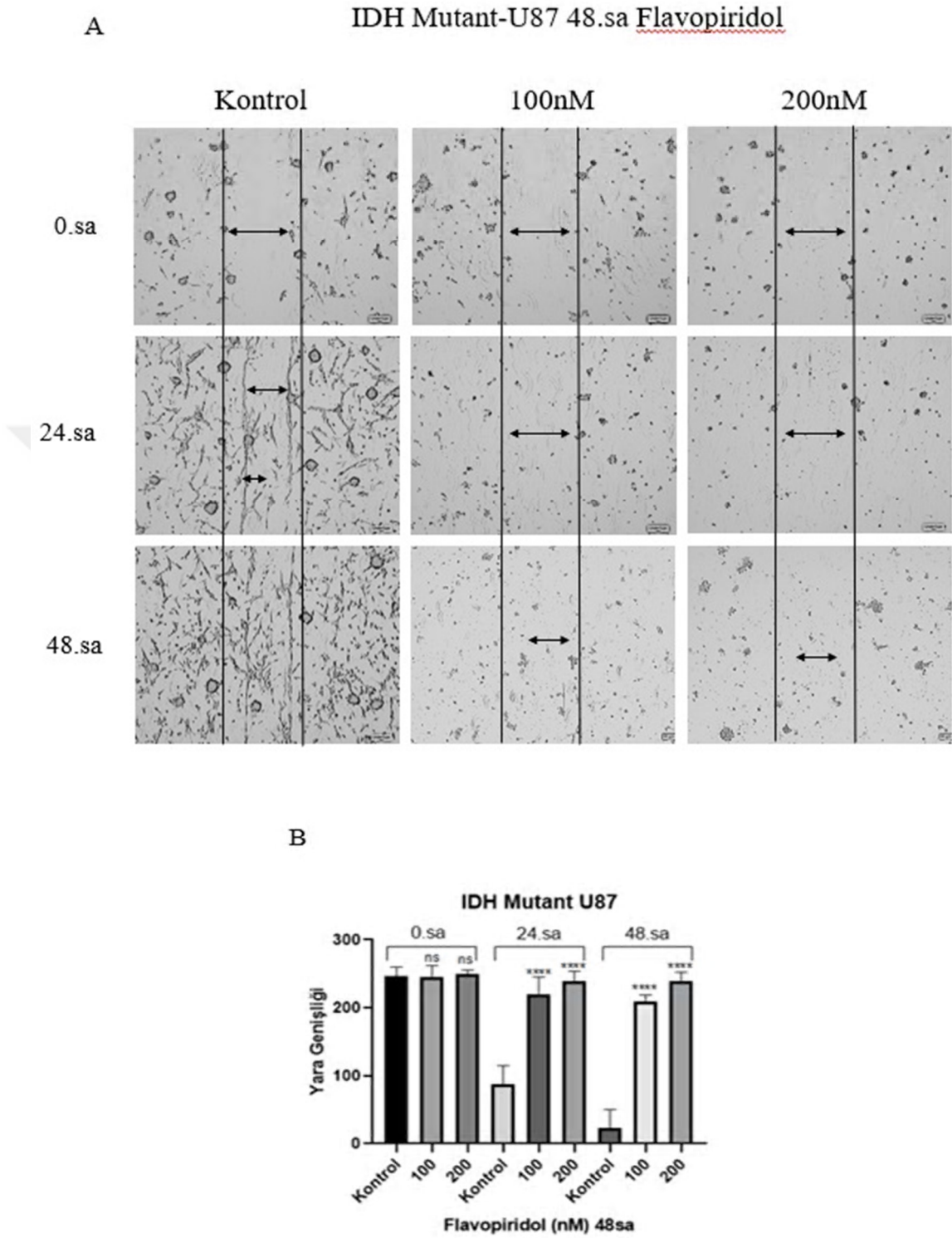




B



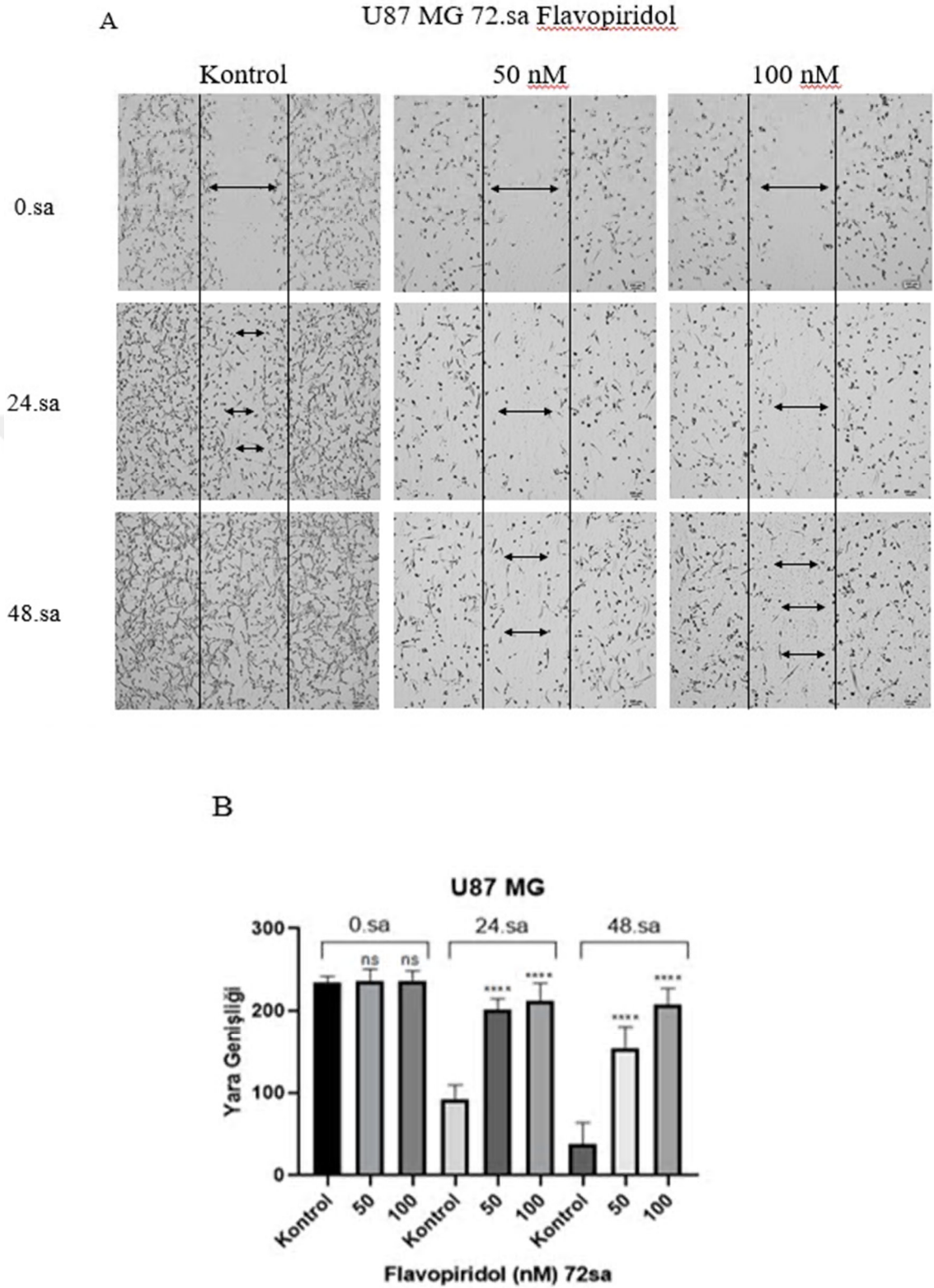
Şekil 17. 48 saat Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde migrasyon oluşum oranı. A) 48 saat 100-200 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin 0., 24., ve 48. saat çekilen görüntüleri. B) 48 saat 100-200 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre migrasyonda anlamlı bir azalma görüldü (ns (not significant); $p > 0.05$; **** $p < 0.0001$).



Şekil 18. 48 saat Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinde migrasyon oluşum oranı. A) 48 saat 100-200 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinin 0., 24., ve 48. saat çekilen görüntüleri. B) 48 saat 100-200 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre migrasyonda anlamlı bir azalma görüldü (ns (not significant): $p>0.05$; **** $p<0.0001$).

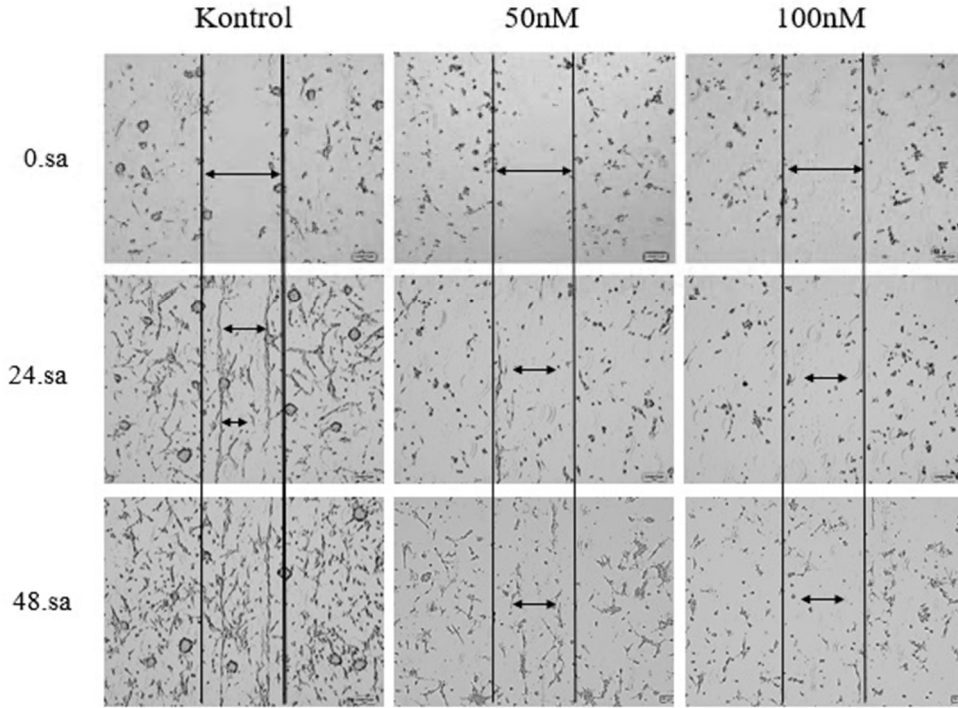
72 saatte 50, 100 nM flavopiridol uygulanan U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, yara oluşturulduktan 24 saat sonra hücre göçünün kontrol hücrelerine kıyasla flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı, 48 saat sonra ise kontrol hücrelerinde oluşturulan yaranın tamamen kapandığı, flavopiridol uygulanan hücrelerde ise yaranın kapanmadığı hücre göçünün baskılandığı bulundu (Şekil 19,20).



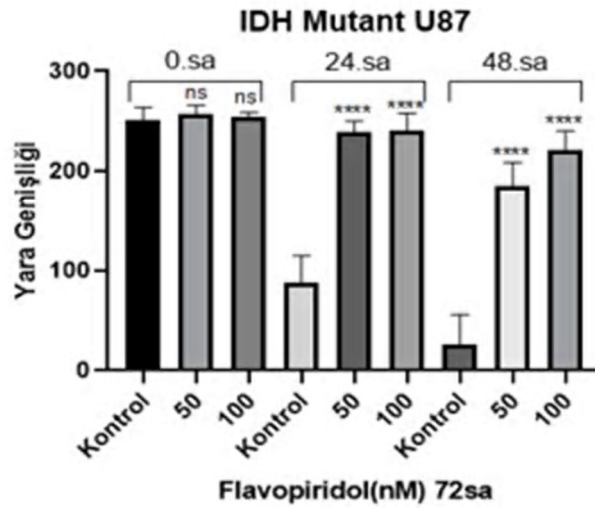


Şekil 19. 72 saat Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde migrasyon oluşum oranı. A) 72 saat 50-100 nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin 0., 24., ve 48. saat çekilen görüntüleri. B) 72 saat 50-100nM flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre migrasyonda anlamlı bir azalma görüldü (ns (not significant): $p>0.05$; **** $p<0.0001$)

A

IDH Mutant-U87 72.sa Flavopiridol

B



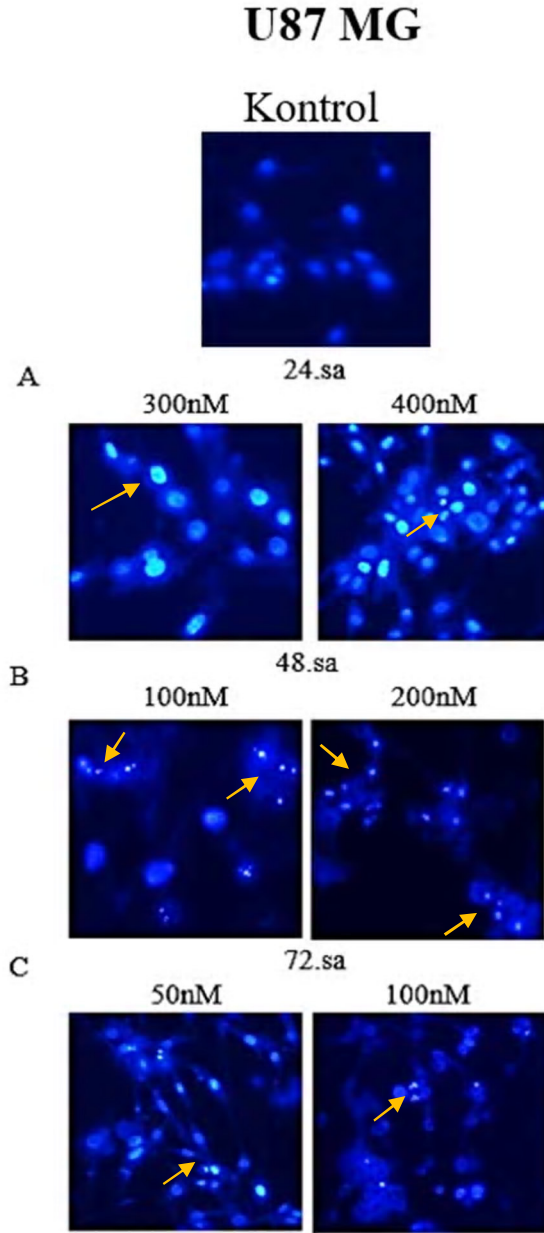
Şekil 20. 72 saat Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinde migrasyon oluşum oranı. A) 72 saat 50-100 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinin 0., 24., ve 48. saat çekilen görüntüleri. B) 72 saat 50-100 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre migrasyonda anlamlı bir azalma görüldü (ns (not significant): $p>0.05$; **** $p<0.0001$).

4.4. Flavopiridolün GBM hücrelerinde morfolojik olarak apoptotik değişime etkisi

Höst DNA'ya bağlanır ve kromatini boyar dolayısıyla nükleusu görünür hale getirir. Apoptotik hücrelerde kromatin kondensasyonu veya nükleus fragmentasyonu olduğu için, Höst apoptotik hücrelerin kromatinini hücrelerin normal kromatine göre daha parlak boyar. Bu yüzden Höst boyama canlı ve apoptotik hücreleri ayırt etmek için kullanılır (Dai ve ark., 2013).

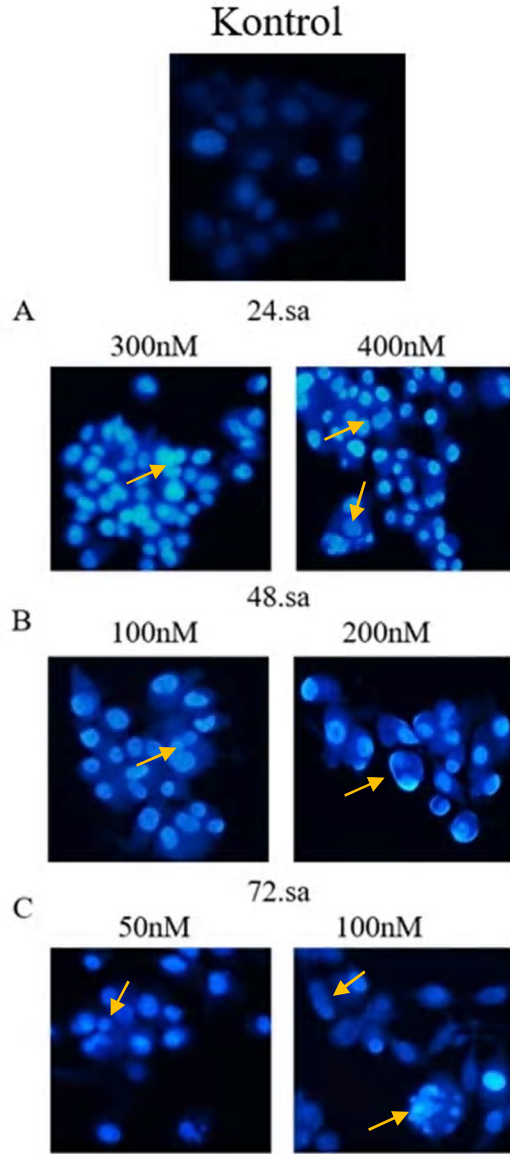
6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücreleri 24. saatte 300, 400 nM, 48. saatte 100, 200 nM ve 72. saatte 50-100 nM flavopiridol ile muamale edildi. Kontrol (muamelesiz) olarak kullanılan hücrelere hiçbir uygulama yapılmadı. Hücrelerin inkübasyon süreleri dolduğunda farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulanan flavopiridolün hücrelerde morfolojik olarak apoptotik değişimine etkisini analiz etmek amacıyla, hücreler paraformaldehit ile fiks edildi, PBS ile yıkandı ve höst boya ile boyanarak floresan mikroskopta görüntüleri alındı. Daha sonra normal hücreler ile morfolojik olarak apoptotik değişime uğrayan (kromatini daha parlak olan) hücreler sayıldı ve analiz yapıldı.

Yapılan analiz sonuçlarımıza göre 24 saat 300, 400 nM flavopiridol uygulanan U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, kontrol hücrelerine kıyasla, apoptotik değişime uğrayan hücrelerin flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda arttığı bulundu (Şekil 21A, 22A). 48 saat 100, 200 nM flavopiridol uygulanan; U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, kontrol hücrelerine kıyasla, apoptotik değişime uğrayan hücrelerin flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda arttığı bulundu (Şekil 21B, 22B). 72 saat 50, 100 nM flavopiridol uygulanan; U87 ve IDH mutant-U87 hücrelerinde, kontrol hücrelerine kıyasla, apoptotik değişime uğrayan hücrelerin flavopiridol konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda arttığı bulundu (Şekil 21C, 22C). Kontrol hücrelerde de birkaç apoptotik hücre görüldü.



Şekil 21. 24, 48 ve 72 saat Flavopiridol ile muamele edilen U87 hücrelerinin morfolojik olarak apoptotik değişime uğrama oranı. A) 24 saat 300-400 nM flavopiridol ile muamele edilen U87 hücrelerinin görüntüleri. B) 48 saat 100-200 nM flavopiridol ile muamele edilen U87 hücrelerinin görüntüleri. C) 72 saat 50-100 nM flavopiridol ile muamele edilen U87 hücrelerinin görüntüleri.

IDH Mutant-U87

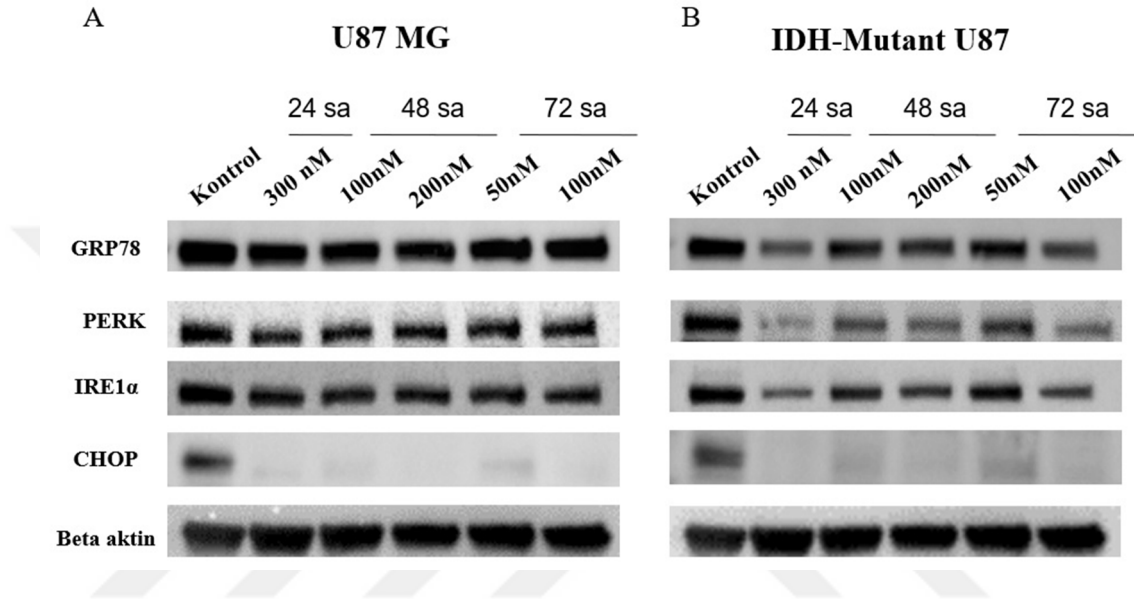


Şekil 22. 24, 48 ve 72 saat Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinin morfolojik olarak apoptotik değişime uğrama oranı. A) 24 saat 300-400 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinin görüntüleri. B) 48 saat 100-200 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinin görüntüleri. C) 72 saat 50-100 nM flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant-U87 hücrelerinin görüntüleri.

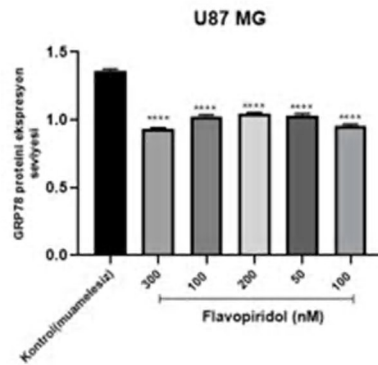
4.5. Flavopiridolün GBM hücrelerinde UPR sinyal yolağına etkisi

U87-MG ve IDH mutant U87 hücreleri MTS analiz sonuçlarından elde edilen verilere göre farklı zaman aralıklarında ve konsantrasyonlarda flavopiridol uygulanan hücrelerden izole edilen proteinlerden western blot analizi yapıldı. Western blot analizi ile ERS cevap olarak aktiveşen UPR sinyal yolağında görev alan GRP78, PERK,

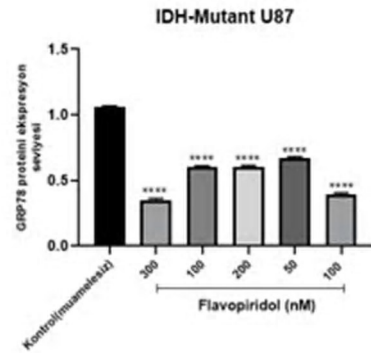
İRE1 α , CHOP proteinlerinin ekspresyonları analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre, iki farklı GBM hücrelerinde flavopiridol ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde GRP78, PERK, İRE1 α ve CHOP proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna (muamelesiz) göre önemli oranda azaldığı bulundu. (sırasıyla, Şekil 23A, A1, A2, A3, A4; Şekil 23B, B1, B2, B3, B4).



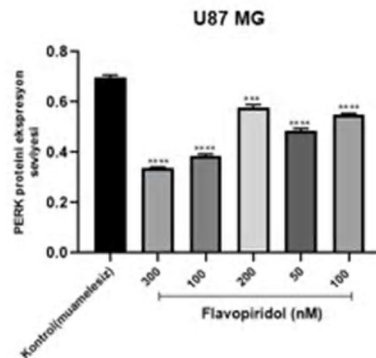
A.1



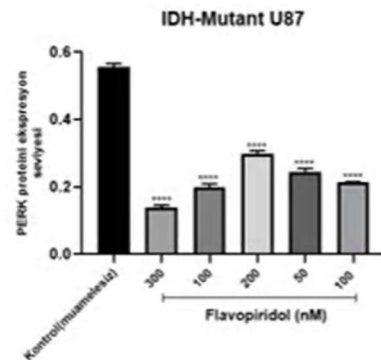
B.1

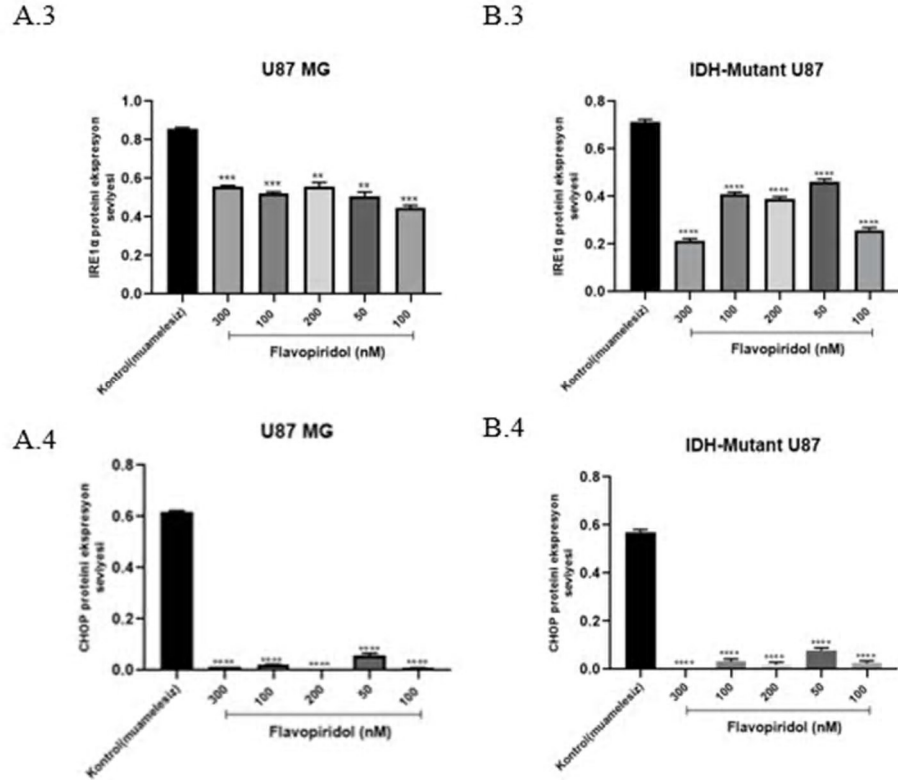


A.2



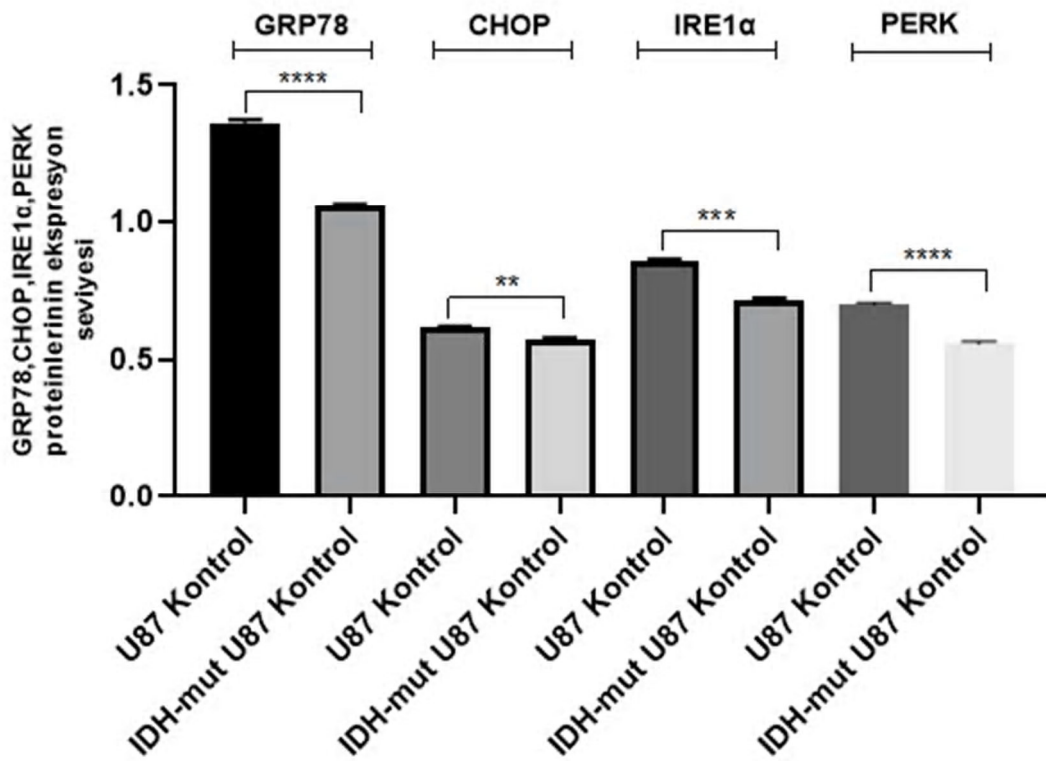
B.2





Şekil 23. Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerinde UPR sinyal yolağında görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri. **A)** Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde UPR sinyalinde görev alan proteinlerinin ekspresyon seviyeleri western blot görüntüleri. **A.1)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre GRP78 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **A.2)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre PERK ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **A.3)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre IRE1α ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **A.4)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre CHOP ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **B)** Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde UPR sinyalinde görev alan proteinlerinin ekspresyon seviyeleri western blot görüntüleri. **B.1)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre GRP78 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **B.2)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre PERK ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **B.3)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre IRE1α ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **B.4)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre CHOP ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu (**p<0.01;***p<0.001; ****p<0.0001).

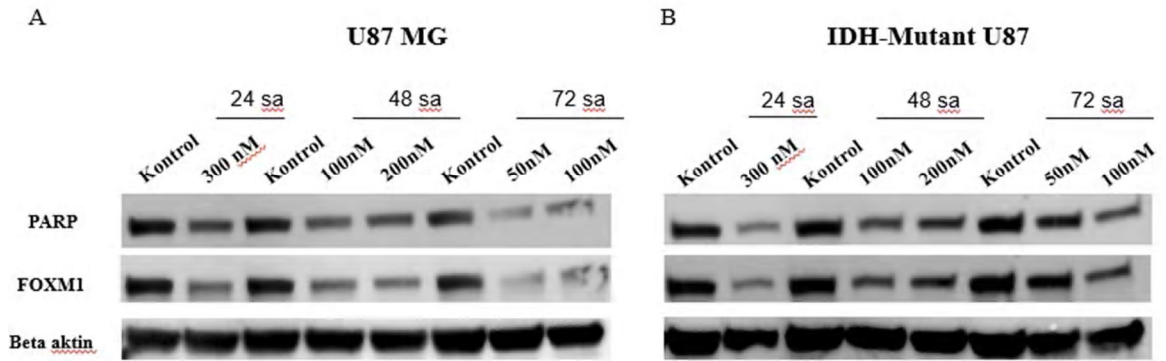
IDH-mutant GBM hücreleri, IDH mutant olmayan GBM hücrelerine göre daha iyi prognoz sergiledikleri için iki farklı GBM hücrelerinde UPR sinyal aktivasyonu açısından fark olup olmadığı merak edildi ve bu iki farklı GBM hücrelerinde bazal seviyede UPR sinyal yolağında görev alan GRP78, PERK, İRE1 α , CHOP proteinlerinin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. IDH mutant hücrelere göre IDH-mutant olmayan hücrelerde GRP78, PERK, İRE1 α , CHOP ekspresyonunun daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 24).

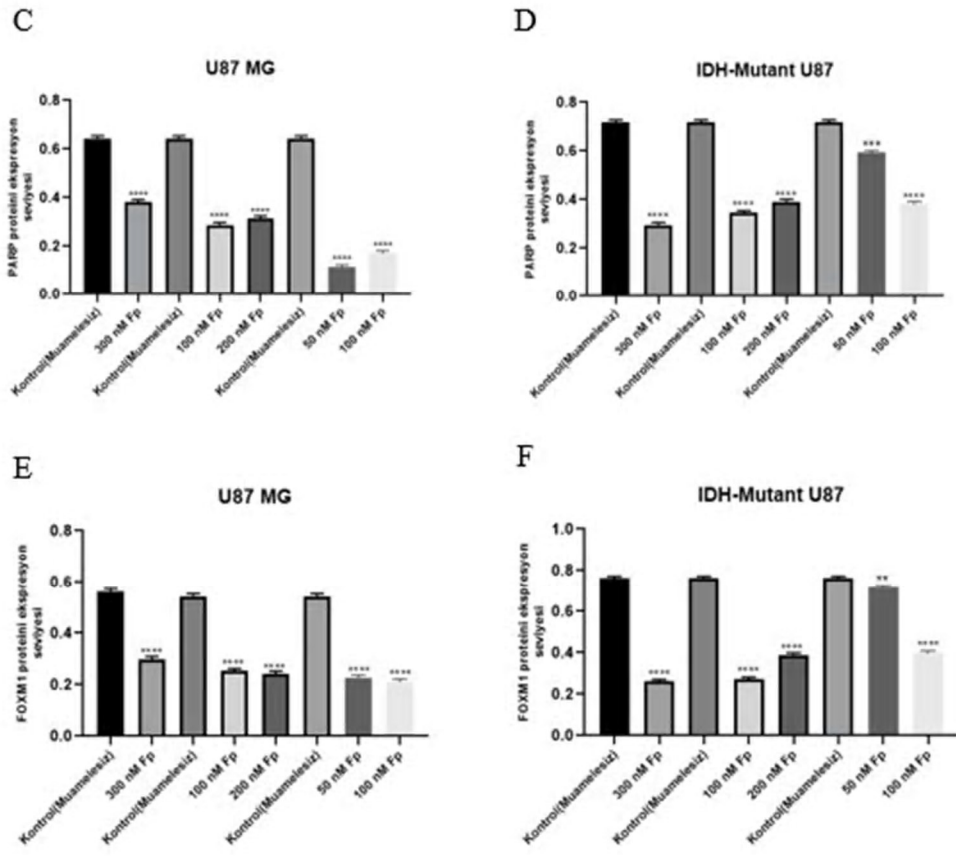


Şekil 24. U87-MG ve IDH mutant U87 hücrelerde bazal seviyede UPR sinyal yolağında görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri. U87-MG hücrelerinin IDH mutant U87 hücrelerinin kontrol gruplarına göre Endoplazmik Retikulum Stresi (ERS) proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı oranda daha fazla olduğu bulundu (**p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

4.6. Flavopiridolün GBM hücrelerinde DNA tamirinde görev alan PARP ve FOXM1 proteinlerinin ekspresyonlarına etkisi

Flavopiridolün GBM hücrelerinde kromatin yoğunlaşması veya nükleer fragmantasyonu artırdığını bulduktan sonra flavopiridolün DNA tamirinde rol alan PARP (Poli (ADP-riboz) Polimeraz) ve yine hem birçok onkogenik sinyal yolağının aktivasyonundan hem de DNA tamirinin düzenlenmesinden sorumlu olan FOXM1 proteinlerinin ekspresyonunda bir etkisinin olup olmadığı merak edildi ve western blot analizi ile PARP ve FOXM1 proteinlerin ekspresyonları analiz edildi. Flavopiridol uygulanan IDH mutant olmayan U87 ve IDH mutant U87 hücrelerinde PARP ve FOXM1 proteinlerinin önemli oranda azaldığı bulundu (sırasıyla, Şekil 25A, C, E; Şekil 25B, D, F). Bu verilerimiz flavopiridol uygulanan hücrelerde artan DNA hasarını destekledi.





Şekil 25. Flavopiridol uygulanan GBM hücrelerinde DNA tamirinde görev alan PARP ve FOXM1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri. **A)** Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde DNA tamirinde görev alan PARP ve onkogenik transkripsiyon faktörü olan FOXM1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri western blot görüntüleri. **C)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre PARP ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **E)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen U87-MG hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre FOXM1 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **B)** Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde DNA tamirinde görev alan PARP ve onkogenik transkripsiyon faktörü olan FOXM1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri western blot görüntüleri. **D)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre PARP ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu. **F)** 24 saat 300nM, 48 saat 100, 200 nM ve 72 saat 50, 100 nM Flavopiridol ile muamele edilen IDH mutant U87 hücrelerinde, kontrol hücrelerine göre FOXM1 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu (**p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

GBM en agresif ve yaygın görülen gliomalar olarak bilinmektedir (Louis ve ark., 2016; Gargini ve ark., 2020; Sonoda, 2020). 2016 yılında DSÖ GBM'leri IDH geninde görülen mutasyona bağlı olarak IDH geninde mutasyon taşıyan ve taşımayan GBM'ler olarak iki sınıfa ayırmıştır (Louis vd., 2016; Gargini vd., 2020). Histolojik olarak birbirleriyle benzerlik göstermelerine rağmen, IDH1 (+) tümörlerin, IDH1 (-) tümörlere kıyasla prognozunun daha iyi olduğu ve daha uzun genel sağkalıma sahip olduğu gösterilmiştir.

GBM hastaları için uygulanan geleneksel tedavi stratejileri, tümör rezeksiyonu (nöroşirürji), temozolomide dayalı kemoterapi, radyoterapi veya bu seçeneklerin bir kombinasyonuna dayanmaktadır. Son yıllarda ise, GBM'lerin tedavisi için, cerrahi rezeksiyon sonrası radyoterapi ve kemoterapi de dahil olmak üzere multimodal agresif terapiler, hedefe yönelik tedaviler, gen terapisi ve immünoterapiler olmak üzere güncel tedavi yöntemleri klinikte veya pre-klinik çalışmalarda kullanılmaya başlansa da, halen hastaların ortalama sağkalım süresinde bir iyileşme görülmemiştir (Shergalis ve ark., 2018; Pearson ve Regad, 2017; Fabian ve ark., 2019). Bu nedenle, GBM'ler için yeni hedeflerin ve etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir.

ER, lipidlerin biyosentezine, çoğu proteinin katlanmasına ve translasyon sonrası modifikasyonuna, biyolojik sinyallerin transdüksiyonuna ve kalsiyumun kararlı halde depolanmasına ve mobilizasyonuna katılarak birçok hücresel işlevleri düzenleyen ve hücrelerin biyogenezini destekleyen vazgeçilmez bir organeldir. Genetik veya çevresel etmenler (besin kıtlığı, hipoksi, oksidatif stres, radyasyon vb.) ER'nin homeostazını bozabilir. Bu durum ERS'yi indükler ve sonuç olarak kendiliğinden uyarlanan katlanmamış protein yanıtı (UPR) ve ER ile ilişkili bozulma (ERAD) dahil olmak üzere çeşitli yolları aktifleştirir. Orta düzeydeki ERS çözülebilirken, aşırı ERS nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer hastalıkları ve yaşlanma gibi birçok insan hastalığının patogenezi ile yakın ilişki içinde olan

programlanmış hücre ölümünü tetikleyebilir (Deng ve ark., 2020). Bununla birlikte bazı çalışmalar anormal bir ERS düzeyinin aynı zamanda tümör hücrelerinin hiperaktivasyonu, ilerlemesi, metastazı ve hatta ilaç direncinde de rol oynadığını göstermektedir (Liu ve ark., 2020; Tianming Zhao 2020, Chen ve Cubillos-Ruiz, 2020).

Kötü huylu ve hızlı büyüyen tümörlerin çoğu gibi GBM tümör hücreleri de, yetersiz kan akışı, hipoksi, besin yoksunluğu ve ayrıca bağışıklık reaksiyonları ve çeşitli terapötik tedaviler nedeniyle önemli oranda hücresel strese maruz kalmaktadır. Buna bağlı olarak, GBM tümör hücreleri yeni sentezlenen proteinlerin katlanması ve bu proteinlerin hücreler arası taşınmasına ihtiyaç duydukları için, GBM tümör hücrelerinin progresyonu doğrudan artan ERS ile ilişkilidir (Urta ve ark., 2016). Bu yüzden, GBM onkogeneğinde UPR sinyal yolağının aşırı düzeyde aktifleştğini ve bu yolağın GBM hücrelerinin hayatta kalması, tümörün ilerlemesi ve tedavilere dirençte önemli bir rol oynadığına dair çok sayıda güçlü kanıtlar vardır. Bu yüzden, GBM tedavisi için terapötik bir hedef olarak gösterilmiştir (Le Reste ve ark., 2016; Peñaranda Fajardo ve ark., 2016; Tsai ve ark., 2017; Obacz ve ark., 2017; He ve ark., 2019; Sonoda Y, 2020; Mirchia ve Richardson, 2020).

Sunulan tez çalışmasında bir siklin kinaz inhibitörü olarak bilinen flavopiridolün IDH mutant ve IDH mutant olmayan GBM hücrelerinde ERS ile aktifleşen UPR sinyal yolağı üzerine etkisinin karşılaştırılmalı olarak araştırılması amaçlandı. Bu amacımız için IDH mutant olmayan U87 ve IDH mutant-U87 GBM hücreleri farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda flavopiridol ile muamele edildi. Çalışma sonuçlarımıza göre, flavopiridolün her iki tip GBM hücrelerinde de hücre proliferasyonunu/büyümesini, klon oluşumunu ve migrasyonu önemli oranda baskıladığı bulundu. Literatürde flavopiridolün GBM hücrelerine etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar da bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak flavopiridolün çeşitli insan GBM hücre hatlarında (Newcomb ve ark., 2005; Alonso ve ark., 2003; Cobanoglu ve ark., 2016) ve murin GBM hücrelerinde (Newcomb ve ark., 2003) büyümeyi azalttığını göstermiştir. Ancak flavopiridolün GBM hücrelerinde klon oluşumuna, migrasyona etkisini araştıran detaylı bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Ayrıca IDH-mutant olmayan GBM'e göre daha ılımlı bir prognoz sergileyen IDH-mutant GBM hücrelerinde flavopiridolün hücre canlılığına, büyümesine ve migrasyonuna etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Ayrıca çalışmamızda,

flavopiridol uygulanan IDH-mutant ve IDH-mutant olmayan GBM hücrelerinde morfolojik olarak kromatin kondensasyonu veya nukleus fragmentasyonun arttığı bulundu. Bulgularımız flavopiridolün IDH mutant olmayan GBM (U87) hücrelerinde antiproliferatif etkisi dışında hücre mobilitesini de etkilediğini ilaveten de IDH-mutant GBM hücrelerinde antiproliferatif bir etkiye sahip olduğunu ilk kez gösterdi.

Daha sonra çalışmamızda, UPR aktivitesi yüksek olan GBM hücrelerinde (He ve ark., 2019) flavopiridolün UPR sinyal yolağına etkisi araştırıldı. UPR, aktive edilmiş ATF6, PERK ve IRE1 α olan üç ER transmembran proteini ve ısı şok protein ailesinden olan proteinlerin glikozillenmesinden sorumlu olan Glikoz düzenleyici protein GRP78 tarafından düzenlenir (Urrea ve ark., 2016; Sureda ve ark., 2020). Daha önce yapılan çalışmalarda, GBM hücre hatları ve GBM hastalarının beyin doku örneklerinde PERK ve GRP78'in normal yetişkin beyin hücrelerine göre yüksek seviyelerde ifade edildiği gösterilmiştir (Peñaranda Fajardo ve ark., 2016; Tsai ve ark., 2017). Yine başka bir çalışmada, ERS durumunda GBM hücrelerinde, PERK seviyelerinin arttığı ve GRP78'in aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Tsai ve ark., 2017; Obacz ve ark., 2017). Üstelik fazla ifade edilen GRP78'in GBM hücrelerinde tümör progresyonuna, tedaviye karşı dirençte rol aldığı gösterilmiştir (Obacz ve ark., 2017). Diğer bir çalışmada da ERS sensörlerinden olan IRE1 α yolunun GBM'de tümör büyümesine, migrasyona ve anjiyogeneze katkı sağladığı, PERK yolunun GBM hücrelerinde tedaviye yanıtın ve metabolizmanın kontrolünde yer aldığı, ATF6 yolunun da GBM'de radyoterapi direncine neden olduğu bildirilmiştir (Peñaranda Fajardo ve ark., 2016). Bu yüzden sunulan tez çalışmasında, öncelikle flavopiridol uygulanan hücrelerde GRP78, PERK ve IRE1 α proteinlerinin ekspresyonları analiz edildi ve flavopiridolün bu proteinlerin ekspresyonlarını önemli oranda baskıladığı bulundu. Daha sonra ERS'yle ilişkili olan aynı zamanda DNA hasarı indüklenebilir transkript 3 olarak da bilinen, pro-apoptotik bir transkripsiyon faktörü, C / EBP homolog proteini (CHOP) proteininin ekspresyonu analiz edildi ve flavopiridol uygulanan hücrelerde CHOP proteinin ekspresyonunun baskılandığı bulundu. Kronik lenfositik lösemi hücrelerinde ise flavopiridolün ERS'yi indükleyerek hücrelerin ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Mahoney ve ark., 2012, 2013). Halbuki bizim sonuçlarımız, flavopiridolün GBM hücrelerinde artmış olan, hücrelerin sağkalımına yol açan ve kötü prognozla ilişkili olduğu bilinen UPR sinyal yolağını inhibe ettiğini gösterdi.

Flavopiridolün ERS ile ilişkili olabileceğini gösteren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Mahoney ve ark., 2013; Cory ve ark., 2008). Bizim çalışmamız GBM hücrelerinde ilk kez flavopiridolün ERS'yi baskıladığını ve her iki tip GBM hücrelerinde proliferasyonun, klon oluşumunun ve migrasyonun azalmasının aktif UPR sinyal yolağının inhibisyonu ile ilişkili olabileceğini gösterdi.

IDH mutant olmayan GBM hücrelerinde UPR sinyal yolağı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Çalışmamızda ayrıca bazal seviyede IDH mutant ve IDH mutant olmayan GBM hücrelerinde UPR sinyal yolağı ile ilişkili olan proteinlerinin ekspresyon oranları karşılaştırıldı ve daha iyi prognoza sahip olan IDH mutant GBM hücrelerinde, IDH mutant olmayan GBM hücrelerine göre GRP78, PERK, IRE1α ve CHOP proteinlerinin ekspresyonlarının daha düşük olduğu bulundu.

Ayrıca çalışmamızda, Flavopiridol uygulanan iki farklı GBM hücrelerinde DNA tamirinde görevi olan PARP ekspresyonunun baskılandığı bulundu. Bu verimiz, flavopiridol uygulanan hücrelerde morfolojik olarak gözlemlediğimiz artmış kromatin yoğunlaşmasını veya nükleer fragmantasyonu desteklemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda PARP-1'in genetik ve farmakolojik inhibisyonu, GBM hücre hatları ve hasta örneklerinden oluşturulan primer kültürler üzerinde anti-proliferatif bir etkiye sahip olduğu (Ghorai ve ark., 2020; Lester ve ark., 2016) ve PARP inhibisyonunun, temozolomide karşı oluşan direnci baskıladığı gösterilmiştir (Yuan ve ark., 2020). Dolayısıyla, verilerimiz GBM hücrelerinde DNA onarım sürecini inhibe etmek için flavopiridolün aynı zamanda bir PARP inhibitörlerinin kullanılabilirliğine işaret etti.

UPR ile indüklenen transkripsiyon faktörleri tarafından hücre sağkalımı veya ölümünün kontrol edildiği rapor edilmiştir (Obacz ve ark., 2017). FOXM1 onkogenik transkripsiyon faktörüdür ve GBM dahil birçok kanser hücresinde aşırı derecede ifade edilir. Özellikle hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücre çoğalmasında görev alan siklin-D, siklin-B genlerinin promotör bölgelerine bağlanarak hücre döngüsünde yer alan genlerin transkripsiyonel aktivitesini düzenler. Bu yüzden sunulan tez çalışmasında siklin inhibitörü olarak bilinen flavopiridol tarafından baskılanan UPR sinyal yolağının FOXM1 ekspresyonuna etkisi araştırıldı ve flavopiridol uygulanan hücrelerde FOXM1 ekspresyonunun belirgin bir şekilde baskılandığı bulundu. Anti-kolanjiyo karsinomlarda antosiyanin kompleksinin FOXM1 ve ERS yanıtını baskıladığı (Intuyod ve ark., 2018), gama-tokotrienol (GTT) ve hidrosikavikol (HC) bileşiklerinin GBM hücrelerinde

ERS'ye yanıt olarak aktiveleşen genlerin yanısıra FOXM1 genini de hedeflediği (Abdul Rahman ve ark., 2019) bildirilmiştir. Ancak FOXM1 ile ERS arasında doğrudan ilişki olduğunu gösteren bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Aynı zamanda flavopiridolün FOXM1 ekspresyonuna etkisi de henüz bilinmemektedir. Dolayısıyla, flavopiridol uygulanan hücrelerde flavopiridol ile FOXM1 ekspresyonunun inhibisyonu mu UPR sinyal yolağını baskılıyor yoksa UPR sinyal yolağının baskılanmasıyla mı FOXM1 ekspresyonu baskılanıyor bilinmemektedir. GBM hücrelerinin tedavisi için hedef olabilecek yeni bir yolağı açığa çıkartmak için bu mekanizmayı açıklığa kavuşturmanın önemli olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak verilerimiz daha iyi prognoz sergileyen IDH mutant GBM hücrelerinde ve oldukça agresif ve kötü prognoza sahip IDH mutant olmayan GBM hücrelerinde Flavopiridolün, hücre döngüsünün ilerlemesine, anjiyogenesize, genomik kararsızlık ve metastaz olmak üzere karsinogenezin birçok basamağında rol alan onkogenik FOXM1 ekspresyonunu, ERS'ye bağlı olarak aktiveleşen ve GBM hücrelerinde onkogenik sinyal olarak görev yapan UPR sinyal yolağını ve DNA tamirinden sorumlu olan PARP ekspresyonunu da baskıladığını ve Flavopiridol uygulanan hücrelerde azalmış proliferasyonun ve migrasyonun ve artmış genomik kararsızlığın bu yolların baskılanmasıyla ilişkili olduğu ilk kez gösterildi. Dolayısıyla verilerimiz, GBM hücrelerinde ERS'yi hedefleyen flavopiridolün, GBM'in tedavisi için yeni bir perspektif sağlamada umut verici olabileceğini ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abdul Rahman A, Mokhtar NM, Harun R, Jamal R, Wan Ngah WZ. Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms of combined gamma-tocotrienol and hydroxychavicol in preventing the proliferation of 1321N1, SW1783, and LN18 glioma cancer cells. *J Physiol Biochem*, 2019;75(4):499-517.
- Allen M, Bjerke M, Edlund H, Nelander S, Westermarck B. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Science Translational Medicine*, 2016;8(354), 354re3–354re3.
- Alonso M, Tamasdan C, Miller DC, Newcomb EW. Flavopiridol induces apoptosis in glioma cell lines independent of retinoblastoma and p53 tumor suppressor pathway alterations by a caspase-independent pathway. *Mol Cancer Ther*, 2003;2(2):139-50.
- Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bil Derg*, 2016;5(3).
- Campanella R, Guarnaccia L, Cordiglieri C, Trombetta E, Caroli M, Carrabba G, La Verde N, Rampini P, Gaudino C, Costa A, Luzzi S, Mantovani G, Locatelli M, Riboni L, Navone SE, Marfia G. Tumor-Educated Platelets and Angiogenesis in Glioblastoma: Another Brick in the Wall for Novel Prognostic and Targetable Biomarkers, Changing the Vision from a Localized Tumor to a Systemic Pathology. *Cells*, 2020;9(2):294.
- Charonis AS, Michalak M, Groenendyk J, Agellon LB. Endoplasmic reticulum in health and disease: the 12th International Calreticulin Workshop, Delphi, Greece. *J Cell Mol Med*, 2017;21(12):3141-3149.
- Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer*, 2020.

- Clark O, Yen K, Mellinghoff IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clin Cancer Res*, 2016;22(8):1837-42.
- Cobanoglu G, Turacli ID, Ozkan AC, Ekmekci A. Flavopiridol's antiproliferative effects in glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Ther*, 2016;12(2):811-7.
- Cory AH, Chen J, Cory JG. Implications of the involvement of the endoplasmic reticulum stress pathway in drug-induced apoptosis. *Anticancer Res*, 2008;28(2A):681-6.
- Cubillos-Ruiz JR, Bettigole SE, Glimcher LH. Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell*, 2017;168(4):692-706.
- Dai ZJ, Tang W, Lu WF, Gao J, Kang HF, Ma XB, Min WL, Wang XJ, Wu WY. Antiproliferative and apoptotic effects of β -elemene on human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Cell Int*, 2013;13(1):27.
- Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*, 2016; 20(5 Suppl):S2-8.
- Deng H, Zhou Z, Yang W, Lin LS, Wang S, Niu G, Song J, Chen X. Endoplasmic Reticulum Targeting to Amplify Immunogenic Cell Death for Cancer Immunotherapy. *Nano Lett*, 2020;20(3):1928-1933.
- Díaz-Bulnes P, Saiz ML, López-Larrea C, Rodríguez RM. Crosstalk Between Hypoxia and ER Stress Response: A Key Regulator of Macrophage Polarization. *Front Immunol*, 2020;10:2951.
- Dogan Turacli I, Demirtas Korkmaz F, Candar T, Ekmekci A. Flavopiridol's effects on metastasis in KRAS mutant lung adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem*, 2019;120(4):5628-5635.
- Düzgün A, Alaçam H, Okuyucu A. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi*, 2012;29:95-100.
- Escamilla-Ramírez A, Castillo-Rodríguez RA, Zavala-Vega S, Jimenez-Farfan D, Anaya-Rubio I, Briseño E, Palencia G, Guevara P, Cruz-Salgado A, Sotelo J,

- Trejo-Solís C. Autophagy as a Potential Therapy for Malignant Glioma. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020;13(7):156.
- Fabian D, Guillermo Prieto Eibl MDP, Alnahhas I, Sebastian N, Giglio P, Puduvalli V, Gonzalez J, Palmer JD. Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. *Cancers (Basel)*, 2019;11(2):174.
- Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA, Perry A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Arch*, 2017; 471(2):257-269.
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Third edition, Wiley-Liss, New York, 2000: 486.
- Fujii T, Khawaja MR, DiNardo CD, Atkins JT, Janku F. Targeting isocitrate dehydrogenase (IDH) in cancer. *Discov Med*, 2016;21(117):373-80.
- Gargini R, Segura-Collar B, Sánchez-Gómez P. Cellular Plasticity and Tumor Microenvironment in Gliomas: The Struggle to Hit a Moving Target. *Cancers (Basel)*, 2020;12(6):1622.
- Ghorai A, Mahaddalkar T, Thorat R, Dutt S. Sustained inhibition of PARP-1 activity delays glioblastoma recurrence by enhancing radiation-induced senescence. *Cancer Lett*, 2020;490:44-53.
- Golson ML, Kaestner KH. Fox transcription factors: from development to disease. *Development*, 2016; 143(24): 4558-4570.
- Gundamaraju R, Lu W, Azimi I, Eri R, Sohal SS. Endogenous Anti-Cancer Candidates in GPCR, ER Stress, and EMT. *Biomedicines*, 2020;8(10):402.
- Hamurcu Z, Ashour A, Kahraman N, Ozpolat B. FOXM1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorigenesis of human triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 2016;7(13):16619-35.
- Hamurcu Z, Delibaşı N, Geçene S, Şener EF, Dönmez-Altuntaş H, Özkul Y, Canatan H, Ozpolat B. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β 1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018; 144(3):415–430.

- Hamurcu Z, Delibaşı N, Nalbantoglu U, Sener EF, Nurdinov N, Tascı B, Taheri S, Özkul Y, Donmez-Altuntas H, Canatan H, Ozpolat B. FOXM1 plays a role in autophagy by transcriptionally regulating Beclin-1 and LC3 genes in human triple-negative breast cancer cells. *J Mol Med (Berl)*, 2019;97(4):491-508.
- Hamurcu Z, Kahraman N, Ashour A, Ozpolat B. FOXM1 transcriptionally regulates expression of integrin $\beta 1$ in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2017;163(3):485-493.
- Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, Gilbert MR, Yang C. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer*, 2020;122(11):1580-1589.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011;144(5):646-74.
- He Y, Su J, Lan B, Gao Y, Zhao J. Targeting off-target effects: endoplasmic reticulum stress and autophagy as effective strategies to enhance temozolomide treatment. *Onco Targets Ther*, 2019;12:1857-1865.
- Hersh DS, Peng S, Dancy JG, Galisteo R, Eschbacher JM, Castellani RJ, Heath JE, Legesse T, Kim AJ, Woodworth GF, Tran NL, Winkles JA. Differential expression of the TWEAK receptor Fn14 in IDH1 wild-type and mutant gliomas. *J Neurooncol*, 2018;138(2):241-250.
- Hochberg F, Toniolo P, Cole P, Salcman M. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. *J Neurooncol*, 1990;8(1):55-60.
- <https://hsqm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri> Erişim tarihi: 20.11.2020.
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5287969#section=2D-Structure> Erişim tarihi: 11.11.2020.
- https://www.lgcstandards-atcc.org/Global/Products/HTB-14IG.aspx?geo_country=tr#characteristics Erişim tarihi: 29.11.2020.
- Huang S, Xing Y, Liu Y. Emerging roles for the ER stress sensor IRE1 α in metabolic regulation and disease. *J Biol Chem*, 2019;294(49):18726-18741.

- Intuyod K, Saavedra-García P, Zona S, Lai CF, Jiramongkol Y, Vaeteewoottacharn K, Pairojkul C, Yao S, Yong JS, Trakansuebkul S, Waraasawapati S, Luvira V, Wongkham S, Pinlaor S, Lam EW. FOXM1 modulates 5-fluorouracil sensitivity in cholangiocarcinoma through thymidylate synthase (TYMS): implications of FOXM1-TYMS axis uncoupling in 5-FU resistance. *Cell Death Dis*, 2018;9(12):1185.
- Jaiswal N, Chakraborty S, Nag A. Biology of FOXM1 and its emerging role in cancer therapy. *Journal of Proteins & Proteomics*, 2014; 5(1): 1-24.
- Kalkan R, Atlı Eİ. Geçmişten Günümüze Glioblastoma Genetiği. *Türk Nöroşir Derg*, 2014;24(3):239-249.
- Kanderi T, Gupta, V. Glioblastoma Multiforme. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
- Koo CY, Muir KW, Lam EWF. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2012; 1819(1): 28-37.
- Le Reste PJ, Avril T, Quillien V, Morandi X, Chevet E. Signaling the Unfolded Protein Response in primary brain cancers. *Brain Res*, 2016;1642:59-69.
- Lei Y, Wang S, Ren B, Wang J, Chen J, Lu J, Zhan S, Fu Y, Huang L, Tan J. CHOP favors endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of autophagy. *PLoS One*, 2017;12(8):e0183680.
- Lester A, Rapkins R, Nixdorf S, Khasraw M, McDonald K. Combining PARP inhibitors with radiation therapy for the treatment of glioblastoma: Is PTEN predictive of response? *Clin Transl Oncol*, 2017;19(3):273-278.
- Li Y, Zhang S, Huang S. FoxM1: a potential drug target for glioma. *Future Oncol*, 2012;8(3):223-226.
- Lin P, Chen F, Sun J, Zhou J, Wang X, Wang N, Li X, Zhang Z, Wang A, Jin Y. Mycotoxin zearalenone induces apoptosis in mouse Leydig cells via an endoplasmic reticulum stress-dependent signalling pathway. *Reprod Toxicol*, 2015;52:71-7.

- Liu Y, Tan Z, Yang Y. Negative feedback and modern anti-cancer strategies targeting the ER stress response. *FEBS Lett*, 2020.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 2016;131(6):803-20.
- Lütgendorf-Caucig C, Freyschlag C, Masel EK, Marosi C. Guiding Treatment Choices for Elderly Patients with Glioblastoma by a Comprehensive Geriatric Assessment. *Curr Oncol Rep*, 2020;22(9):93.
- Mahoney E, Byrd JC, Johnson AJ. Autophagy and ER stress play an essential role in the mechanism of action and drug resistance of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Autophagy*, 2013;9(3):434-5.
- Mahoney E, Lucas DM, Gupta SV, Wagner AJ, Herman SE, Smith LL, Yeh YY, Andritsos L, Jones JA, Flynn JM, Blum KA, Zhang X, Lehman A, Kong H, Gurcan M, Grever MR, Johnson AJ, Byrd JC. ER stress and autophagy: new discoveries in the mechanism of action and drug resistance of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Blood*, 2012;120(6):1262-73.
- Maus A, Peters GJ. Glutamate and α -ketoglutarate: key players in glioma metabolism. *Amino Acids*, 2017;49(1):21-32.
- Mirchia K, Richardson TE. Beyond IDH-Mutation: Emerging Molecular Diagnostic and Prognostic Features in Adult Diffuse Gliomas. *Cancers (Basel)*, 2020;12(7):1817.
- Moon HW, Han HG, Jeon YJ. Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Int J Mol Sci*, 2018;19(10):3020.
- Moore K, Hollien J. Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. *Mol Biol Cell*, 2015;26(16):2873-84.

- Mou Z, Yuan YH, Zhang Z, Song LK, Chen NH. Endoplasmic reticulum stress, an important factor in the development of Parkinson's disease. *Toxicol Lett*, 2020;324:20-29.
- Nagelkerke A, Sweep FC, Geurts-Moespot A, Bussink J, Span PN. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: molecular pathways controlling autophagy. *Semin Cancer Biol*, 2015;31:89-98.
- Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci*, 2007;64(4):458-78.
- Nandi D, Cheema PS, Jaiswal N, Nag A. FoxM1: Repurposing an oncogene as a biomarker. *Semin Cancer Biol*, 2018;52(Pt 1):74-84.
- Newcomb EW, Ali MA, Schnee T, Lan L, Lukyanov Y, Fowkes M, Miller DC, Zagzag D. Flavopiridol downregulates hypoxia-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human glioma cells by a proteasome-independent pathway: implications for in vivo therapy. *Neuro Oncol*, 2005;7(3):225-35.
- Newcomb EW, Tamasdan C, Entzminger Y, Alonso J, Friedlander D, Crisan D, Miller DC, Zagzag D. Flavopiridol induces mitochondrial-mediated apoptosis in murine glioma GL261 cells via release of cytochrome c and apoptosis inducing factor. *Cell Cycle*, 2003;2(3):243-50.
- Newcomb EW, Tamasdan C, Entzminger Y, Arena E, Schnee T, Kim M, Crisan D, Lukyanov Y, Miller DC, Zagzag D. Flavopiridol inhibits the growth of GL261 gliomas in vivo: implications for malignant glioma therapy. *Cell Cycle*, 2004;3(2):230-4.
- Obacz J, Avril T, Le Reste PJ, Urra H, Quillien V, Hetz C, Chevet E. Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma-From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Sci Signal*, 2017;10(470):eaal2323.
- Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005;64(6):479-89.

- Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol*, 2016;18(suppl_5):v1-v75.
- Özduman K, Hacıhanefioğlu M, Pamır MN. Glioblastom. *Türk Nöroşir Derg*, 2019;29(3):305-334.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 2008;321(5897):1807-12.
- Pawlowska E, Szczepanska J, Szatkowska M, Blasiak J. An Interplay between Senescence, Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Multiforme-Role in Pathogenesis and Therapeutic Perspective. *Int J Mol Sci*, 2018;19(3):889.
- Pearson JRD, Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Signal Transduct Target Ther*, 2017;2:17040.
- Peñaranda Fajardo NM, Meijer C, Krut FA. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. *Biochem Pharmacol*, 2016;118:1-8.
- Peñaranda-Fajardo NM, Meijer C, Liang Y, Dijkstra BM, Aguirre-Gamboa R, den Dunnen WFA, Krut FAE. ER stress and UPR activation in glioblastoma: identification of a noncanonical PERK mechanism regulating GBM stem cells through SOX2 modulation. *Cell Death Dis*, 2019;10(10):690.
- Pisapia DJ. The Updated World Health Organization Glioma Classification: Cellular and Molecular Origins of Adult Infiltrating Gliomas. *Arch Pathol Lab Med*, 2017 Dec;141(12):1633-1645.
- Porter AB, Lachance DH, Johnson DR. Socioeconomic status and glioblastoma risk: a population-based analysis. *Cancer Causes Control*, 2015;26(2):179-185.

- Ramirez MU, Hernandez SR, Soto-Pantoja DR, Cook KL. Endoplasmic Reticulum Stress Pathway, the Unfolded Protein Response, Modulates Immune Function in the Tumor Microenvironment to Impact Tumor Progression and Therapeutic Response. *Int J Mol Sci*, 2019;21(1):169.
- Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(13):932-41.
- Saisomboon S, Kariya R, Vaeteewoottacharn K, Wongkham S, Sawanyawisuth K, Okada S. Antitumor effects of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, on human cholangiocarcinoma in vitro and in an in vivo xenograft model. *Heliyon*, 2019;5(5):e01675.
- Scheurer ME, Amirian ES, Davlin SL, Rice T, Wrensch M, Bondy ML. Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies. *Int J Cancer*, 2011;129(9):2290-6.
- Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006;2(9):494-503.
- Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*, 2016;73(1):79-94.
- Sedlacek H, Czech J, Naik R, Kaur G, Worland P, Losiewicz M, Parker B, Carlson B, Smith A, Senderowicz A, Sausville E. Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *Int J Oncol*, 1996;9(6):1143-68.
- Seydel GŞ, Aksoy K. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2012;221-235.
- Shah V, Kochar P. Brain Cancer: Implication to Disease, Therapeutic Strategies and Tumor Targeted Drug Delivery Approaches. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2018;13(1):70-85.
- Shao X, Gao D, Wang Y, Jin F, Wu Q, Liu H. Application of metabolomics to investigate the antitumor mechanism of flavopiridol in MCF-7 breast cancer cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016;1025:40-7.

- Shergalis A, Bankhead A 3rd, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacol Rev*, 2018;70(3):412-445.
- Shi Y, Wang S, Wu J, Jin X, You J. Pharmaceutical strategies for endoplasmic reticulum-targeting and their prospects of application. *J Control Release*, 2020;329:337-352.
- Sisinni L, Pietrafesa M, Lepore S, Maddalena F, Condelli V, Esposito F, Landriscina M. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Breast Cancer: The Balance between Apoptosis and Autophagy and Its Role in Drug Resistance. *Int J Mol Sci*, 2019;20(4):857.
- Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J Cell Physiol*, 2017;232(11):2977-2984.
- Song S, Tan J, Miao Y, Zhang Q. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J Cell Physiol*, 2018; 233:3867-3874.
- Sonoda Y. Clinical impact of revisions to the WHO classification of diffuse gliomas and associated future problems. *Int J Clin Oncol*, 2020;25(6):1004-1009.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005;352(10):987-96.
- Sureda A, Alizadeh J, Nabavi SF, Berindan-Neagoe I, Cismaru CA, Jeandet P, Łos MJ, Clementi E, Nabavi SM, Ghavami S. Endoplasmic reticulum as a potential therapeutic target for covid-19 infection management? *Eur J Pharmacol*, 2020;882:173288.

- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress- induced apoptosis. *EMBO Rep*, 2006;7:880-5.
- Tan AR, Yang X, Berman A, Zhai S, Sparreboom A, Parr AL, Chow C, Brahim JS, Steinberg SM, Figg WD, Swain SM. Phase I trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in combination with docetaxel in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2004;10(15):5038-47.
- Tao W, Zhang A, Zhai K, Huang Z, Huang H, Zhou W, Huang Q, Fang X, Prager BC, Wang X, Wu Q, Sloan AE, Ahluwalia MS, Lathia JD, Yu JS, Rich JN, Bao S. SATB2 drives glioblastoma growth by recruiting CBP to promote FOXM1 expression in glioma stem cells. *EMBO Mol Med*, 2020;12(12):e12291.
- Tea MN, Poonnoose SI, Pitson SM. Targeting the Sphingolipid System as a Therapeutic Direction for Glioblastoma. *Cancers (Basel)*, 2020;12(1):111.
- Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014;23(10):1985-96.
- Tsai SF, Tao M, Ho LI, Chiou TW, Lin SZ, Su HL, Harn HJ. Isochailactone-induced DDIT3 causes ER stress-PERK independent apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncotarget*, 2017;8(3):4051-4061.
- Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2014;18(5):307-12.
- Urrea H, Dufey E, Avril T, Chevet E, Hetz C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer*, 2016;2(5):252-262.
- Ünal TD, Hamurcu Z, Delibaşı N, Çınar V, Güler A, Gökçe S, Nurdinov N, Ozpolat B. Thymoquinone Inhibits Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Cells by Suppressing Autophagy and Beclin-1 and LC3. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020.
- Van Meir EG, Hadjipanayis KG. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*, 2010;60(3):166-93. 2010.

- Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol*, 2016;18(1):16-26.
- Wang J, Li W, Zhao Y, Kang D, Fu W, Zheng X, Pang X, Du G. Members of FOX family could be drug targets of cancers. *Pharmacol Ther*, 2018;181:183-196.
- Wang Q, Wang Z, Li G, Zhang C, Bao Z, Wang Z, You G, Jiang T. Identification of IDH-mutant gliomas by a prognostic signature according to gene expression profiling. *Aging (Albany NY)*, 2018;10(8):1977-1988.
- Wang Z, Zhang S, Siu TL, Huang S. Glioblastoma multiforme formation and EMT: role of FoxM1 transcription factor. *Curr Pharm Des*, 2015;21(10):1268-71.
- Wu F, Chai RC, Wang Z, Liu YQ, Zhao Z, Li GZ, Jiang HY. Molecular classification of IDH-mutant glioblastomas based on gene expression profiles. *Carcinogenesis*, 2019;40(7):853-860.
- Yuan AL, Meode M, Tan M, Maxwell L, Bering EA, Pedersen H, Willms J, Liao J, Black S, Cairncross JG, Blough MD. PARP inhibition suppresses the emergence of temozolomide resistance in a model system. *J Neurooncol*, 2020;148(3):463-472.
- Zhao M, van Straten D, Broekman MLD, Pr  at V, Schiffelers RM. Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma. *Theranostics*, 2020;10(3):1355-1372.
- Zhu H. Forkhead box transcription factors in embryonic heart development and congenital heart disease. *Life Sci*, 2016; 144: 194-201.
- Zocchi L, Wu SC, Wu J, Hayama KL, Benavente CA. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol (alvocidib) inhibits metastasis of human osteosarcoma cells. *Oncotarget*, 2018;9(34):23505-23518.
- Zona S, Bella L, Burton MJ, Nestal de Moraes G, Lam EW. FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim Biophys Acta*, 2014;1839(11):1316-22.

Sayı: 68742022- 604.01.02-110
Konu: Değerlendirme Onay

24/07/2019

Sayın; Doç. Dr. Zühal HAMURCU;

“İzosütrat Dehidrogenaz (IDH) Geninde Mutasyon Taşıyan ve Taşımayan Glioblastoma Hücrelerinde Flavopiridolün Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisinin Araştırılması” başlıklı projenizin Merkezimiz Genom Biriminde yapılması uygun bulunmuştur.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.



İZOSİTRAT DEHİDROGENAZ (IDH) GENİNDE MUTASYON TAŞIYAN VE TAŞIMAYAN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE FLAVOPİRİDOLÜN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

%**5**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.ejmanager.com

İnternet Kaynağı

%**2**

2

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

%**2**

3

ERGİN, Kemal and GÖKMEN, Esra.
"Endoplasmic Reticulum Stress and Pancreatic
Cancer", Galenos Yayınevi, 2015.

Yayın

%**1**

4

AVŞAR, Timuçin and KILIÇ, Türker. "Yüksek
Gradeli Gliomların Moleküler Biyolojisi", Türk
Nöroşirürji Derneği, 2017.

Yayın

<%**1**

5

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.logosyayincilik.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Ahsen GÜLER

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri:

Medeni Durumu:

Tel: +

email:

EGİTİM

Derece

Yüksek Lisans

Lisans

Lise

Kurum

ERÜ Tıbbi Biyoloji ABD

NNYÜ Beslenme ve Diyetetik

Sema Yazar Anadolu Lisesi

Mezuniyet Tarihi

2018-halen

2017

2013

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

- Ünal TD, Hamurcu Z, Delibaşı N, Çınar V, **Güler A**, Gökçe S, Nurdinov N, Özpolat B. Thymoquinone Inhibits Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Cells by Suppressing Autophagy and Beclin-1 and LC3. Anticancer Agents Med Chem, 2020.
- Nurdinov N, Çınar V, **Güler A**, Gökçe Yılmaz S, Delibaşı N, Hamurcu Z. LC3 and Beclin-1 as Markers of Autophagic Activity in Breast Cancer Erciyes Med J. Ahead of Print: EMJ-99997.
- Nesrin Delibaşı, Zuhale Hamurcu, Venhar Çınar, Nursultan Nurdinov, **Ahsen Güler**, Bülent Özpolat. Yumurtalık Kanseri Hücrelerinde Otofajik Aktivitenin Rolü. 7.

Moleküler Kanser Araştırma ve 1. Temel Onkoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 11-14 Ekim 2018, İzmir, Türkiye. (poster)

4. **Güler A.**, Erginsoy A., Yavuz G., Yar Ö., Tosunbayraktar R. Hemodiyaliz Hastalarının Beslenme Durumunun Değerlendirilmesi. Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri VI. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. 11-13 Mayıs 2017. Ankara, Türkiye. (poster)

5.Yavuz G., Erginsoy A., **Güler A.**, Tosunbayraktar R., Yar Ö. Hemodiyaliz Alan Böbrek Hastalarının Yaşam Kalitelerinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri VI. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. 11-13 Mayıs 2017. Ankara, Türkiye. (poster)

6.Yavuz G., Erginsoy A., **Güler A.**, Tosunbayraktar R., Yar Ö. Hemodiyaliz Hastalarının Sosyo-Ekonomik ve Demografik Özelliklerinin ve Antropometrik Bilgilerinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri VI. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. 11-13 Mayıs 2017. Ankara, Türkiye.

7.Soylu M, Yaşar Y, Başmısırlı E, Yar Ö, Yavuz G, **Güler A**, Neriman İnanç. Sağlıklı Beslenmeye Engel Yok: Görme Engelli Çocukların Beslenme ve Sağlık Durumlarının Geliştirilmesi. Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri VI. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. 11-13 Mayıs 2017, Ankara, Türkiye. (poster)