

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

HİPOKSİNİN MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE WIP1
FOSFATAZ VE ‘DNA HASARI CEVABININ’ REGÜLASYONU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

HATİCE PİLEVNELİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-18007 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Hatice PİLEVNELİ tarafından hazırlanan “Hipoksinin meme kanseri hücre dizisinde Wip1 fosfataz ve ‘DNA hasarı cevabının’ regülasyonu üzerine etkilerinin araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/08/2019

Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Prof. Dr. Nezih MEYDAN

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit Kum

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin öncesinde ve süresince bana Tübitak bursu imkanı sağlayan, yollarımız kesiştiği için kendimi daima şanslı hissettim ve hissedeceğim, danışman hocam olan ancak benim için danışmanlıktan öte olan ve bana maddi manevi desteğini hiç esirgmeden yanımda duran Sayın Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e sonsuz teşekkür ediyorum.

Tezimi değerlendirilmeleri ve vermiş oldukları tavsiyeler başta olmak üzere yoğun çalışmalarına rağmen tez jüriliğini kabul ederek beni onurlandıran Sayın Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI ve Sayın Prof. Dr. Nezih MEYDAN hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda kullandığım madde ve materyallerin bir kısmını yüce gönüllülükle veren Sayın. Doç. Dr. Bekir ÇÖL, Sayın Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Arzu ATALAY hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmam sırasında laboratuvarlarından faydalandığım Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez süresince beni yalnız bırakmayan ve manevi desteklerini esirgemeyen, varlıklarıyla beni şanslı kılan arkadaşlarım Burçin İrem ABAS, Ceylan AK, Alime SARI, Gizem BAŞARAN, Tuğba Çelik SAMANCI, Nur Betül KARTAL ve Elmas Özge CODA'ya teşekkür ederim.

Bu zamana kadar beni yetiştiren, maddi manevi destekleyen, beni hiçbir konuda yalnız bırakmayan annem/ babam Demet/ Yalçın PİLEVNELİ, babaannem Necla PİLEVNELİ, dedem merhum Adil PİLEVNELİ, anneannem/ dedem Hacer/ Ertan ÇAKAR, amcam/ yengem Cengiz/ Hacer PİLEVNELİ, kuzenim Zeynep PİLEVNELİ ve hayatıma 2 yıl önce giren yaşama sevincim olan kardeşim Meryem'e teşekkür ederim.

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi TPF-18007 nolu proje ile çalışmamı desteklediği için teşekkür ederim.

Bursiyer olarak yer aldığım yürütücülüğünü Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'in yapmış olduğu 214S200 no'lu 1001 projesi kapsamında finansal destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Normoksi ve Hipoksi	4
2.1.1. Hipoksi ve HIFler	4
2.1.2. HIF1- α 'nın Transkripsiyonunu Sağladığı Hedef Genler	7
2.1.3. Hipoksi ve DNA Hasarı Cevabı	9
2.2.2. DNA Hasarı Cevabı	10
2.3. Wip1 Fosfataz	12
2.3.1. Wip1 Fosfatazın DNA Hasarı Cevabındaki Rolü	13
2.4. Çalışmanın Yapılmasının Amacı	19
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Dizisi	21
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar	21
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Antikorlar	22
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	22
3.1.4. Kullanılan Kitler ve Problar	23
3.1.5. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	24
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması	24
3.2.3. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği	25
3.2.4. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması	25
3.2.5. Hücrelerin Sayım Yöntemi	25
3.2.6. İlaç Stoklarının Hazırlanması	26
3.2.7. Hücrelerin İnkübasyon Koşullarının Hazırlanması	26
3.2.8. Hücre Kültürü Çalışmalarının ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanışı	27

3.2.8.1. MCF-7 hücre hattında apoptozisin indüklendiği çalışmaların hazırlanışı.....	27
3.2.8.2. MCF-7 hücre hattında senesensin indüklendiği çalışmaların hazırlanışı	28
3.2.8.3. Wst-1 testi.....	28
3.2.8.4. SA- β -Galaktozidaz boyama testi	29
3.2.8.5. Annexin V apoptozis testi	30
3.2.8.6. Hücre döngüsü testi	30
3.2.8.7. H2A.X testi.....	31
3.2.8.8. Western Blot analizi için yapılan çalışmalar	32
3.2.8.8.1. Protein izolasyonu	32
3.2.8.8.2. Protein miktar tayini	32
3.2.8.8.3. Western Blot analizi	33
3.2.8.8.3.1. Poliakrilamid jelin (SDS-PAGE) hazırlanması	33
3.2.8.8.3.2. Jele yüklenecek protein örneklerinin hazırlanması	34
3.2.8.8.3.3. Elektroforetik yürütme işlemi.....	34
3.2.8.8.3.4. Yarı-kuru transfer (semi-dry blotting).....	35
3.2.8.8.3.5. Membranı bloklama işlemi	35
3.2.8.8.3.6. Membranın primer antikor ile muamelesi	35
3.2.8.8.3.7. Membranın sekonder antikor ile muamelesi	36
3.2.8.8.3.8. Kemilüminesans yöntem ile membranı görüntüleme.....	36
3.2.8.9. DNA izolasyonu	37
3.2.8.10. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	37
3.2.8.10.1. PCR örneklerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi	39
3.2.8.10.2. PCR örneklerinin Sanger sekanslama yöntemiyle sekanslanması	40
3.2.8.11. Real Time PCR analizi (q-PCR).....	40
3.2.8.11.1. Taqman gen kopya sayısı analizi	40
3.2.8.12. Total RNA izolasyonu	42
3.2.8.12.1. İzole edilen RNAlara DNaz muamelesi	42
3.2.8.13. Gen ekspresyon analizi.....	43
3.2.8.13.1. Komplementer DNA(cDNA)sentezi	43
3.2.8.13.2. Gen ekspresyon seviyesinin q-PCR ile belirlenmesi.....	43
3.2.8.14. Floresan in-situ hibridizasyon(FISH) analizi	44
3.2.8.14.1. MCF-7 hücresinin parafine gömülmesi	44
3.2.8.14.2. MCF-7 hücresinin hematoksilin-eozinle boyanması	45

3.2.8.14.3. MCF-7 hücresinin FISH analizi	45
3.2.9. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi.....	47
4. BULGULAR	48
4.1. MCF-7 Hücrelerinde <i>PPM1D</i> /Wip1'in Gen Kopya Sayısı Analizi Düzeyi.....	48
4.2. MCF-7 Hücrelerinde Wip1'in FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) Yöntemiyle Gösterilmesi.....	48
4.3. MCF-7 PCR ve Sekans Sonuçları	50
4.4. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında MCF-7 Hücrelerinde Wip1 mRNA Düzeyi.....	55
4.5. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında MCF-7 Hücrelerinde HIF1- α mRNA düzeyi.....	57
4.6. MCF-7 Hücrelerinin Normoksi ve Hipokside Wip1'in GSK2830371 Tarafından İnhibisyonu	57
4.7. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında GSK2830371 ve Doksorubisine Uygulamasının MCF-7 Hücreleri Üzerinde Etkileri.....	58
4.7.1. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 24 Saat GSK2830371 ve Doxorubicin Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	59
4.7.2. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 24 Saat GSK2830371 ve Doxorubicin Uygulamasının Apoptotik etkileri	61
4.7.3. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine Uygulamasının Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri.....	69
4.8. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 72 Saat GSK2830371 ve Doksorubisine Uygulamasının MCF-7 Hücrelerinde Senesens İndükleyici Etkileri	74
4.8.1. SA- β -Galaktosidaz Boyaması	74
4.8.2. H2A.X Analizi	76
4.8.3. Hücre Döngüsü Analizi	80
4.8.4. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 24 saat Doxorubicine veya GSK2830371 ve Doksorubisine Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde DDR Analizi.....	85
4.8.5. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 72 saat Doxorubicine veya GSK2830371 ve Doksorubisine Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde DDR Analizi.....	92
5. TARTIŞMA	98
5.1. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında MCF-7 Hücrelerinde Wip1 Düzeyi.....	101
5.2. MCF-7 Hücrelerinde Normoksi ve Hipokside Wip1'in GSK2830371 Tarafından İnhibisyonu	102
5.2.1. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında GSK2830371 ve Doxorubicin Uygulamasının MCF-7 Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri.....	104
5.2.2. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında GSK2830371 ve Doxorubicin Uygulamasının MCF-7 Hücrelerinde Apoptotik etkileri	106
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	113
KAYNAKLAR	115
ÖZGEÇMİŞ.....	127

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A°	: Amper
ADM	: Adrenomedullin
ATM	: Ataxia telangiectasia mutated kinase
ATR	: Ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase
β- aktin	: Beta Aktin
Bax	: Apoptoz uyarıcı Bcl2 aile üyesi X proteini
Bcl2	: B hücreli lenfoma 2 (pro ve anti apoptotik etkili gen ailesi)
Bcl_{XL}	: Apoptoz engelleyici Bcl2 aile üyesi
BSA	: Bovin serum albumin
c-MYC	: Hücresel Myelositomatozis
cDNA	: Komplamenter DNA
Chk1	: Kontrol noktası kinazı 1
Chk2	: Kontrol noktası kinazı 2
CRE	: Siklik adenoazin yanıt elemanı
CREB	: CRE bağlanma proteini
DDR	: DNA hasarı cevabı
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E2F	: Transkripsiyon uzama faktörü 2
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
ERα	: Östrojen reseptörü alfa
EPO	: Eritropoetin

ERK	: Ekstraselüler sinyalle regüle olan kinaz (Extracellular-signal-regulated kinase)
FBS	: Fetal bovin serum
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz
GLUT1/3	: Glukoz transporter 1/ Glukoz transporter 3
H2AX	: Histon protein 2A.X
HK1/2	: Hekzokinaz 1/ 2
HR	: Homolog rekombinasyon
I.R.	: İyonize radyasyon
ID2	: DNA bağlanma inhibitörü 2 (inhibitor of DNA binding 2)
IGF2	: İnsülin benzeri büyüme faktörü (insulin like growth factor 2)
IGF-BP1,2,3	: İnsülin benzeri büyüme faktörüne bağlanan protein 1/ 2/ 3
JNK	: j-cun N-terminal kinaz
LDHA	: Laktat dehidrogenaz A
LEP	: Leptin
LRP1	: LDL reseptörüyle ilişkili protein 1 (LDL receptor related protein 1)
m-TOR	: Rapamisinin memelilerdeki hedefi (Mammalian target of rapamycin)
MAPK	: Mitojenle etkinleştirilen protein kinaz
MDM2	: Mouse double minute 2
MEF	: Mouse embriyonik fibroblastı
mmHg	: Milimetre Civa
µm	: Mikro metre
µM	: Mikro molar
mRNA	: Mesajcı RNA
miRNA	: Mikro RNA
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B

NOS/NOS2	: Nitrit oksit sentetaz / Nitrit oksit sentetaz 2
O₂	: Oksijen
P53	: Tümör protein 53
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	: Fosfotidilinositol-3-kinaz
PKM	: Pirüvat kinaz
PPM1D	: Protein fosfataz 1D magnezyum bağımlı
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
qPCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RAP1	: Represör/ Aktivatör bölgesine bağlanan protein
Ras	: Küçük GTP bağlayıcı protein
RIF1	: RAP1 ile ilişkili protein
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen
RUNX2	: RUNT ilişkili transkripsiyon faktörü 2
TGF-α	: Transforme edici büyüme faktörü alfa (transforming growth factor alpha)
TGFβ-3	: Transforme edici büyüme faktörü beta 3 (transforming growth factor beta 3)
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
TP53	: Tümör protein 53 geni
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
Wip1	: Wild type p53 indüklü fosfataz 1
wt	: Yabanıl tip (wild type)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. bHLH-PAS ailesiyle ilişkili proteinlerin fonksiyonel domainleri (Masoud ve Li, 2015)	5
Şekil 2. HIF-1 α aktivitesinin O ₂ bağımlı regülasyonu (Wigerup ve ark, 2016).....	7
Şekil 3. HIF1- α 'nın hedef genleri (Semenza, 2003)	8
Şekil 4. DNA hasarı cevabı elemanları ve rolleri (Weil, 2015).....	11
Şekil 5. Wip1'in defosforilasyonunda rol aldığı hedef proteinler (Lu ve ark, 2008).....	13
Şekil 6. Wip1 fosfatazın p53 inhibisyonu için hedeflediği proteinler (Lu ve ark, 2008).....	14
Şekil 7. Taqman gen kopya sayısı analizinde kullanılan örnek dizilimi	40
Şekil 8. MCF-7 ve BJ hücre dizisinde <i>PPM1D</i> gen kopya sayısı.....	48
Şekil 9. MCF-7 hücresi kesitisinin Hematoksilen & Eozin boyama görüntüsü (40X).....	49
Şekil 10. MCF-7 hücre dizisi FISH analiz sonucu görüntüsü	49
Şekil 11. MCF-7 hücre dizisinin negatif kontrolünün FISH analiz sonucu görüntüsü	50
Şekil 12. Tüm ekzonlar PCR sonucu agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 13. Normoksik şartlar altında MCF-7 hücre dizisinde Wip1 mRNA düzeyi	55
Şekil 14. Hipoksik şartlar altında MCF-7 ve BJ hücre dizisinde Wip1 mRNA düzeyi	56
Şekil 15. Normoksi ve hipokside MCF-7 hücre dizisinde HIF1- α 'nın mRNA düzeyi	57
Şekil 16. MCF-7 hücresinin 24 saat GSK2830371 tarafından Wip1 inhibisyonu ve 4 saat kobalt inkübasyonu sonucu protein düzeyi	58
Şekil 17. Normokside ve hipokside 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri	60
Şekil 18. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat muamele edilen MCF-7 hücresinin ışık mikroskopunda görünümü (10X).....	60
Şekil 19. Normokside 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptoz miktarı	61
Şekil 20. Hipokside 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptoz miktarı	63
Şekil 21. Normoksik ve Hipoksik 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptoz miktarı	64
Şekil 22. Normoksik 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık miktarı	65

Şekil 23. Hipokside 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık miktarı.....	67
Şekil 24. Normoksik ve hipoksik 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık miktarı	68
Şekil 25. Normoksi ve hipokside 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde canlılık ve total apoptoz miktarı.....	69
Şekil 26. Normokside 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı.....	70
Şekil 27. Normokside 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı kümülatif grafiği	71
Şekil 28. Hipoksik ortamda 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı.....	72
Şekil 29. Hipoksik ortamda 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı kümülatif grafiği.....	74
Şekil 30. Normoksik ortamda inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde 72 saat GSK ve Doxo uygulamasına cevaben SA- β galaktosidaz boyaması mikroskop görüntüsü (10X)	75
Şekil 31. Hipoksik ortamda inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde 72 saat GSK ve Doxo uygulamasına cevaben SA- β galaktozidaz boyaması mikroskop görüntüsü (10X)	76
Şekil 32. Normoksik ortamda 72 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin H2A.X analizi grafiği.....	77
Şekil 33. Hipoksik ortamda 72 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin H2A.X analizi grafiği.....	79
Şekil 34. Normoksik ve hipoksik ortamda 72 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin H2A.X analizi grafiği	80
Şekil 35. Normoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü histogram profilleri	82
Şekil 36. Hipoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü histogram profilleri	83
Şekil 37. Normoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü grafiği	84

Şekil 38. Hipoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü grafiği	84
Şekil 39. Normoksik ve hipoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü grafiği	85
Şekil 40. Normoksik şartlarda 24 saat inkübe edilen hücrelerde DDR aktivasyonu	88
Şekil 41. Hipoksik şartlarda 24 saat inkübe edilen hücrelerin DDR aktivasyonu	91
Şekil 42. Normoksik şartlarda 72 saat inkübe edilen hücrelerin DDR yanıtı	94
Şekil 43. Hipoksik şartlarda 72 saat inkübe edilen hücrelerin DDR yanıtı.....	97
Şekil 44. 24 saatlik Western Blot sonuçlarının karşılaştırılmalı olarak işaretel tablosu ...	108
Şekil 45. 72 saatlik Western Blot sonuçlarının karşılaştırılmalı olarak işaretel tablosu	112



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan kimyasalların ve besiyerinin listesi.....	21
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan antikorların listesi	22
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan malzemelerin listesi	22
Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan kitlerin ve problemlerin listesi	23
Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve aletlerin listesi.....	23
Tablo 6. Çalışmada kullanılan hücrenin özellikleri ve tipi	24
Tablo 7. Paketleyici ve ayırıcı jelin içeriği ve miktarları	34
Tablo 8. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon katsayıları	36
Tablo 9. Kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyon katsayıları	36
Tablo 10. Wip1 ekzonlarına spesifik primerler (Kleiblova ve ark, 2013)	38
Tablo 11. Ekzonlara spesifik PCR koşulları.....	39
Tablo 12. 1X Gen kopya sayısı assay için hazırlanan ‘Master Mix’ içeriği	41
Tablo 13. Taqman gen kopya sayısı analizinde kullanılan döngü.....	41
Tablo 14. RT-PCR için hazırlanan 1X ‘Master Mix’	43
Tablo 15. q-PCR işleminde kullanılanlar ve miktarları	44
Tablo 16. PCR aşamaları ile bu aşamalarındaki sıcaklık miktarları ve bekleme süreleri	44
Tablo 17. Normoksik koşullarda 24 saat ilaçla muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptotik değerlerinin istatistik sonuçları	62
Tablo 18. Hipoksik koşullarda 24 saat ilaçla muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptotik değerlerinin istatistik sonuçları	64
Tablo 19. Normoksik koşullarda 24 saat ilaçla muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık değerlerinin istatistik sonuçları	66
Tablo 20. Hipoksik koşullarda 24 saat ilaçla muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık değerlerinin istatistik sonuçları	67
Tablo 21. Normokside MCF-7 hücre döngüsü faz oranları	70
Tablo 22. Hipoksi gruplarının hücre döngüsü faz oranları	73
Tablo 23. Normoksi gruplarının H2A.X analizi sonuçları.....	78
Tablo 24. Hipoksi gruplarının H2A.X analizi sonuçları	79
Tablo 25. Normoksi gruplarının hücre döngüsü faz oranları	81
Tablo 26. Hipoksi gruplarının hücre döngüsü faz oranları	81

ÖZET

HIPOKSİNİN MEME KANSERİ HÜCRE DİZİSİNDE WİP1 FOSFATAZ VE ‘DNA HASARI CEVABININ’ REGÜLASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

PİLEVNELİ H. 2019, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019

Solid tümörlerin karakteristiği olarak bilinen tümör hipoksisi radyoterapi ve kemoterapiye direnç oluşturmakta ve tipik olarak kötü prognozla da ilişkili olarak görülmektedir.

PPM1D/Wip1 fosfataz (Protein phosphatase 1D magnesium dependent/wild type p53 induced phosphatase) özellikle genotoksik stresle p53’e bağlı olarak indüklenir ve DNA hasarı sonrası, p53’ün ATM/ATR kinazlarca başlatılan aktivasyonunu kapatmada önemli rol oynayarak DNA hasarı cevabını (DDR) sonlandırır. Wip1 aşırı ifade edildiğinde onkogen özelliği kazanmakta ve DDR ile p53’e bağlı tümör süpresör cevapları (apoptozis ve senesens) inhibe edebilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda hipoksi koşullarının Wip1 fosfatazi aşırı ifade eden tümörlerde DDR’nin regülasyonunu ve kemoterapiye cevabı nasıl etkilediği konusunda hemen hemen hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle Wip1 fosfatazi aşırı ekspresse ettiği bilinen meme kanseri hücre dizisi MCF-7’de hipoksi koşullarında Wip1’in inhibitörü GSK2830371 (GSK) ile baskılanmasının DNA hasarı cevabının regülasyonunda ve kemoterapötik ajan Doksorubisin’le birlikte apoptozis ve senesens üzerine etkileri araştırılmıştır. MCF-7 hücrelerinde GSK+Doksorubisin uygulamasının hem normoksik hem de hipoksik koşulda sinerjistik etki göstererek apoptozis ve senesensi DDR’ın önemli elemanlarından γ H2AX fosforilasyonunu takiben Chk2-p53-p21 aktivasyonu ile artırdığı ve hücre döngüsünün S fazında belirgin bir artış sağladığı tespit edilmiştir. Bu veriler GSK’nın Wip1’i aşırı ifade eden hipoksik tümörlerde de oldukça iyi bir kombinasyon ajanı olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA hasarı cevabı, Hipoksi, MCF7, Meme kanseri, Wip1 fosfataz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF HYPOXIA ON REGULATION OF WIP1 PHOSPHATASE AND ‘DNA DAMAGE RESPONSE’ IN BREAST CANCER CELL LINE

PILEVNELI H. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Medicine Faculty Clinical Biology Program Master Thesis, Aydın, 2019

Tumour hypoxia, as the characteristic of solid tumours, is resistant to radiotherapy and chemotherapy and is typically associated with poor prognosis.

PPM1D / Wip1 phosphatase (Protein phosphatase 1D magnesium dependent / wild type p53 induced phosphatase) is specifically induced by p53 due to genotoxic stress and terminates the DNA damage response (DDR) by playing an important role in shutting down activation of p53 triggered by ATM/ ATR kinases. Wip1 becomes an oncogene when overexpressed and can inhibit DDR and p53-induced tumor suppressor responses (apoptosis and senescence). To date, there has been virtually no study on how hypoxia conditions affect the regulation of DDR and response to chemotherapy in Wip1 phosphatase overexpressing tumors. Therefore, the effects of suppression of Wip1 with its inhibitor GSK2830371 (GSK) under hypoxia conditions in the breast cancer cell line MCF-7, which is known to overexpress Wip1 phosphatase, were investigated on regulation of DNA damage response in apoptosis and senescence in the absence/presence of chemotherapeutic agent Doxorubicine. GSK + Doxorubicine application in MCF-7 cells showed a synergistic effect in both normoxic and hypoxic conditions and increased apoptosis and senescence with γ H2AX phosphorylation which is one of the important elements of DDR, followed by activation of Chk2-p53-p21 and caused a significant increase in the S phase of the cell cycle. These data suggest that GSK may be a good combination agent in hypoxic tumours that overexpress Wip1.

Key words: Breast cancer, DNA damage response (DDR), Hypoxia, MCF7, Wip1 phosphatase

1. GİRİŞ

Canlıların metabolik reaksiyonlarını sürdürebilmek ve gerekli olan enerji ihtiyacını karşılayabilmek için yeterli miktarda oksijene ihtiyaçları vardır (Semenza, 2012). Ökaryotlar için oksijen (O_2) homeostazı vazgeçilmez bir gerekliliktir. Bir hücrenin çevresindeki oksijen konsantrasyonu: Normoksida %21 atmosferik O_2 , fizoksida %1–13 O_2 veya hipoksida % 0.1–1 O_2 olarak tanımlanmaktadır (Soni ve Padwad, 2017).

Kanser hücreleri düzensiz hücre çoğalmasıyla karakterize edilir. Solid tümörler içinde oluşan kan damarları genellikle yapısal ve işlevsel olarak anormaldir, bu da şiddetli hipoksiye neden olur (Semenza, 2012). Hipoksi tümörögenезin mikro-çevresel bir özelliğidir (Soni ve Padwad, 2017) ve oksijen koşullarına adapte olan tümör hücrelerinde büyüme için de genel bir avantaj sağlandığı bilinmektedir (Bristow ve Hill, 2008). Hipoksi aynı zamanda apoptosize dirence, DNA onarımını baskılayarak mutagenез oranlarının artmasına, kromatin yapısının bozulmasına ve dolayısıyla genetik instabiliteye yol açar (Bristow ve Hill, 2008). Tümör hipoksisi, kemoterapi ve radyoterapiye karşı dirence de yol açar ve kötü prognozla da ilişkili olduğu bilinmektedir.

Hipoksida hücrelerdeki oksijen homeostazını düzenleyen major transkripsiyon faktörü olarak ‘Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1’ (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) görev yapar. Heterodimerik bir protein olan HIF-1’in konstitütif olarak eksprese edilen β alt biriminin yanı sıra oksijen konsantrasyonu ile düzenlenen bir de α alt birimi bulunmaktadır. HIF-1 α , hücrenin hipoksiye karşı tepkisinin ana düzenleyicisi olarak oksijen konsantrasyonları değiştikçe homeostazın korunmasında ve adaptasyonunda rol oynayan onlarca genin ekspresyonundan ve kontrolünden sorumludur (Conde ve ark, 2012). HIF-1 α ; hücre çoğalması, apoptoz, metabolizma, immün tepki, genomik instabilite, vaskülarizasyon, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere tümörögenезde etkili bir çok hücreyel yanıtta önemli rol oynar (Wigerup ve ark, 2016).

Ökaryotik hücrelerde genomik stabilitenin sürdürülmesi için herhangi bir DNA hasarı meydana geldiğinde DNA tamirinin devreye girmesi için korunmuş bir DNA hasarı yanıtı (DNA Damage Response, DDR) bulunur. Bu yanıt aynı zamanda hücre içerisinde tümör baskılayıcı bir bariyer olarak görev yapmaktadır (Marechal ve Zou, 2013). DDR’nin tetiklenmesiyle fosforilasyon yoluyla aktive olan bir dizi sinyal kaskadı başlatılır. Hücrede DNA hasarı algılandığında ATM/ATR, Chk2/Chk1 kinazların aktivasyonu ve takiben p53’ün hızlı aktivasyonu sağlanır. p53 hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamiri

apoptozis ve hücrel senesense aracılık eden çok sayıda genin transkripsiyonel aktivasyonunu da sağlar (Bartek ve ark, 2007). DDR'de p53 tarafından başlatılan DNA onarım işleminin bitirilmesiyle bu hücrelerde, hücre döngüsünün tekrar başlatılabilmesi için p53'ün fosforilasyon düzeyini azaltarak görev yapan fosfatazlar da yer almaktadır. Bir Serin/Treonin (Ser/Thr) fosfataz olan *PPM1D/Wip1* p53'ün fosforilasyon düzeyini doğrudan ve dolaylı olarak azaltan ve p53'e de bağlı olarak indüklenen en önemli fosfatazdır (Fiscella ve ark, 1997). Wip1 özellikle genotoksik stresle indüklenen bir fosfataz olup defosforilasyon yoluyla inaktive ettiği hedefleri arasında ATM, ATR, H2A.X, p53 ve p38/MAPK gibi DDR'in önemli elemanları bulunmaktadır. Bir proto-onkogen olan ve Wip1'i kodyalan *PPM1D* geninin özellikle yabanıl tip (wild type, wt) p53'e sahip insan tümörlerinde (meme, ovaryum, kolon, pankreas, meduloblastoma, glioblastoma ve nöroblastoma) aşırı ekspresyonu, anormal amplifikasyonu ve mutasyona uğramasıyla onkogen özellik kazandığı ve tümörogenezi teşvik ettiği bilinmektedir (Pechackova ve ark, 2017). Onkogen özellik kazanan Wip1 hücrel stres cevaplarını (apoptoz, senesens ve hücre döngüsünün tutuklanması gibi) negatif yönlü olarak regüle ederken (Lowe ve ark, 2012), bir hücrel sağ kalım mekanizması olan otofajiyi ise teşvik etmektedir (Torii ve ark, 2016). Dolayısıyla regülasyonu bozulmuş olan Wip1 fosfataz kanserlerde kemoterapiye cevabı azaltmakta ve bu nedenle yapılan son çalışmalar Wip1'i kanserde teröpatik bir hedef haline getirmektedir. Wip1'in genetik ya da farmakolojik inhibitörlerle hedeflenmesi antikanser terapisi açısından rolünün ortaya çıkarılması oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda son yıllarda farklı insan kanser türlerinde Wip1'in hedeflenmesine yönelik olarak çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Kong ve ark, 2009; Lowe ve ark, 2012; Parssinen ve ark, 2008; Pechackova ve ark, 2016). Ancak Wip1'in hedef alındığı çalışmalarda solid tümörlerin karakteristiği olan, kemoterapi ve radyoterapiye dirençte önemli rol oynayan tümör hipoksisinin değerlendirilmediği ve göz ardı edildiği görülmektedir. Hipoksinin DNA hasarı cevabı ve onarımı ile ilgili çok sayıda genin transkripsiyonu ve translasyonunu değiştirdiği ve DNA onarımını inhibe ettiği bilinmektedir (Olcina ve ark, 2010). Bunun yanı sıra hipoksik tümörlerde DNA hasarı yaratan ajanların normoksiye göre etkinliğinin daha düşük seviyede olduğu da bildirilmiştir (Kilic ve ark, 2007). Ancak bu durumun DNA hasarı cevabının regülasyonunda önemli rolü bulunan Wip1 fosfatazla ilişkili olup olmadığı veya onkogenik Wip1'in hipoksik koşullarda DNA hasarı cevabını ve hücrel stres cevaplarını nasıl etkilediği konusunda yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada Wip1 fosfatazın hipoksik tümörlerde;

- a) DNA hasarı cevabının regülasyonunda rolü,
- b) Hücresel stres cevaplarının regülasyonunda etkinliği ve
- c) Hedeflendiği takdirde kemoterapiye katkısının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında Wip1'i aşırı ifade ettiği ve wt p53'e sahip olduğu bilinen meme kanser hücre dizisi MCF-7 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin normoksik ve hipoksik ortamda DNA çift zincir kırığını indükleyen bir topoizomera II inhibitörü olan doksorubisin ile muamelesi sonucunda hücresel stres cevaplarından, hücre döngüsü tutuklanması, apoptozis ve senesensin indüklenip indüklenmediği test edilmiştir. Ayrıca Wip1'i inhibe ettiği bilinen küçük molekül inhibitör GSK2830371 varlığında doksorubisin indüklü hücresel cevapların normoksik ve hipoksik ortamda etkinliği test edilmiştir. Ayrıca DDR'da rol oynayan önemli proteinlerin (ATM, ATR, Chk1, Chk2, p53, BRCA-1, γ H2A.X) fosforilasyon düzeyleri de test edilmiştir. Böylece onkogenik Wip1 fosfatazın hipokside hedeflenmesinin kemoterapiye direnci önlemede bir rolü ya da katkısı olup olmadığı araştırılmıştır.

Bu çalışmanın uzun vadede ki amacı Wip1 fosfatazın özellikle hipoksik tümörlerde kemoterapötik hedef olarak potansiyelini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Normoksi ve Hipoksi

Memeli hücrelerinin, aerobik metabolizmalarını ve gerekli olan enerji mekanizmalarını gerçekleştirebilmek için oksijen hemostazını sağlamaları gerekmektedir (Semenza, 2000). Hücrenin ihtiyacı olan oksijen karşılanamadığı takdirde ortamda oksijen azlığı olarak bilinen hipoksi ortaya çıkar. Hipoksi ve normoksi arasında kesin ayırım yapılabilecek bir eşik değeri yoktur (Hockel ve Vaupel, 2001). Esasen normal oksijen basıncı (P_{O_2}) farklı dokular arasında değişkenlik gösterdiği için hipoksinin net bir tanımı da bulunmamaktadır. Örneğin, arteriyel kandaki normal oksijen basıncı $P_{O_2} \sim 100$ mm Hg ($\sim\%13$) olmasına karşın, karaciğerde ~ 40 mm Hg ($\sim\%5$) 'dir (Koh ve owis, 2012). Bununla birlikte, 8–10 mm Hg'nin ($\sim\%1$) kritik bir P_{O_2} 'yi temsil ettiği tahmin edilmektedir. P_{O_2} değerlerinin düşük olması, sınırlı oksijen tüketiminin olması sebebiyle olumsuz durumları da beraberinde getirmektedir (Wigerup ve ark, 2016).

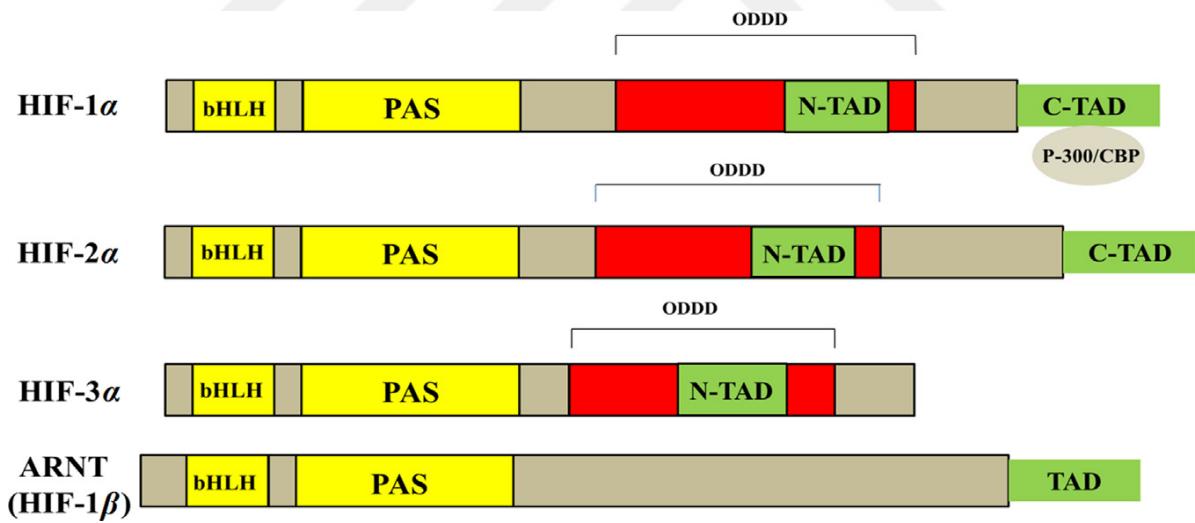
2.1.1. Hipoksi ve HIFler

Hipoksi terimi, tümörlerin yanı sıra normal dokular ve yaralarda da bulunabilen yetersiz oksijen durumunu tanımlamak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Normal oksijen seviyesi (doku normoksisi / fizoksiya), farklı organlar arasında büyük farklılıklar gösterir. Bazen belli bir dokuda düşük seviyeler bile söz konusu dokuyu desteklemek için yeterli olabilmektedir bu nedenle bu durum hipoksi ile karıştırılmamalıdır. Hipoksi, çoğu katı tümörde bir dereceye kadar, kanser hücrelerinin hızlı büyümelerinin sonucu ve yüksek oranda dağınık ve verimsiz damarlanma gibi çeşitli faktörlerin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Herhangi bir tümör içerisinde, oksijen seviyeleri son derece heterojendir ve hafif hipoksiden ($\%2 O_2$) şiddetli hipoksi ve hatta anoksi seviyelerine ($<\%0.1 O_2$) değişebilir. Solid tümörlerin hemen hemen hepsinde görülen bir karakteristik olan tümör hipoksisi, kanser tedavisine cevabın yetersiz ya da zayıf olmasıyla ilişkilendirilmiştir (Luoto ve ark, 2013).

Tümör hipoksisinin hasta prognozuna olan klinik etkisi ve önemi birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonucu, hipoksik tümör hücrelerinin, kemoterapi ve radyoterapi gibi mevcut anti kanser tedavilerine daha dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. Hipoksik hücrelerin çeşitli nedenlerle kemoterapiye dirençli olduğu gösterilmiştir. Bunlar,

ilaçların verilmesini ve yayılmasını zorlaştıran işlevsel damarların uzaklığı, hipoksik alanlardaki hücrelerin düşük proliferasyon hızları ve p53'e bağlı apoptoz kaybı için seleksiyon baskısı dahil bir çok mekanizmayı içerir. Buna ek olarak, tümörler de hipoksiye biyolojik yanıt olarak invazyon artışı ve metastaz teşvik edildiği için, tümör cerrahi olarak çıkartılsa bile, kötü sonuç öngörülür. Hipoksiye biyolojik tepkiler oldukça kapsamlı olup, kanser hücrelerinin hipoksi durumuna adaptasyonları transkripsiyonel regülasyonu etkilemekte, glikolizis ve glukoz alınımlarını artırmakta, anjiyogenezi teşvik etmekte, apoptozisi regüle etmekte, invazyon ve metastaza da yol açmaktadır. HIF, hipoksi koşullarında aktive olan en önemli transkripsiyon faktörü olup, hücrenin bu koşullara adaptasyonunu sağlamakta etkili olan çeşitli genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar (Semenza, 2012).

Esasen HIF'ler, transkripsiyon faktörleri olarak hareket ederek oksijen eksikliğini algılayan ve bunlara cevap veren proteinlerdir. Her bir HIF transkripsiyon faktörü iki alt birimden oluşmaktadır. Her ikisi de temel heliks-loop-heliks (HLH) yapısında olan ve PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS) protein ailesine ait olan α -alt birimi ve β -alt birimine sahiptir (Bersten ve ark, 2013).



Şekil 1. bHLH-PAS ailesiyle ilişkili proteinlerin fonksiyonel domainleri (Masoud ve Li, 2015)

HIF- α 'nın: HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. HIF-1 α alt birimi NH₂-terminali (N-TAD) ve COOH-terminali (C-TAD) olmak üzere iki adet transaktivasyon domaini bulundurmaktadır. Bu domainler HIF-1 α 'nın transkripsiyonel aktivitesinden sorumlu olarak kabul edilir. C- TAD, hipoksik koşullar altında CBP / p300

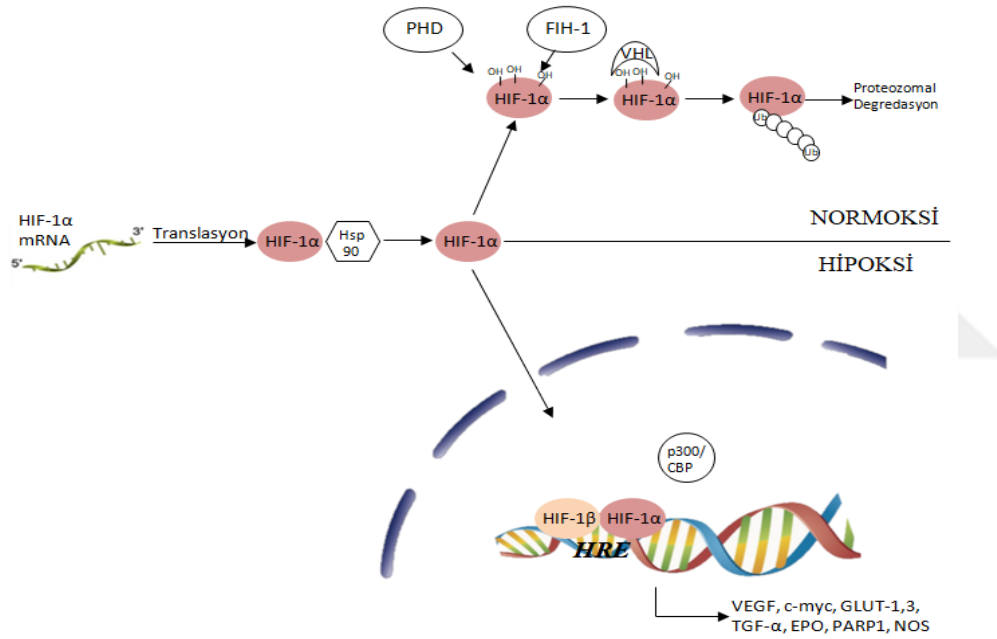
koaktivatörü ile birlikte HIF-1 α 'nın transkripsiyonunu gerçekleştirir. Üstelik, tüm HIF- α alt birimlerini HIF-1 β alt birimlerinden ayıran özellik ise α alt birimlerin hepsinde oksijene bağlı bozulma (ODD) domaini yapılarının bulunmasıdır. Ayrıca bu domainin N-TAD ile örtüşmesi bu alt birimlerin O₂ aracılı düzenlemedeki rollerini açıklamaktadır (Masoud ve Li, 2015).

HIF-1 α 'ya ek olarak, başka bir memeli bHLH-PAS proteini olan HIF-2 α (EPAS1/HRF/HLF/MOP2)'da hipoksi de rol oynamaktadır. HIF-2 α ve HIF-1 α , yapısal olarak % 48 oranında amino asit benzerliği bulunmaktadır. Hipoksik tepkilerde rol oynayan vücutta her yerde eksprese olan HIF-1 α 'nın yanı sıra HIF-2 α 'nın dokuya spesifik ekspresyonu bulunmaktadır. HIF-3 α 'nın spliced varyantı olan inhibitör PAS'ın (IPAS) keşfedilmesine kadar HIF-3 α hakkında daha az bilgi bulunmaktaydı. Bu nedenle HIF1- α hipoksi koşullarında genel olarak iş gören majör transkripsiyon faktörüdür (Hu ve ark, 2003).

Oksijen varlığında HIF1- α 'nın 402. ve 564. prolin rezidularına hidroksil grupları eklenerek prolin-4-hidroksilazlar (PHD'ler) tarafından degradasyonu teşvik edilir (Wigerup ve ark, 2016). HIF1- α 'nın hidroksilasyonu, von Hippel-Lindau (pVHL) tümör baskılayıcı proteini için bir tanıma sinyali olarak işlev görür. pVHL daha sonra da ubiquitin ekleyerek proteozomlarda HIF1- α 'nın bozunmasına sebep olmaktadır (Schofield ve Ratcliffe, 2004). VHL'nin bağlanması ayrıca 532. pozisyonundaki lizin artığı ARD1 asetiltransferaz tarafından asetilasyonu ile de desteklenir (Semenza, 2003). HIF1- α alt birimi aynı zamanda asparajinil hidroksilaz enzimi ve HIF-1'i inhibe edici faktör olan FIH-1'in substratıdır. FIH-1 tarafından C-TAD domaininde yer alan 803. asparajin rezidusu hidroksile edilir. Böylece HIF1- α 'nın CBP ve p300 koaktivatörleriyle olan etkileşimleri bozularak transkripsiyon aktivitesi engellenmektedir (Semenza, 2019). PHD'ler substrat olarak O₂ kullandıklarından dolayı hipoksik koşullar altında hidroksilaz aktiviteleri baskılanır ve böylece HIF1- α 'yı hidroksile edemezler. HIF1- α hidroksillenmediği için pVHL tarafından tanınmaz ve E3 ubiquitin ligaz tarafından yıkılamaz (Epstein AC, 2001; Schofield ve Ratcliffe, 2004). Hipoksik koşullar altında PDHler gibi FIH-1 aktivitesi de ortadan kalkar (Semenza, 2019). Sonuç olarak oksijen yokluğunda aktiviteleri engellenen PHD ve FIH'ler iş görmez hale gelir ve bu durum HIF-1 α 'nın stabilizasyonu, transkripsiyon faktörü olarak iş görmesi için nükleer translokasyonu ve HIF-1 β ile dimerizasyonu ile sonuçlanır. Çekirdekte HIF-1 α , hipoksiye duyarlı elemanlar (HRE'ler) olarak bilinen hedef gen promotör bölgelerindeki A/GCGTG konsensüs motifine bağlanır. Transkripsiyonel aktivatörlerle birlikte, HIF-1 α , anjiyogenez, metabolizma, eritropoez, apoptoz, pH düzenleme, metastaz ve hücresel

farklılaşma dâhil olmak üzere farklı işlemlerde yer alan çok sayıda genin ekspresyonunu düzenler (Schofield ve Ratcliffe, 2004).

HIF-1 α ekspresyonunun seviyesi, protein sentezinin ve protein yıkımının birbirlerine olan oranları ile belirlenir. HIF-1 α 'da sentez O₂'den bağımsız mekanizmalar ile düzenlenirken, bozunma esas olarak O₂'ye bağlı mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Oksijene bağımlı mekanizma daha önce de bahsedildiği gibi PDH ve FIH-1 gibi hidroksilazların hücre içerisinde oksijen seviyesine bağlı olarak aktivasyonu ve inaktivasyonu aracılığı kontrolüdür. Oksijenden bağımsız olan mekanizmada ise büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer sinyal molekülleri, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) veya mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yollarının aktivasyonu ile HIF-1 α 'nın sentezi uyarılmaktadır (Semenza, 2003).



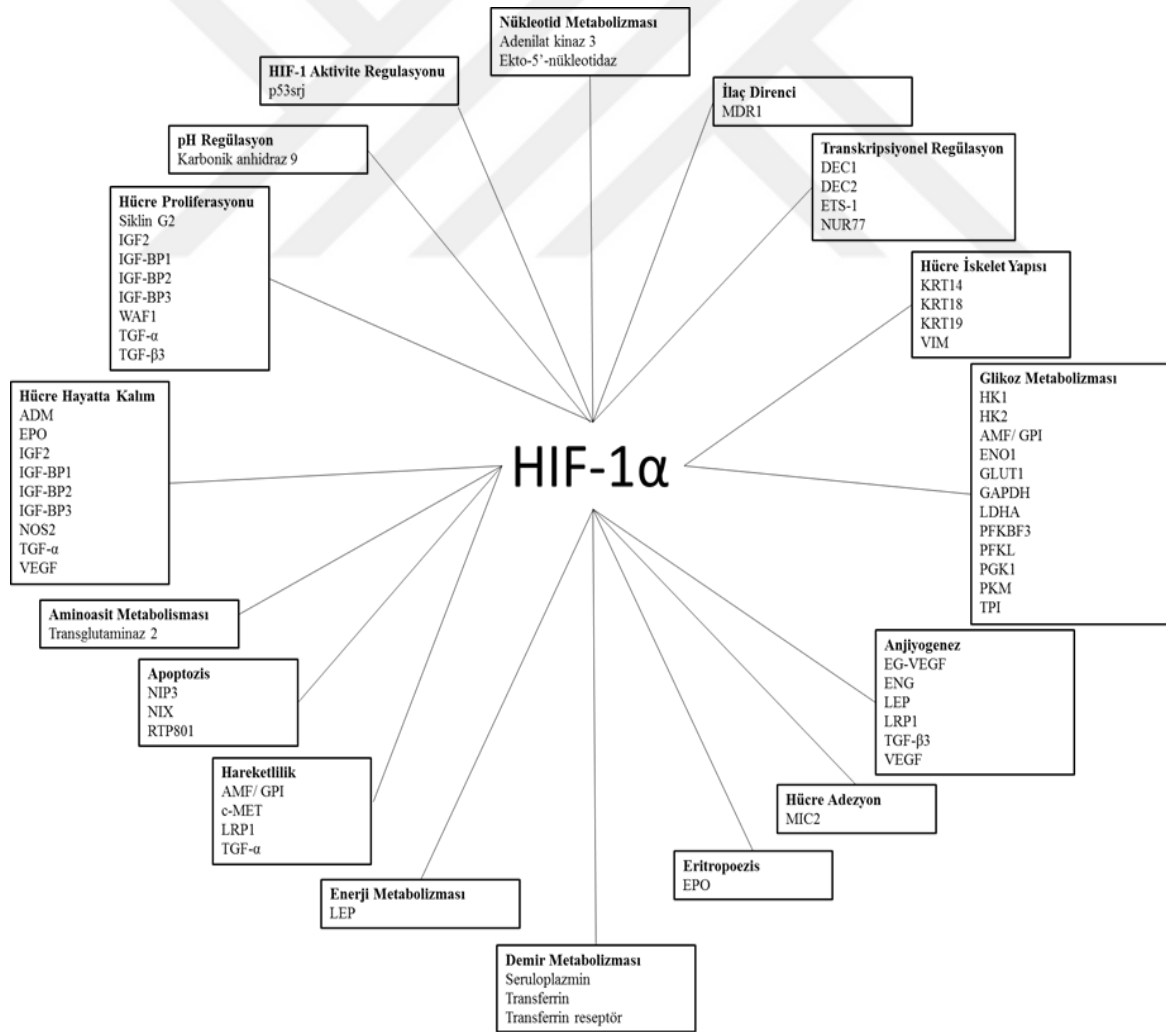
Şekil 2. HIF-1 α aktivitesinin O₂ bağımlı regülasyonu (Wigerup ve ark, 2016)

HIF-1 aktivitesi, HIF-1 α 'nın diğer birçok protein ile etkileşimi ile düzenlenir (Semenza, 2017).

2.1.2. HIF1- α 'nın Transkripsiyonunu Sağladığı Hedef Genler

Hipoksida, HIF1- α , transkripsiyonel aktivatörlerle birlikte anjiyogenez, metabolizma, eritropoez, apoptoz, pH düzenleme, metastaz ve hücresel farklılaşma dahil olmak üzere önemli süreçlerde görev alan çok sayıda genin transkripsiyonundan sorumludur (Schofield ve Ratcliffe, 2004). Bu süreçte, hipoksik kanser hücrelerinin kemoterapi ve

radyasyon terapisine direnci onlara ölümcül kanser fenotipini kazandırmanın yanı sıra invaziv ve metastatik özellikler de kazanırlar (Semenza, 2012). Şekil 3’de gösterilen HIF1- α ile ilişkili olan genler aynı zamanda kanser progresyonunda rolleri yer almaktadır (Masoud ve Li, 2015). HIF1- α özellikle anjiyogenik faktörler (örn. VEGF, vasküler endotelial büyüme faktör), büyüme faktörleri (insulin-benzeri büyüme-faktörü-II, IGF-II) ve glikolitik enzimler, (AldolazA/C gibi), antiapoptotik proteinler (örn. Bcl-2) gibi çok sayıda genin transkripsiyonunu sağlar (Kilic ve ark, 2007; Semenza, 2003, 2012). Böylece HIF-1 α solid tümörleri anjiyogenezi teşvik ederek, büyüme faktörlerinin ifadesini artırarak, apoptozisi önleyerek ve anaerobik metabolizmayı artırarak hipoksiye karşı korumaktadır. HIF-1 α ’nın, kötü prognoz ve radyoterapi ve kemoterapiye karşı dirençle korelasyon gösterdiği (Semenza, 2012), apoptozis ve senesens gibi önemli hücrel cevaplar üzerinde üzerindeki negatif etkileri tarafımızın ve diğer araştırmacıların çalışmalarından bilinmektedir (Kilic Eren ve ark, 2015; Kilic ve ark, 2007; Unruh ve ark, 2003).



Şekil 3. HIF1- α ’nın hedef genleri (Semenza, 2003)

2.1.3. Hipoksi ve DNA Hasarı Cevabı

Hipoksi, tümörlerde genomik instabiliteye katkıda bulunur ve yüksek oranda mutasyon sıklığı, DNA amplifikasyonunda artış, kırılmalı bölge indüksiyonu ve mikro satelit kararsızlığı ile ilişkilidir. Gen mutasyonlarındaki artış ve hipoksinin şiddetindeki değişime bağlı olarak gen amplifikasyonu gibi genetik anormalliklerin büyüklüğü 5 ila 1000 kat arasında olabilir (Bindra ve Glazer, 2005).

Şiddetli hipoksi seviyelerinde hücrelerin bir diğer tepkisi DNA hasarı cevabının aktivasyonudur. Oksijen yokluğunun şiddetine bağlı olarak, ribonükleotid redüktaz aktivitesi tehlikeye girer (Olcina ve ark, 2010) ve bu da dNTP seviyelerinin tükenmesine ve replikasyon stresine yol açar (Hammond ve ark, 2014). Replikasyon çatallında tek sarmallı DNA'nın birikmesi ataksiya telenjektazisi ve rad3 ile ilgili (ATR) proteini aracılı sinyal vermeyi tetiklemektedir, bu da H2AX, Chk1 ve p53'ün fosforilasyonuna yol açar. ATR'nin aktivasyonuna ek olarak ATM aracılı sinyalizasyon, hipoksi durumunda saptanabilir DNA hasarı olmamasına rağmen aktive edilebilir (Olcina ve ark, 2013). Sonuç olarak hipoksi-indüklü replikasyon durdurulması ATR ve ATM kinazları ve p53'ü de kapsayan bir DNA hasarı cevabı başlatmaktadır.

Hipoksik koşullara adapte olma girişiminde tümör hücrelerinin, yüksek enerji tüketimi içeren hücresel prosesleri baskıladığına dair artan kanıtlar da vardır. Örneğin hipoksik koşullar altında, DNA onarım yollarının birçok önemli bileşeni baskılanmış olarak gösterilmiştir. Homolog rekombinasyon, yanlış eşleşme onarımı ve homolog olmayan uçların birleşmesinin, hipoksik koşullar altında daha az etkili olduğu gösterilmiş; bu da, DNA onarımının baskılanmasının hipoksiye genel bir yanıt olduğunu düşündürmüştür. Sonuç olarak hipoksik tümör hücrelerindeki DNA replikasyon stres, regülasyonu bozulmuş DNA hasarı kontrol sinyalleri hücre ölümünde kaçma yetenekleriyle birlikte hücrelerin hasarlı DNA'yla proliferasyonlarına ve ilave mutasyonları da kazanmalarına yol açar. Bu döngü hipoksik hücrelerde DNA onarımının baskılanmış olmasıyla mutasyon kazanımını daha da hızlandırmakta ve böylece genomik kararsızlığa yol açmaktadır (Olcina ve Hammond, 2014).

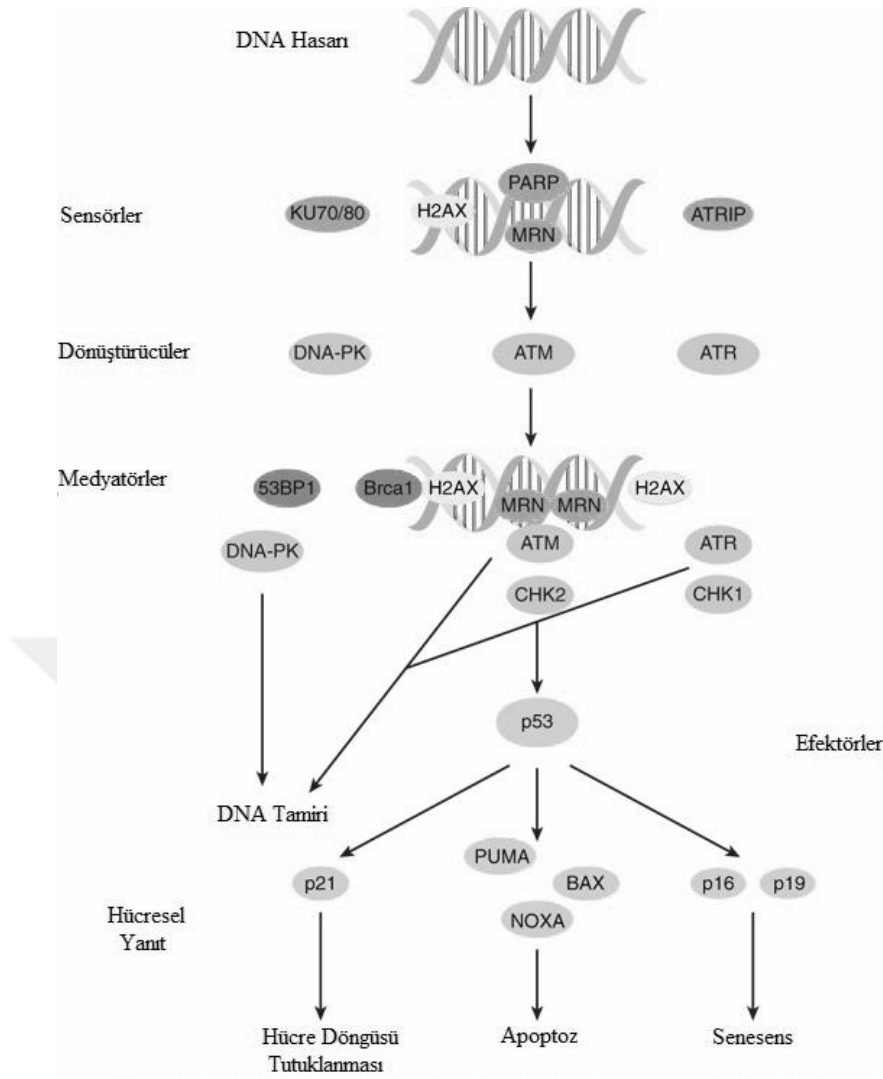
Hipoksi kaynaklı olan; DNA mutasyonları, onkogen amplifikasyonu, DNA hasarı veya DNA replikasyon stresinin indüklenmesi, DNA hasarı kontrol noktası sinyallemesinin serbest bırakılması, DNA onarımı ile etkileşime girme veya hücre ölümünden kaçma nedeniyle ortaya çıkmış olabilir. (Terry ve ark, 2018).

2.2.2. DNA Hasarı Cevabı

Ökaryotik hücreler için metabolit yan ürünlerden, güneş ışığına kadar çeşitli endojen ve eksojen kaynaklı DNA'yı hedef alan riskler mevcuttur. Bu riskler DNA üzerinde çeşitli hasarlara yol açmaktadır. Örneğin; IR ve ROS, DNA'nın tek ve/veya çift ipliğinin kopmasına neden olurken UV primidin dimerlerinin oluşmasına yol açar ve bu hasarlar DNA replikasyonu sırasında insersiyon, delesyon vb. hataları da beraberinde getirmektedir (Ciccia ve Elledge, 2010). Hücreler genomik bütünlüğü korumak amacıyla bu risklerin oluşturduğu hasarlarla sürekli olarak ilgilenmektedir. DNA hasarına verilen klasik tepki, öncelikle hasarın tanınmasıyla birlikte bu hasara cevap vermeyi içeren ve bu yolağın alt basamaklarında yer alan genellikle hücre döngüsünün tutuklanması, DNA onarımı, yaşlanma (senesens) veya apoptozise yol açan birkaç olayı koordine etmeyi içeren karmaşık bir kinaz sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar (Silva ve Ideker, 2019).

DNA hasarı cevabında sensör, sinyal iletici ve efektör proteinler rol oynamaktadır. DNA hasarının indüksiyonu öncelikle MRN kompleksi (MRE11-RAD50-NBS1), 53BP1 ve γ -H2AX gibi DNA hasar sensörleri tarafından yapılmaktadır. Hasarın algılanmasını takiben hücre döngüsü durmasını tetiklemek için ATM ve ATR sinyal ileticileri otofosforile olarak p53, BRCA1/2, Chk1, Chk2, p21, p-Rb, CDC2 gibi alt yolaklarda görev alan efektör proteinlerini transaktive etmektedir (El-Awady ve ark, 2016).

DNA hasarı yanıtını (DDR) aktive eden hasar tek zincir DNA (ssDNA) kırığı, replikasyon sırasında oluşan stres ve DNA çift zincir kırığının oluşması üzerine ATR PI-3K (fosfatidil inositol-3-kinaz) aktive edilmektedir. ATR S482 kalıntısından otofosforilasyonunu gerçekleştirerek aktif hale gelmektedir (Blackford ve Jackson, 2017; Olcina ve Hammond, 2014). Aktif ATR'nin ana alt hedeflerinden biri olan kontrol noktası kinaz 1 (Chk1)'i S317 ve S345 kalıntılarından fosforile ederek aktif hale getirir. Chk1'e ek olarak ATR ilişkili protein ATRIP, replikasyon proteini A (RPA), RAD17, 9-1-1 kompleksi (Rad9-Rad1-Hus1) ve TopBP1, kontrol noktası aktivasyonu sırasında ATR tarafından fosforile edilir (Shimada ve Nakanishi, 2013). Böylelikle ATR DNA hasar tepkisinin düzenlenmesi yoluyla DNA replikasyonu sırasında genom bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynar (Blackford ve Jackson, 2017).



Şekil 4. DNA hasarı cevabı elemanları ve rolleri (Weil, 2015)

DNA çift zincir kırıklarının (DSB'ler) oluşması üzerine ATM, S1981'de otofosforilasyonunu gerçekleştirir ve DNA'ya bağımlı kinaz (DNA-PK) aktif hale gelir. Aktif ATM, kontrol noktası aktivasyonuna, DNA onarımına veya apoptozisine yol açan DDR sinyal kaskadını başlatır. DSB'lere cevap olarak ATM, DNA hasar markörü olan H2AX'i S139 kalıntısından (γ -H2AX) fosforile eder. ATM'nin ana alt hedeflerinden biri olan hücre döngüsü durmasına aracılık eden kontrol noktası kinaz 2 (Chk2)'yi ise Thr68'den fosforilleyerek aktif hale getirir. Bunu takiben MDC1, 53BP1, BRCA1 ve MRN kompleksi gibi DDR'de yer alan birçok proteinin fosforilasyonunu gerçekleştirerek, alt basamaklarda yer alan sinyalizasyonu başlatırlar (Blackford ve Jackson, 2017; Olcina ve Hammond, 2014).

DDR yolağında görevli olan proteinlerin fosforilasyonu, defosforilasyonu ubiquitinasyonu ve sumolasyonu gibi post-translasyonel modifikasyonlarla düzenlemeleri büyük önem taşımaktadır (Pechackova ve ark, 2017). ATM, ATR ve p53 gibi DDR'da görevli olan proteinlerin esas olarak serin/ treonin (pSQ/pTQ) kalıntılarında protein fosforilasyonunu gerçekleştirmesinin DDR için gerekli olduğunu ve enzimatik aktiviteyi, lokalizasyonu, protein-protein etkileşimlerini ve stabilizasyonu düzenlemektedir. Nitekim, bu kinazların DNA hasarı cevabının tamamlanmasıyla inaktif hale getirilmeleri gerekmektedir. Bu inaktivite sürecinde ise protein fosfatazlar ve bunların düzenleyicilerinin katalitik alt birimleri tarafından kinazlar hedeflenerek, defosforilasyon ile düzenlenmektedir (Shimada ve Nakanishi, 2013). DDR ağındaki en önemli bileşenlerden biri de PP2C Ser / Thr protein fosfatazlar ailesinin bir üyesi olan yabanıl tip p53 ile indüklenen fosfataz 1'dir (Wip1) (Emelyanov ve Bulavin, 2015).

2.3. Wip1 Fosfataz

DDR ağındaki ana bileşenlerden biri olan, PP2C (Protein phosphatase 2C isoform delta) Ser/ Thr protein fosfatazlar ailesinin bir üyesidir. Wip1 (wild type p53 induced phosphatase) fosfataz farklı tipte DNA hasarlarının indüklediği p53'ün transkripsiyonel olarak aktive ettiği genlerden biridir (Pechackova ve ark, 2017). İnsan *PPM1D* 17q23'de lokalize olan, bir merkezi fosfataz katalitik domaini ve bir nükleer lokalizasyon sinyali olan, bir C-terminali domaini içeren bir 605 amino asitlik bir proteini kodlar (Emelyanov ve Bulavin, 2015).

Wip1, p53 yolağının negatif regülatörü olarak kabul edilmektedir. Wip1'in aktivasyonu sadece p53 tarafından değil transkripsiyon faktörlerince (NFκB, CREB, ER-α, c-Jun ve E2F1) de indüklenebilmektedir. DNA hasarından sonra p53'ün aktive edildikten sonra Wip1 promotörüne bağlanarak Wip1'in transkripsiyonuna neden olur. Wip1, p53'ü doğrudan defosforile ederek p53 aktivitesini ortadan kaldırır ve downregüle eder ancak böylece kendisinin de negatif yönlü feedback regülasyonunu sağlamaktadır. Wip1, p53 inhibisyonunu doğrudan proteinin defosforilasyonu üzerinden değil aynı zamanda dolaylı olarak MDM2 aracılı da gerçekleştirmektedir. Wip1'in p53 proteinin yanısıra, DNA hasarını algılamak ve DDR'yi aktive etmekten sorumlu olan ATM, Chk1, Chk2, γH2AX proteinlerinin defosforile edildiği ve negatif yönlü olarak düzenlendiği gösterilmiştir (Goloudina ve ark, 2016).

2.3.1. Wip1 Fosfatazın DNA Hasarı Cevabındaki Rolü

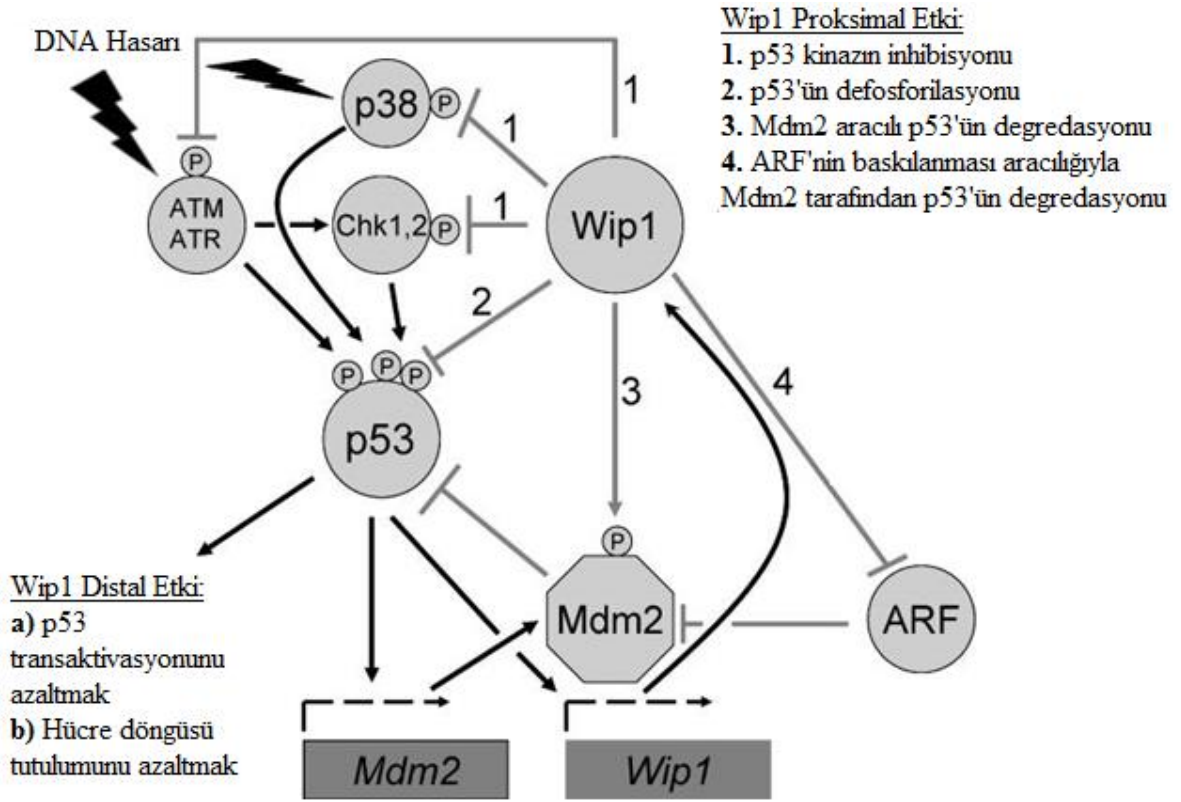
DNA'nın onarımını tamamlamasını takiben DDR yolağının deaktif olabilmesi için ve hücre döngüsü kontrol noktasının inhibisyonunu hücre proliferasyonunun devam ettirilmesi p53'ün aktivasyonunun Wip1 fosfataz tarafından sonlandırılmasına bağlıdır. (Pechackova ve ark, 2017).

Wip1'in DDR'da ki regülatör rolü hücre içerisinde hemeostatik bir denge sağlamaktadır. Wip1'in defosforile ettiği hedefler arasında pSQ/pTQ ve pTXpY motiflerinden fosforile olmuş olan proteinler yer almaktadır. Şekil 5'de de gösterildiği üzere DNA hasarı cevabında önemli rol oynayan proteinleri defosforilleyerek inaktif etmek suretiyle DNA hasarı cevabını sonlandırmaktadır (Goloudina ve ark, 2016).

Protein	Bölge	Motif	Protein Fonksiyonu	Wip1'in Etkilediği Mekanizma
p38MAPK	T180	TXY	Stres Yanıtı	Kinaz Aktivitesi
UNG2	T6	TXY	Baz-çıkartımı Tamiri	Urasil Çıkartımı
Chk1	S345	S/TQ	DNA Hasarı Cevabı	Kinaz Aktivitesi
Chk2	T68	S/T/Q	DNA Hasarı Cevabı	Kinaz Aktivitesi
p53	S15	S/TQ	DNA Hasarı Cevabı	Apoptozis
ATM	S1981	S/TQ	DNA Hasarı Cevabı	Kinaz Aktivitesi
ATR	S428	S/TQ	DNA Hasarı Cevabı	Kinaz Aktivitesi
MDM2	S395	S/TQ	p53 Regülasyonu	p53 Seviyesi

Şekil 5. Wip1'in defosforilasyonunda rol aldığı hedef proteinler (Lu ve ark, 2008)

DNA hasarı cevabını durdurmak için Wip1, DDR rol oynayan ve genomik stabilitenin korunmasında görevi olan γ H2AX'i Ser139'dan ve p53'ü Ser15'den doğrudan defosforile ederek inaktif hale getirmektedir. p53'ü ayrıca Ser20, Ser33 ve Ser46 kalıntılarından defosforile ederek fosforilasyonunu azaltmaktadır. Dolaylı olarak p53'ü inaktif ettiği yollar arasında da ATM Ser1981ve S367, Chk1 Ser345, Chk2 Thr 68,Ser19, Ser33/35 ve Thr432, MDM2 Ser395 kalıntılarından defosforilasyonları yer almaktadır. Wip1 ayrıca, strese duyarlı p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolunu, pTXpY motifinin bulunduğu kinazın aktivasyon döngüsünde Thr180 kalıntısından defosforilasyonu yoluyla doğrudan etkisizleştirerek stresi düzenlemektedir (Lu ve ark, 2008).



Şekil 6. Wip1 fosfatazın p53 inhibisyonu için hedeflediği proteinler (Lu ve ark, 2008)

2.3.2. Wip1'in Hücre Döngüsünün Düzenlenmesinde Rolü

DNA hasarı sonrası ATM ve ATR kinazlar hücre döngüsünün durdurulması ve Cdc25A/B/C'nin siklin bağımlı kinazları inaktive etmesi için efektör kontrol noktası kinazları olan Chk2 ve Chk1'yi fosforile eder. Normal koşullar altında, p53 bir E3 ubiquitin ligaz olan MDM2 tarafından baskılanırcak DNA hasarı gerçekleştiğinde p53 aktif hale gelir (Leslie ve Zhang, 2016). DNA hasarını takiben p53; ATM / CHK2, ATR / CHK1 ve çeşitli asetil transferazlar tarafından post translasyonel modifikasyona uğrar. Stabil hale gelen p53, hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı, apoptoz, yaşlanma ve metabolizmada yer alan çeşitli hedef genlerin promotörüne bağlanarak transkripsiyonunu tetiklemektedir. Hücre döngüsünde görevli olan CDKN1 / p21'de p53'ün transkripsiyonel bir hedefidir. P21 G1 ve G2 kontrol noktalarında yer alan bir CDK inhibitörüdür (Leontieva ve ark, 2010). Normal şartlar altında hücrelerde, CDKN1 / p21 ekspresyonu, transkripsiyon ara faktör 1-beta (KAP1) ile baskılanmaktadır. Genotoksik stres varlığında KAP1'in Ser824'te ATM ile ve Ser473'te CHK1/2 tarafından fosforilasyonu ile p21'in baskılanması

ortadan kalkar. Böylece aktive olan p21 CDK inhibisyonunu gerçekleştirerek hücre döngüsünü durdurur (Lee ve ark, 2007).

DNA hasarı cevabının bir bileşeni olarak hücre döngüsünün durdurulmasının yanı sıra, H2AX S139'dan (γ H2AX) ATM tarafından fosforile edilerek DNA onarımı teşvik edilir. γ H2AX, 53BP1 veya BRCA1 proteinlerinin DNA hasarına yakınlığına bağlı olarak DNA'nın onarım tipi belirlenmektedir. (Chapman ve ark, 2012). DNA onarımının tamamlanmasından sonra, hücre döngüsünün durdurulması işleminin geri çevrilererek hücre döngüsünün tekrar ilerletilmesi sağlanır. Bu geri döndürme işleminde ise içlerinde Wip1'in de bulunduğu çeşitli protein fosfatazlar görev yaparak ATM/ ATR ve Chk1/ 2 proteinleri ve bunlar tarafından aktifleştirilen proteinler defosforile edilerek inaktif hale çevrilir ve böylece DDR sonlandırılmış olunur (Shaltiel ve ark, 2015).

Wip1'in ekspresyonu p53 ile kuvvetlendirilirken, Wip1 aynı zamanda p53'ün güçlü bir negatif regülatörü olarak DNA onarımının tamamlanmasından sonra p53 yanıtının sonlandırılmasını sağlayan negatif feedback mekanizması oluşturur. Aslında, Wip1 aktivitesine p53/ p21 yolu aktivasyon seviyesini sınırlamak ve siklin B'nin bozulmasını ve kalıcı hücre döngüsü çıkışının bozulmasını önlemek için G2 kontrol noktası boyunca ihtiyaç duyulmaktadır (Pechackova ve ark, 2017).

Wip1'in işlevi hücre döngüsü bağlamında kontrol edilir. Wip1 proteininin ekspresyonu G1'de düşük, S / G2'de pik yapar ve mitoz sırasında azalır. Wip1, mitoz sırasında katalitik alan içindeki çeşitli kalıntılardan fosforile edilir; bu da prometafazda (anafaz uyarıcı kompleks) APC / C^{CDC20} ile bozunmasını teşvik eder (Macurek ve ark, 2013).

Wip1'in mitozda bulunmaması, hücrelerin kromozomlarda bulunan endojen DNA hasarını tanınmasını sağlayabilir. Bu bölgeler mitoz sırasında γ H2AX ile etiketlenir ve mitotik çıkıştan sonraki G1 fazında onarılır. Faz geçişi sırasında Wip1, Ser54 ve Ser85'te HIPK2 kinaz tarafından yapısal olarak fosforile edilir (Choi ve ark, 2013). Bazal Wip1 seviyelerinin düşük tutulması hücrelerin genotoksik stres varlığında DDR'yi tamamen aktive etmesine izin verirken, Wip1 ekspresyonunun p53'e bağlı indüksiyonu, DNA onarımının tamamlanmasından sonra DDR'nin sonlandırılmasına izin verir (Pechackova ve ark, 2017). Pechackova ve ark. (2016) Wip1 aktivitesi MCF-7 hücre dizisinde spesifik olarak allosterik inhibitör GSK2830371 ile bloke edildiğinde proliferasyonun bozulduğu ve zaman içinde hücre döngüsünün G2 fazında biriktiğini göstermişler (Pechackova ve ark, 2016). Bunun dışında, PPM1D (-/-) MEF popülasyonu yabanıl tip MEF'lere kıyasla daha yüksek oranda

G2/M tutulumuna sahiptir (Oliva-Trastoy ve ark, 2007). Bu çalışmalar Wip1'in hücre döngüsünün kontrolündeki rolüne işaret etmektedir.

Wip1'i aşırı ifade eden veya C-terminalinden kesilmiş yani truncated mutasyona sahip olan hücrelerde, Wip1'in sadece G2 kontrol noktasında değil G1 kontrol noktasında da etkili olduğu kanıtlanmıştır. Düşük dozda IR'a maruz kalan MCF7 hücreleri GSK2830371 ile muamele edildiğinde hücreler kontrol grubuna kıyasla G1 kontrol noktasında tutulumun daha fazla olduğu gösterilmiştir (Pechackova ve ark, 2016).

2.3.3. Wip1'in Apoptoz ve Senesens Üzerindeki Rolü

Hücrenin apoptoza uğraması bir sonraki nesle sahip olduğu hasarlı bir DNA'nın aktarılmaması açısından önemli ve gereklidir. Apoptozis, anti-apoptotik faktörlerin (Bcl-2, Bcl-XL) ve pro-apoptotik faktörlerin (p53, Bax ve kaspazlar) dengesi ile düzenlenen programlanmış hücre ölümü sürecidir. Öte yandan, hücrenin ayrıca stres kaynaklı hasarın etkin bir şekilde onarılması durumunda apoptotik yolları negatif yönde düzenleyen proteinlere sahip olması gerekir ve Wip1 fosfataz da bu proteinlerden biridir (Lowe ve ark, 2012).

Apoptozun ana düzenleyicisi olan p53'ün, DDR proteinlerinin etkisizleştirilmesini takiben Wip1 aracılı inhibisyonu apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını desteklemektedir (Mirzayans ve ark, 2013). Kong ve ark. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Wip1'in inhibisyonunun doksorubisine cevap olarak daha yüksek apoptozise yol açtığını göstermiştir (Kong ve ark, 2009). Benzer şekilde, Parssinen ve ark. siRNA ile Wip1 inhibisyonunun, wt p53'e sahip meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir (Parssinen ve ark, 2008). Bu nedenle, p53'ün Wip1 aracılı inhibisyonu hücrede apoptozu inhibe ettiği ana bir mekanizma gibi görünmektedir (Lowe ve ark, 2012). Genotoksik ajanların muamelesiyle fare embriyonik fibroblastlarında (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEF) indüklenen apoptoz oranının *PPM1D* (-/-) MEF'te wt MEF'e oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur (Xia ve ark, 2009). Yapılan bir diğer çalışmada *in vivo* Eμ-myc-indüklü lenfomada, Wip1'in myc-indüklü apoptozisi ATM-p53 yolağını baskılamak suretiyle tümörögenezi teşvik ettiği gösterilmiştir (Shreeram ve ark, 2006). Benzer şekilde GSK2830371, doksorubisinin meme kanseri hücrelerinde, nöroblastomda ve lenfomada sitotoksik etkisini güçlendirmiştir (Chen ve ark, 2016; Kojima ve ark, 2016; Pechackova ve

ark, 2016). Bütün bu veriler doğrultusunda Wip1'in apoptozisin negatif regülatörü olduğu sonucuna varılmıştır.

Hücrede senesens meydana geldiğinde hücre döngüsü geri dönüşümsüz olarak durdurulmaktadır. Hücresel senesens replikatif senesens ve prematüre senesens olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Replikatif senesens; hücre bölünmesi sırasında meydana gelen telomer kısalmasına bağlı olarak aktive edilen sinyaller tarafından tetiklenir. Genç hücrelerde meydana gelen prematüre senesens, belirli onkogenlerin aktivasyonu (örn. Ras, Braf) veya tümör supresör gen inaktivasyonu (örn. PTEN), mitojenik uyarın, DNA hasarı meydana getiren kemoterapik ajanlar ve oksidatif stres tarafından indüklenebilir. İki temel tümör supresör yol olan p16^{INK4A}-Rb ve p19^{ARF}-p53-p21, senesensin indüksiyonuna ve sürekliliğine katkı sağlarlar. Hücre içersinde senesensin hangi yolla indüklendiği farketmeksizin DDR yolaklarının aktivasyonu ATM/ATR kinazların aktivasyonu aracılığıyla söz konusudur (Kilic ve Schmitt, 2008). Sonuç olarak DNA hasarı yaratan ajanlarla ya da radyoterapi ile indüklenen senesens, apoptozis yanında kemoterapiye diğer bir majör hücresel cevap olarak yer almaktadır (Kilic Eren ve Tabor, 2014; Kilic ve Schmitt, 2008). DDR'de rol alan Wip fosfatazın senesensin regülasyonunda görev aldığı bilinmektedir. Wip1'in primer insan fibroblastlarında Ras onkogeniyle indüklenen sensensi inhibe ettiği bildirilmiştir (Lu ve ark, 2008). Yapılan diğer bir çalışmada A549 ve MCF-7 hücrelerinde doksorubisinle indüklenen senesens sırasında Wip1'in ifadesinin azaldığı bildirilmiştir (Crescenzi ve ark, 2013). Senesensin indüklenmesini takiben Wip1'in aşırı ifadesinin G2/M kontrol noktasını bozduğu ve bu hücrelerin mitotik katastrofiye gitmelerine sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca insan mezenkimal kök hücrelerinde yapılan çalışmaya göre Wip1'in ifade edilmesi senesensin aşılmasına yol açmıştır (Lee ve ark, 2009). Bu zamana kadar yapılan çalışmalardan Wip1'in senesensi negatif regüle ettiği veya kendi aktivitesinin senesens sırasında negatif regüle edildiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

2.3.4. Meme Kanseri Wip1 Fosfatazın Rolü

Wip1 protein fosfataz ilk olarak 1997'de Fiscella tarafından tanımlanan p53'e bağlı olarak çoklu hücreli sinyalleme yollarının düzenlenmesinde yer alan bir proto-onkogendir (Feng ve ark, 2017). Meme, akciğer, pankreas, mesane, yumurtalık ve nöroblastom kanseri de dahil olmak üzere PPM1D geninin amplifikasyonu mevcuttur (Kong ve ark, 2009). Bu durum kanserlerin patogenezinde önem arz etmektedir (Feng ve ark, 2017).

Li ve ark. genomik hibridizasyon tekniği kullanılarak kromozom üzerinde PPM1D geninin yer aldığı 17q22-q24 bölgesini haritalandı. Sonuç olarak primer insan meme tümörlerinin yaklaşık % 18-20'sinde amplifiye edildiğini göstermişlerdir (Li ve ark, 2002).

MCF7 hücre dizisinde PPM1D amplifikasyonuna bağlı olarak Wip1 fosfotaz aşırı eksprese edilmiştir. Bu durum kontrolsüz hücre döngüsü ve apoptoza karşı artan direnci beraberinde getirmektedir. Ayrıca Wip1 seviyelerinin normalden yüksek olması, p53 yolunun aktivitesinin negatif yönlü düzenlenmesine sebep olur (Goloudina ve ark, 2016).

Wip1'in meme kanserindeki rolü, diğer tüm insan kanseri türleriyle karşılaştırıldığında en çok çalışılanıdır. Bir dizi çalışma Wip1'in aşırı ekspresyonunun; p53, p38 MAPK ve p16 sinyal yollarını negatif olarak düzenlediğini ve bunun meme kanseri tümörögenezi, proliferasyonu ve kötü prognozla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Demidov ve ark, 2007; Yu ve ark, 2007). Wang ve ark. (2013) ve Zhang ve ark. (2010) yılında meme kanserinde miRNA'lar üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda, miRNA-16 ve miRNA-34a tarafından Wip1'in mRNA düzeyinde baskılanmasıyla olan apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir (Wang ve ark, 2013; Zhang ve ark, 2010). Bu nedenle, yüksek Wip1 ekspresyon seviyeleri meme kanseri için predispozan bir faktör olabilir.

Spike ve Wahl'nin Wip1 üzerine yaptıkları çalışmada, p53 sinyal yolunu kontrol ederek kemosenitiviteyi düzenlediğini ortaya koymuştur (Spike ve Wahl, 2011). Wip1 alt hedefleri aracılığıyla dolaylı ya da doğrudan wt p53'ü hedefleyerek ve hücre büyümesini ve hücre sağkalımını azaltarak meme kanserinin doksorubisine (adriamisine) karşı kemosenitivitesini arttırdığı bilinmektedir. Ancak, bu etkiler mutant tip p53'e sahip hücre dizilerinde mevcut değildir (Kong ve ark, 2009; Parssinen ve ark, 2008). Her ne kadar meme kanseri oluşumu ErbB2, Wnt1, BRCA1 ve BRCA2 de dahil olmak üzere çeşitli onkogenlerle düzenlenmiş olsa da (Emelyanov ve Bulavin, 2015), bu sonuçlar Wip1'in meme kanserli hastalarda tümörögenez ve prognoz indeksi için potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini öne sürmektedir. Ek olarak, Wip1'in ekspresyon seviyelerinin düşürülmesi, meme kanserinin kemoterapisi sırasında wt p53 ile terapötik bir etkiye sahip olabileceği yönündedir (Wang ve ark, 2017). Özetlemek gerekirse yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda PPM1D'nin bir onkogen olduğuna dair kanıtlar artmaktadır.

2.4. Çalışmanın Yapılmasının Amacı

Wip1'in onkogen fonksiyonu veya DNA hasarı cevabının regülasyonunda ve hücrel stres cevapları üzerin etkilerini belirlemek amacıyla solid tümörlerde yapılan çalışmaların hemen hemen hepsinin standart normoksik doku kültürü koşullarında yapılmış olduğu ve solid tümörlerin karakteristik özelliği olan tümör hipoksisinin göz ardı edildiği görülmektedir. DNA hasarı cevabının önemli bir elemanı olan ve insan tümörlerinin bir çoğunda onkogenik role sahip olan Wip1 fosfatazin hipoksida nasıl regüle edildiği standart kültür koşullarında (%20 O₂) apoptozis ve senesens üzerinde gösterdiği negatif etkilerin hipoksida var olup olmadığı ve bunların moleküler mekanizmaları DNA hasarı cevabında hangi moleküler hedefler üzerinden etkili olduğu konusunda ise literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamaktadır. Esasen solid tümörlerde yapılan çalışmalarda oksijen konsantrasyonunun etkileri çoğunlukla göz ardı edilmekte ve standart kültür koşulları kullanılmaktadır. Ancak fizyolojik oksijen seviyesine inildiğinde standart koşullarda elde edilen sonuçlardan çok daha farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Örneğin fare embriyonik fibroblastlarıyla yapılan bir çalışmada standart kültür koşullarında primer fibroblastlar hızlıca yaşlanırken, fizyolojik oksijen seviyesine inildiğinde bu durumun ortadan kalktığı görülmektedir (Parrinello ve ark, 2003). Benzer şekilde birçok kemoterapötik ajanın hipoksida hücrel cevapları indüklemeye kabiliyetinin normoksiye göre daha düşük olduğu tarafımızın ve diğer araştırmacıların çalışmalarından bilinmektedir (Kilic ve ark, 2007; Sermeus ve ark, 2012). Bir tümörün hipoksik fraksiyonu tedaviye en dirençli ve çok büyük olasılıkla metastaz yapacak agresif tümör hücrelerini temsil eder. Bu fraksiyonun potansiyel olarak en çok sayıda kanser kök hücresi içerdiği ileri sürülmektedir (Mimeault ve Batra, 2013). Bu nedenlerden dolayı, tedavi sırasında hipoksik hücrelerin yok edilmesinde yapılacak herhangi bir ilerlemenin, hastalık ilerlemesi ve hasta sağkalımı üzerinde olumlu bir etkisi olacağı beklenmektedir.

Hipoksi ile uyarılan replikasyon stresi sırasında ATR ve ATM kilit rol oynamaktadırlar bu nedenle de bu kinazlar hipoksik tümör hücrelerinde potansiyel terapötik hedefler olarak görülmektedirler. Bu kinazların depleksyon veya kinaz-domaininin fonksiyonsuz hale getirilmesi yoluyla hedeflenmesi tümör hücrelerini hipoksi ve yeniden oksijenasyona duyarlı hale getirmektedir. VE-821 ve VE-822 gibi potent ve spesifik hücrel ATR inhibitörleriyle yapılan son çalışmalar, çeşitli kanser hücrelerini oksijen konsantrasyonuna hassaslaştırmada umut vaat etmiştir. Özellikle, VE-821 radyasyonun etkilerini sadece normoksida değil aynı zamanda hipoksik koşullarda da arttırmıştır. Çeşitli

diğer ATR inhibitörleriyle yapılan çalışmalarda, sisplatin, hidroksi üre, radyasyon ve temozolomid gibi DNA hasar ajanlarının genotoksik etkilerinin artırıldığı gösterilmiştir. Chk1'i gen susturma veya kimyasal inhibisyon yoluyla hedeflemenin, hipokside tümör hücresi duyarlılığını arttırmada umut verici bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir. DDR inhibitörleri tekli ajanlar olarak hipoksik hücelere karşı etkili olma ihtimali düşük olsa da kombinasyon halinde önemli etkilere sahip olabilirler (Olcina ve Hammond, 2014). Bu anlamda Wip1 fosfataz inhibitörleriyle yapılan çalışmaların hipokside yeniden dizayn edilmesi büyük önem kazanmaktadır. Özellikle ATM ve ATR'ın Wip1'in en temel hedeflerinden oldukları göz önüne alındığında Wip1 fosfatazın aşırı ifade edilmiş tümörlerde farmakolojik veya genetik olarak hedeflenmesinin hipoksik tümör hücrelerinin eliminasyonuna katkısı veya zararı mutlaka ortaya çıkarılmalıdır.

Bu nedenle bu tez kapsamının uzun vadeli amacı Wip1'in fosfatazın hipokside nasıl regüle edildiği, DNA hasarı cevabının regülasyonunda hangi moleküler hedefler üzerinden etkili olduğu ve buna bağlı olarak Wip1'in hedeflenmesinin hipoksik tümörler de özellikle DNA hasarı ajanlarının etkinliğinin artırılmasına potansiyel katkısının moleküler anlamda ortaya çıkarılmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Dizisi

Tez çalışması boyunca, ATCC tarafından ticari olarak üretilmiş meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 kullanılmıştır.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan kimyasalların ve besiyerinin listesi

Ürün	Firma
Tris-base	AppliChem
Glycine	ChemCruz®
Sodyum Dodesil Sülfat	BioShop®
Sodyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Potasyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Asetik Asit ve Hidroklorik Asit	Merc
Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)	SIGMA®
Gliserol	ChemCruz
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS),	SIGMA®
Merkaptoetanol	SIGMA®
Magnezyum Klorür	SIGMA
Amonyum Persülfat	SIGMA
Bromfenol Blue	SIGMA-ALDRICH
Tween 20	SIGMA-ALDRICH
Skim Milk	Fluka®
Bowin Serum Albumin	ChemCruz
Sodyum Deoksikolat	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Ortovanadat	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Fosfat Monobazik	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Fosfat Dibazik (Anhidroz)	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Sitrat Tribazik Dihidrat	SIGMA-ALDRICH
Proteaz İnhibitör Cocktail	Santa Cruz
Sodyum Hidroksit	SIGMA-ALDRICH
DMEM-HA	Capricorn
Formaldehit %37	SIGMA-ALDRICH
Fetal Bovin Serum	Capricorn
Penisilin Streptomisin	Capricorn
Sodyum Pirüvat	Capricorn
Doxorubicine	ChemCruz
Tetrametilendiamin (TEMED)	SIGMA
Akrilamid-bis (% 40)	BIO-RAD
Etanol, Metanol ve İzopropanol	SIGMA-ALDRICH
UltraPure Agaro	Invitrogen
Western ECL substrat	BIO-RAD
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	ChemCruz
Qubit DNA Broad Range Kit	Invitrogen
Glasiyal Asetik Asit	Sigma
RedSafe	Intron
Hazır Gradient Jel	Bio-Rad
Harris Hematoksilen	Merck
Eozin	Merck

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan antikorların listesi

Ürün	Firma
ATM, ATM-p(ser1981)	Cell Signaling
ATR, ATR-p (ser428)	Cell Signaling
p-BRCA1 (ser1524)	Cell Signaling
γ H2AX (ser139)	Cell Signaling
Wip1	SantaCruz
HIF-1 α	BD Transduction Laboratories
CHK1-p (ser345)	Cell Signaling
CHK2	SantaCruz
CHK2-p (thr68)	Cell Signaling
P53	SantaCruz
P53-p(ser15)	Cell Signaling
GAPDH	Proteintech
P27 Kip	SantaCruz
β - aktin	Proteintech
P21	SantaCruz
Anti-mouse IgG	SantaCruz
Anti-rabbit IgG	SantaCruz

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan malzemelerin listesi

Ürün	Firma
75'lik Steril Flask	SARSTEDT
1,5 ml'lik Eppendorf	AXYGEN
200 μ l'lik PCR Tüpü	AXYGEN
15 ml'lik Steril Falcon	SARSTEDT
50 ml'lik Steril Falcon	SARSTEDT
1,8 ml'lik Steril Dondurma Tüpü	Thermo Scientific
12 Kuyucuklu Steril Plate	Corning
24 Kuyucuklu Steril Plate	Corning
48 Kuyucuklu Steril Plate	Corning
96 Kuyucuklu Steril Plate	Corning
10cm'lik Steril Petri	Corning
5ml'lik Steril Enjektör	Ege-Med
5 ml'lik Steril Tek Kullanımlık Pipet	SARSTEDT
10 ml'lik Steril Tek Kullanımlık Pipet	SARSTEDT
25 ml'lik Steril Tek Kullanımlık Pipet	SARSTEDT
PVDF Membran	Bio-Rad
Filtre Kağıdı	Macherey- Nagel
48 Kuyucuklu PCR Plate	Applied Biosystems
48 Kuyucuklu PCR Plate Strip	Applied Biosystems

3.1.4. Kullanılan Kitler ve Problar

Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan kitlerin ve problemlerin listesi

Ürün	Firma
iStar-Taq	Invitrogen
RNA İzolasyon Kiti	Ambion
DNA İzolasyon Kiti	Qiagen
BCA Assay Kit	Thermo Scientific
Annexin V Muse Kit	Muse
Cell Cycle Muse Kit	Muse
H2AX Muse Kit	Muse
TaqMan Universal Master Mix II, no UNG	Applied Biosystems
TaqMan Genotyping Master Mix	Applied Biosystems
TaqMan HIF1 α prob	Applied Biosystems
TaqMan Wip1 prob	Applied Biosystems
TaqMan β -aktin prob	Applied Biosystems
TaqMan Gene Copy Wip1 prob	Applied Biosystems
TaqMan Gene Copy RNase P prob	Applied Biosystems
PPM1D FISH Prob	Empire Genomics
Kromozom 17 FISH Prob	Empire Genomics
DAPI	Sigma

3.1.5. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve aletlerin listesi

Ürün	Firma
Steril Kabin	AirStream
İnkübatör	NUAIRE
Su Banyosu	Nüve
Muse Hücre Analiz Cihazı	Muse
Otoklav	HIRAYAMA
Sıvı Azot Tankı	MRC
Dikey Jel Elektroforezi	BIO-RAD
Yatay Jel Elektroforezi	Cleaver
PCR ve Real-Time PCR	Applied Biosystems
Görüntüleme Cihazı	Chemidoc-It ² 510 İmager
Transfer Cihazı	BIO-RAD
Güç Kaynağı	Thermo
Inverted Mikroskop	Euromex
Vorteks	Iso-Lab
Manyetik Karıştırıcı	IKA
pH Metre	Hanna Instruments
Mikro Santrifüj	Hettich
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Eppendorf
Soğutmalı Santrifüj	Hettich
Kriyo-Dondurucu Kap	Nalgene
Modüler İnkübatör Chamber	Billups Rottenberg
Spektrofotometre	Thermo
Qubit fluorometer	Invitrogen
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific
Floresan Mikroskop	Olympus
Doku Takip Cihazı	Leica

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tablo 6. Çalışmada kullanılan hücrenin özellikleri ve tipi

Kullanılan Hücre Tipi ve Özellikleri	
Hücre adı	: MCF-7
ATCC Kodu	: HTB 22 TM
Büyüme Özelliği:	Adherent
Organizma	: <i>Homo sapiens</i>
Hücre Tipi	: Epitelyal
Doku	: Meme Salgı Bezi
Hastalık	: Adenokarsinom

Çalışma boyunca kullanılan MCF-7 hücre dizisi Luminal A alt tipine ait olup ER(+), PR(+), HER2(-) ve wt BRCA-1'e sahiptir (Dai ve ark, 2017). Aşağıda gösterildiği gibi DMEM-HA besiyeri ortamında kültüre edilmiştir. İnsan normal epitel fibroblast hücresi olan BJ (CRL-2522TM) hücre dizisi *PPM1D* genini iki kopya olarak içerdiği bilindiğinden dolayı gen kopya sayısı ve gen ekspresyon analizinde ekzojen kontrol olarak kullanılmıştır.

Dulbecco'nun Eagle'dan modifiye besiyeri (DMEM-HA) tamamlanmış içeriğinde: % 88 (DMEM-HA), % 10 Fetal Bovin Serum (FBS), % 1 Penisilin-Streptomisin ve % 1 Sodyum Pirüvat içermektedir.

% 5 CO₂ içeren 37°C ısı ısıtıcı inkübatörde kültüre edilen MCF-7 ve BJ hücreleri yukarıda anlatılan tamamlanmış DMEM-HA besiyeri kullanılmıştır. Kültürün devam edebilmesi için 75 cm² lik flasklar kullanılmıştır. Hücrelerin kültür başlangıcı flaskın %50'sini kaplayacak düzeyde olup, hücrenin yoğunluğu flaskın %70'ini kaplayacak seviyede 1x10⁶ – 2x10⁶ aralığına ulaştığında kültür devamlılığını sağlamak amacıyla haftada 2-3 kez pasajlanmaktadır.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

MCF-7 hücreleri kullanılan flask yüzeyinin %70'ine ulaştığında 2 veya 4'de pasajlanmalıdır. Pasajlama işlemine öncelikle hücrenin besiyeri uzaklaştırılarak başlanır. Ardından 6ml 1X PBS ile yıkanır ve PBS uzaklaştırılır. Üzerine 1ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek her tarafa eşit dağıldığından emin olunduktan sonra inkübatörde 2-3 dakika kadar inkübe edilir. Daha sonra 6 ml tamamlanmış DMEM-HA eklenerek hücreler pipetaj yardımıyla kaldırılır ve istenilen sayıda bölünür veya dondurularak saklanabilir.

3.2.3. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği

%70 DMEM- HA (complete medium)

%20 Fetal Bovin Serum (FBS)

%5 DMSO

Kültürdeki canlılık oranı yüksek sağlıklı hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere dondurularak sıvı azotta stoklanmıştır. Dondurma işlemi için 1X tripsinle muamele olan hücreler steril falkon içerisine alınarak 300xg'de, 4°C'de, 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve pelet dondurma besiyeri ile süspanse edilerek dondurma tüpünün içerisine 1 ml olacak şekilde eklenir. Dondurma tüpü -80°C'de soğuk dondurucu kapta bir gece muhafaza edilir. Daha sonra dondurma tüpü sıvı azot tankına alınarak -196°C'de saklanmıştır.

3.2.4. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması

Sıvı azotta stoklanmış olan hücreler 37 °C'lik su banyosunda hızlıca çözdürülür. Çözülmüş olan hücreler 15 ml' lik steril falkona aktarılır. Üzerine 2ml DMEM-HA besiyeri ilave edilerek 300xg'de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant kısmı hücre uzaklaştırılır. Daha sonra pelet üzerine tamamlanmış DMEM- HA besiyerinden 2ml eklenerek pelet besiyeri içerisinde süspanse edilir. Süspanse olan hücreler sayıldıktan sonra sayısına bağlı olarak steril flaska ekimi yapılır.

3.2.5. Hücrelerin Sayım Yöntemi

Hücre kültürü çalışmalarında yapılacak olan denemelerden önce belirli ve eşit sayıda hücre alınabilmesi için hücre sayımı yapılmıştır. Kültürün içindeki canlı ve ölü hücre miktarını belirlemek için 1:1 (v:v) oranında hücre süspansiyonundan ve tripan mavisini birbirine karıştırılmıştır. Karışımdan 10µl alınarak Neubauer lamına mikro pipet yardımıyla aktarılmıştır.

Neubauer lamına aktarılan hücre-tripan mavi karışım ışık mikroskobu altında 4 büyük kare içerisinde konumlanmış olanlar sayılmaktadır. Canlı hücreler şeffaf görünürken, ölü hücreler ise tripan mavisinden dolayı koyu mavi görülmektedir. Her büyük kareye düşen canlı ve ölü hücreler ayrı ayrı sayılarak ortalamaları alınmaktadır.

Sayılan hücrelerin ortalaması, dilüsyon faktörü ve 10^4 sabiti çarpılarak 1 ml’de ne kadar canlı hücre olduğu bulunmaktadır. Saymış olunan canlı ve ölü hücreleri birbirleri ile oranlayarak canlılık yüzdesi hesaplanmaktadır. Eğer ki sayılan hücrenin canlılık oranı %80 ve üzeri ise deneme kurulmaktadır.

3.2.6. İlaç Stoklarının Hazırlanması

Doksorubisin (Doxo), spektrum aktivitesi olan bir antrasiklin antikanser ajanıdır. Doxo aynı zamanda topoizomerez II’nin katalitik domainine bağlanır ya enzimle oluşturduğu kompleksle DNA’da kırık oluşturur ya da enzimin katalitik fonksiyonu gibi davranan kompleks DNA zincirine intekale olur (Abdel-Aal ve ark, 2019) Meme, yumurtalık, akciğer (SCLC), ALL, AML, Hodgkin ve Hodgkin olmayan lenfoma, Neuroblastoma ve Wilms tümörü gibi farklı kanser türlerinin tedavisi için klinik olarak onaylanmıştır. Doxorubisin ve diğer antikanser ajanların terapötik faydaları, toksisiteleri ve direnç geliştirmeleri ile sınırlıdır. Bu nedenle, bu sınırlamaların üstesinden gelmek için yeni yollar bulmak arzu edilir (El-Awady ve ark, 2016).

Gilmartin ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada Wip1’in spesifik antagonisti olan GSK2830371’i keşfetmişlerdir (Gilmartin ve ark, 2014). Wip1 üzerindeki RRA (Wu ve ark, 2018) VA peptidine spesifik olarak bağlandığı bilinmektedir (Richter ve ark, 2015).

Tez çalışmasında kullanılan doxorubicin ve GSK2830371 ticari olarak temin edilmiş ve her denemeden önce konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözündürülerek stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti 1 aya kadar +4 °C’ de saklanmıştır.

3.2.7. Hücrelerin İnkübasyon Koşullarının Hazırlanması

Hücrelerin inkübe edildiği normoksik koşullar standart olarak her hücre kültürü inkübatöründeki gibi %20 oksijen, %5 CO₂ ve %90 nem oranını içermektedir. Hipoksik koşullar ise yaklaşık %1 oksijen, %5 CO₂ ve %90 nem oranını içermektedir. Hipoksik koşulu sağlayabilmek için modüler inkübatör chamber tabanına distile su ile nemlendirilmiş peçete serilir ve üzerine oturtulan tabana ise hücre plateleri eklenir. Ardından chamber kapağı kapatılarak kelepçesinden sıkıştırılır. Ön tarafında yer alan iki gaz giriş hortumunun klipsleri açılarak birinden %95’lik N ve %5’lik CO₂ gaz karışımının yaklaşık 10 dakika

kadar chamber içerisinde sirkülasyonu sağlanır. Süre sonunda gaz çıkışının sağlandığı hortumdaki klips kapatılarak 2 dakika kadar da gazın chamber içerisine dolması beklenir. Ardından gaz girişinin olduğu klips de kapatılarak modüler inkübatör chamber artık hipoksik bir ortama sahip olmuş olur.

3.2.8. Hücre Kültürü Çalışmalarının ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan MCF-7 hücre dizisiyle kemoterapi ajanı olan doksorubisin, Wip1 inhibitörü olan GSK2830371 ve her ikisi kombin halinde kullanılarak hem hipoksik hemde normoksik koşullar altında çeşitli deneyler kurulmuştur. Literatür araştırması ve ön denemelerle birlikte ilaçların apoptotik ve senesensi indüklediği uygun konsantrasyonlar belirlenmiştir. Bölüm 3.2.7.'de anlatıldığı gibi normoksik ve hipoksik koşullar altında inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde; Apoptozun indüklemesi için 24 saatlik, senesensi indüklemesi için ise 72 saatlik sürenin sonunda deneme sonlandırılmıştır. Devamında Annexin V, hücre döngüsü ve western blot analizleri yapılmıştır.

3.2.8.1. MCF-7 hücre hattında apoptozisin indüklendiği çalışmaların hazırlanışı

Çalışmalarda kullanılan steril sarf malzemeler çalışmanın türüne göre değişiklik göstermektedir. Annexin V analizi için 48 kuyucuklu plaklarda, her kuyucukta 1ml içerisinde 1×10^5 hücre olacak şekilde ayarlanmaktadır. Hücre döngüsü analizi için 24 kuyucuklu plaklarda, her kuyucukta 2 ml içerisinde 2×10^5 hücre olacak şekilde ve western blot analizleri için ise 10cm'lik petride 6ml içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde hazırlanmıştır.

Yapılan çalışmada, normoksik ve hipoksik koşullar altında 24 saatlik inkübasyona bırakılan deney grupları aşağıdaki gibidir;

1. Kontrol grubu (K)
2. DMSO grubu (D)
3. Sadece GSK2830371'in $5 \mu\text{M}$ konsantrasyonu (G)
4. Doksorubisin'in $1 \mu\text{M}$ konsantrasyonu (D1)
5. Doksorubisin'in $1,75 \mu\text{M}$ konsantrasyonu (D2)
6. Doksorubisin'in $1 \mu\text{M}$ ve GSK2830371 $5 \mu\text{M}$ konsantrasyonları (G+D1)

7. Doksorubisin'in 1,75 μ M ve GSK2830371 5 μ M konsantrasyonları (G+D2) olmak üzere 7 farklı deney grubu bulunmaktadır.

DMSO bu çalışmada çözücü kontrol grubu olarak kullanılmıştır. DMSO çözücü miktarı gruplar arasında son konsantrasyonu en yüksek olan GSK2830371 grubu baz alınmıştır ve hesaplanarak hücreye verilmektedir. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlar stok ilaç çözeltisi içerisinde besiyeri ile seyreltilerek hücrelere verilmektedir. Hücreler normoksik ve hipoksik ortamlarda 37 °C'de içeren ortamda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.8.2. MCF-7 hücre hattında senesensin indüklendiği çalışmaların hazırlanışı

Bu çalışmada, hücre döngüsü analizi ve SA- β -Galaktozidaz boyaması ve H2A.X analizi için 12 kuyucuklu platelere 2ml içerisinde 5x10⁴ hücre, western blot analizi için ise 10cm'lik petrilere 6ml içerisinde 5x10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Deney grubu aşağıdaki gibidir;

1. Kontrol (K)
2. DMSO (D)
3. Sadece GSK2830371'in 5 μ M konsantrasyonu (G)
4. Doksorubisin'in 0,5 μ M konsantrasyonu (D0)
5. GSK2830371'in 5 μ M ve Doxorubicin'in 0,5 μ M konsantrasyonları (G+D0) olmak üzere 5 farklı deney grubu bulunmaktadır.

Hücreler normoksik ve hipoksik ortamlarda 37 °C'de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.8.3. Wst-1 testi

Metabolik aktivite ölçen bu test canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrışması temeline dayanmaktadır. Wst-1 (water- soluble tetrazolium salt) kolorimetrik, non-radyoaktif ve spektrofotometrik bir testir.

Bölüm 3.2.8.1. ve Bölüm 3.2.8.2.' de belirtildiği gibi GSK2830371 (GSK) ve Doksorubisin (Doxo) cevaben normoksik ve hipoksik ortamlarda 24 saatte apoptozisin indüklendiği MCF-7 hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu test ile GSK ve Doxo ilgili süre ve konsantrasyonlarda metabolik aktivite üzerine etkileri belirlenmiştir. 96 kuyucuklu steril

plaklarda her bir deney grubu için ayrı ayrı üçer kuyucuk belirlenmiştir. Her bir kuyucuğa 100µl tamamlanmış besiyeri içerisinde 8×10^3 hücre aktarılmış ve ilgili konsantrasyonlarla muamele edilerek normoksik ve hipoksik koşullar altında 37 °C’de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda kontrol grupları ve Doxo renginden kaynaklanan hatayı indirgeme amacıyla yapılan hücresiz Doxo içeren besiyerli kuyucuklar dahil olmak üzere her kuyucuğa 10µl Wst-1 solüsyonundan eklenmiştir. Hücreler tekrar kendi normoksik ve hipoksik ortamlarına geri konarak 1 saat 37 °C’de bekletilmiştir. İnkübasyonu takiben oluşan renk değişimini spektrofotometrede 450 nm’ de ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri % Canlılık = $(A_{İLAC} \times 100 / A_{KONTROL})$ formülüne göre hesaplanmıştır. Bu değerler daha sonra ‘Origin 8’ programı aracılığıyla grafiğe aktararak değerlendirilmiştir. ($A_{İLAC}$: İlaç uygulanan grubun absorbans değeri, $A_{KONTROL}$: Kontrol grubunun absorbans değeri)

3.2.8.4. SA-β-Galaktozidaz boyama testi

Senesense uğramış yani yaşlanmış hücrelerin tespiti için bu boyama yapılmıştır. Öncelikle MCF-7 hücreleri Bölüm 3.2.8.2’de anlatıldığı gibi normoksik ve hipoksik koşullar altında 72 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücreler 2 kez pH: 6.0 olan 1mM MgCl₂ içeren PBS ile yıkanmış ve daha sonra PBS/MgCl₂ uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında hücrelerin üzerine PBS/MgCl₂ içerisinde hazırlanan % 0.25 glutaraldehit % 2 paraformaldehit içeren fiksasyon tamponu eklenerek 10 dakika fikse olmaları için oda sıcaklığında inkübe edilir. Süre sonunda 2 kez PBS/MgCl₂ ile yıkanır ve PBS ortamdan uzaklaştırılır. Boyama solüsyonu 40mM Sitrik asit/ Sodyum fosfat solüsyonundan 20ml, 1M MgCl₂’den 0,8ml, 150mM NaCl’den 6ml, 5mM K₄Fe₆’dan 2ml, 5mM K₃Fe₆’dan 2ml ve üzerine 20ml distile su eklenerek hazırlanır. 0,45’lik filtreden geçirilerek sterilize edilir. Boyama solüsyonundan sadece boyama yapılacak miktar kadar alınır ve içerisine 40mg/ml X-Gal stok solüsyonundan son konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde boyama solüsyonu eklenir. Yaklaşık 4 saat boyunca 37 °C’de nemli bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 3 kere PBS/MgCl₂ ile yıkanır. İnvert mikroskopta incelenen hücreler boyama sonrası senesense uğrayan hücreler mavi renkte görülmektedir. Hücrelerin bu görüntüsü daha sonra fotoğraflanmıştır.

3.2.8.5. Annexin V apoptozis testi

Sağlıklı hücre membranının sitozolik kısmında bulunan fosfotidilserin, hücre apoptotik hale geldiğinde membranın ekstraselüler kısmına flip-flop hareketi yaparak yer değiştirir. Annexin V testinin prensibi de apoptotik hücrelerde ekstraselüler kısımda bulunan fosfotidilserine bağlanmasına dayanmaktadır. Böylelikle sağlıklı ve apoptotik hücreler birbirinden ayırt edilebilir hale gelmektedir. Bu test ile apoptotik hücrelerin kantitatif analizini muse hücre analizörü kullanılarak gerçekleştirilir.

Bölüm 3.2.8.1.'de anlatıldığı üzere MCF7 hücreleri 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra apoptozisin Annexin V testiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda kültürdeki hücrelerin üzerindeki besiyeri 1,5ml alınarak ependorflara alınır. Hücreler 1X PBS ile yıkanır ve PBS uzaklaştırılır. Her kuyucuğa 100µl 1X tripsin eklenerek 37°C'de 2 dakika inkübe edilir. Daha önceden ayrılmış olan besiyerleriüzerilerine eklenerek pipetaj yardımıyla hücreler yüzeyden kaldırılır ve 300xg'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatanttan 100 µl kalacak şekilde pellete dokunmadan alınır. Her bir örneğin üzerine 100 µl 'Annexin V' solüsyonundan eklenir ve pelletler pipetaj yardımıyla süspanse edilir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildikten sonra muse hücre analiz cihazında ölçümü yapıldı. Ölçüm sonucunda elde edilen değerler daha sonra 'Origin 8' programı aracılığıyla istatistik analizleri yapılmış ve grafiğe aktararak değerlendirilmiştir.

3.2.8.6. Hücre döngüsü testi

Hücre döngüsü testi temelde DNA'nın propidium-iodid ile boyanmasıyla hücrenin üç fazdan (G0/G1, S ve G2/M) hangisinde tutuklandığını tespit etmektedir.

Hücre döngüsü testi için bölüm 3.2.8.1. ve 3.2.8.2.'de bahsedildiği gibi hücreler 12 kuyucuklu platelerde 24 saat ve 72 saat normoksik ve hipoksik şartlarda inkübe edilirler. Hücre döngüsü tutuklanması var mı, varsa hangi fazda tutuklanma gerçekleşiyor bunu tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

Bu test için inkübasyon sürelerini tamamladıktan sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri atılır ve hücreler 1ml 1X PBS ile yıkanır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1X Tripsin-EDTA'dan 200µl eklenir ve 37°C'de 2-3 dakika inkübe edilir. Üzerlerine 1 ml besiyeri eklenir ve pipetaj yardımıyla hücreler süspanse hale gelir.

Kuyucuktan bütün besiyeri alınarak 1,5ml'lik eppendorflara aktarılır ve 300xg'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılır, peletler ise 1ml 1X PBS ile yıkanır ve 300xg'de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır ve peletlerin üzerine %70'lik soğuk etanolden 1ml eklenerek yavaşça pipetaj yapılır. -20 °C'de en az 3 saat bekletilir. Süre sonunda fiksasyon 300xg'de 5 dakika santrifüj edilerek etanol uzaklaştırılır. Pelet tekrar 1ml 1x PBS ile yıkanarak santrifüjlenir ve uzaklaştırılır. Daha sonra her bir eppendorfta bulunan pellet üzerine muse cell cycle reagenttan 200µl eklenerek pellet süspanse edilir. Örnekler karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir. Ölçümleri muse hücre analizöründe gerçekleştirilir. Sonucunda elde edilen veriler 'Origin 8' programı aracılığıyla grafik oluşturulmuştur.

3.2.8.7. H2A.X testi

Muse H2A.X analizi için bölüm 3.2.8.2.'de belirtildiği gibi 72 saatte senesensin indüklendiği hücrelerin üzerinden besiyerleri uzaklaştırılır. Hücreler 1XPBS ile yıkanır ve PBS uzaklaştırılır. Hücrelerin tripsinle kaldırılmasını takiben üzerine besiyeri eklenir ve eppendorfa alınır. Hücreler 5 dakika 300xg'de santrifüj edilir ve süpernatant atılır. Tekrar 1XPBS ile yıkanır ve aynı devir ve dakikada santrifüjünü takiben PBS pelletin üzerinden uzaklaştırılır. Pellet üzerine 500µl 1XAssay Buffer ve 500µl Fiksasyon Buffer eklenerek örnekler buz üzerinde 5 dakika kadar bekletilir. Daha sonra 300xg'de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırılır. Örneklerin üzerine 500µl Permabilizasyon Buffer eklenerek 5 dakika daha buzda bekletilir. Süre sonunda örnekler 300xg'de 5 dakika santrifüj edilir ve sonra süpernatant uzaklaştırılır. Pellet üzerine 450µl 1XAssay Buffer eklenir ve 92µl içerisinden alınarak yeni eppendorfa aktarılır. Üzerine 4'er µl anti-Histone H2A.X/PECy5 ve anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) tüplerin içerisinde aktarılır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika beklendikten sonra Muse hücre analiz cihazında ölçümü gerçekleştirilir.

3.2.8.8. Western Blot analizi için yapılan çalışmalar

3.2.8.8.1. Protein izolasyonu

Western blot analizi için Bölüm 3.2.8.1 ve 3.2.8.2.'de belirtildiği gibi hazırlanarak 24 ve 72 saatte apoptozis ve senesensin indüklendiği hücreler alınarak besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1X PBS ile 2 kez yıkanmış ve PBS uzaklaştırılmıştır. Herbir petriye 100µl olacak şekilde RİPA lizis tamponundan eklenmiştir. Petriler buz üzerine alınarak 5 dakika boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde 500 rpm'de sallanmıştır. Daha sonra petri üzerindeki hücreler scraperla kazınarak eppendorfların içine alınmıştır ve 4°C'de 450 rpm'de 30 dakika boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde çalkalanmıştır. Örnekler son olarak 4°C'de 13500 rpm'de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjü takiben çöken DNA pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırılır ve böylece protein izolasyonu tamamlanmış olur.

Protein izolasyonu için kullanılan RİPA lizis bufer içeriği aşağıda verilmiştir.

RİPA Lizis Buffer İçeriği (100 ml Stok İçin): 10 ml Tris-HCl (0,5M), 3 ml NaCl (5M), 10 ml Tris-HCl (0,5M), 0,5 ml EDTA (0,5M), 0,1 g SDS, 0,5 g Sodyum deoksikolat

Kullanmadan önce stok içerisinde 12ml bir falkona alınır. İçersine 120 µl 100mM Na₃VO₄ ve yarım tablet proteaz inhibitör kokteyl eklenerek kullanıma hazır hale getirilir.

3.2.8.8.2. Protein miktar tayini

Yapılacak olan western öncesinde protein izolasyonu yapılmış olan örneklerin total protein miktarının belirlenmesi için Thermo Scientific BCA Protein Assay Kit kullanılmıştır. Bu kit içerisinde bulunan BSA standart olarak kullanılmak üzere µg/ml değerleri sırasıyla 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 50 ve 0 olacak şekilde seyreltilerek distile su içerisinde hazırlanmıştır. Bu standartlar bölünerek tek kullanımlık olarak -20'de uzun süre saklanmaktadır.

Miktar tayini yapılacağı zaman 96 kuyucuklu plate içerisinde iki tekrar şeklinde her bir standarttan 20 µl eklenir. Ardından miktarı belirlemek için örnekler 1:10 dilüsyonu yapılarak iki tekrar şeklinde 20 µl eklenir. Kör olarak ise protein izolasyonu RİPA lizis tamponu içerisinde yapıldığı için aynı şekilde o da örnek gibi 1:10 dilüsyonundan 20 µl alınarak iki tekrar şekilde eklenir. Kit içerisinde bulunan A ve B solüsyonundan miktarı örnek sayısına bağlı olarak 50:1 oranında karıştırılır. Her bir standart, örnek ve körün

üzerine 200 µl eklenerek etüv içersinde 30 dakika 37 °C’de inkübe edilir. Ardından plate 562nm’de spektrofotometrede ölçümü yapılır.

3.2.8.8.3. Western Blot analizi

Western blotlama; SDS-PAGE (SDS- Poliakrilamid Gel) elektroforezi ile proteinlerin moleköl ağırlıklarına göre ayrılması, jelde ayrılmış olan proteinlerin nitroselüloz veya polivinilidin difluorid (PVDF) membrana transferi, membranda nonspesifik bağlanmayı önlemek için bloklama işlemi, spesifik primer antikola muamele, primer antikora bağlanan sekonder antikora muamele, sekonder antikorda bulunan işaretleyiciye spesifik substratla reaksiyon ve görüntüleme basamaklarına sahip bir tekniktir.

Western Blot için kullanılan tamponlar ve solüsyonlar aşağıda belirtildiği gibidir.

Lower Buffer (500 ml): 91 g Tris-base, 20 ml %10’luk SDS, 14 ml HCl (6N) üzeri 500ml’ye tamamlanacak şekilde distile su eklenir ve pH’ı 8,8’e ayarlanır.

Upper Buffer (500 ml): 30,5 g Tris-base, 20 ml %10’luk SDS, 30 ml HCl (6N) üzeri 500ml’ye tamamlanacak şekilde distile su eklenir ve pH’ı 6,7’e ayarlanır.

%40 Amonyum persülfat: 0,4 g APS, 1 ml Distile su

10X Running Buffer (1L): 30 g Tris-base, 144 g Glycin, 15 g SDS, Distile su (pH: 8,6)

1X Running Buffer (1L): 100 ml 10X Running Buffer, 900 ml Distile su (pH: 8,6)

TOWBIN Transfer Buffer (800 ml): 3.03 g Tris-base, 14,4 g Glycin, 5 ml %10’luk SDS, Distile su (pH: 8,1-8,5) **Not:** Blotlama işleminden önce %20 metanol ilave edilmektedir.

10X TBS (1L): 30,2 g Tris-base, 43,8 g NaCl, 932 mg KCl

1X TBS-t (1L) : 100 ml 10X TBS, 900 ml Distile su, 1 ml Tween 20

%6’ lık Süt Tozu (Skim Milk) Solüsyonu: 20 ml 1X TBS-t, 1,2 g Skim Milk

%5’lik Bovin Serum Albümin (BSA) Solüsyonu: 10 ml 1X TBS-t, 0,5 g BSA

3.2.8.8.3.1. Poliakrilamid jelin (SDS-PAGE) hazırlanması

Western Blot için kullanılacak olan cam platelerin öncelikle distile su ile silinmiş ve kurulanmış olması gerekmektedir. Jel dökmek için gerekli olan stand üzerine camlar, sızıntı yapmayacak şekilde sıkıca yerleştirilir. Çalışılacak olan proteinin moleküler ağırlığına göre %7,5, %8 veya %10’luk ayırıcı jel Tablo 8’de gösterildiği üzere hazırlanarak iki cam arasına mikropipet yardımıyla 2cm boşluk kalacak şekilde dökülür. Jelin üst yüzeyinin

bozulmasını engellemek için üzerine izopropanol eklenerek 15-20 dakika oda sıcaklığında polimerleşmesi için beklenir. Polimerleşen jelin üzerindeki izopropanol dökülerek %3'lük paketleyici (stacking) jel Tablo 8'de gösterilediği gibi hazırlanarak ayırıcı jelin üzerine mikropipet yardımıyla dökülür. Hızlı bir şekilde camların arasına taraklar yerleştirilerek üst jelin polimerizasyonu için oda sıcaklığında 15-20 dakika beklenir.

Tablo 7. Paketleyici ve ayırıcı jelin içeriği ve miktarları

Bileşenler	2X Paketleyici Jel	2X Ayırıcı jel konsantrasyonları		
	%3	%7,5	%8	%10
Distile su	3,27 ml	5,73	5,55 ml	4,8 ml
Upper Buffer	1,25 ml	-	-	-
Lower Buffer	-	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
%40 Akrilamid/bisakrilamid	0,380 ml	2,82	3 ml	3,75 ml
%10 SDS	50 µl	150 µl	150 µl	150 µl
Gliserol	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
TEMED	6 µl	12 µl	12 µl	12 µl
%40 APS	12 µl	18 µl	18 µl	18 µl

3.2.8.8.3.2. Jele yüklenecek protein örneklerinin hazırlanması

Western blot analizi için, Bölüm 3.2.8.1 ve 3.2.8.2'de belirtildiği gibi hazırlananmıştır. Örneklerin bölüm 3.2.8.8.1 ve 3.2.8.8.2'de anlatıldığı gibi total protein izolasyonu ve miktar tayini yapıldıktan sonra belirlenmek istenen proteine göre en az 150 µg olacak şekilde miktarları birbirlerine eşitlenmiştir. Örnekleri jele yüklemeye önce 6X loading dye ile karıştırıp 95 °C'de 5 dakika inkübe ederek proteinlerin denatürasyonu sağlanmış olur. Örnekler bu aşamadan sonra jele yüklenmeye hazırdır.

6X Loading Dye (10 ml) : 3,75 ml 1M Tris-HCl (pH: 6,8), 5 ml Gliserol+H₂O (4:1), 1 g SDS, 900 µl Merkaptotanol, % 0,06 Bromfenol blue, Distile su

3.2.8.8.3.3. Elektroforetik yürütme işlemi

Bölüm 3.2.8.8.3.1'deki gibi hazırlanan SDS-PAGE dikey jel elektroforezi kasetine yerleştirdikten sonra tankın içerisine koyulur. Kasetlerin arasına ve tanka 1X Running Buffer eklenir ve jeldeki taraklar çıkartılır. Kuyucuklara protein marker ve bölüm 3.2.8.8.3.2 deki gibi denatürasyonu gerçekleştirilmiş örneklerden 37 µl eklenir. Tankın kapağı kapatılarak güç kaynağıyla bağlantısı yapılır. Örnekler stacking jelden seperating jele gelene kadar 90 voltta 30 dakika seperating jelde ise 120 voltta 100 dakika yürütülür.

3.2.8.8.3.4. Yarı-kuru transfer (semi-dry blotting)

Transfer aşamasında kullanılacak olan blotlama kağıtları 11cm eni 15cm boyu olacak şekilde 12 adet kesilir. Bu kağıtların 6 tanesi, %20 methanol eklenmiş olan towbin buffer içerisinde ıslatılır ve blotlamayı yapacak olan transfer cihazına yerleştirilir. Transfer işlemi için gerekli olan PVDF membranın aktive olabilmesi için 5 dakika kadar metanolde bekletilmesini takiben birkaç saniye towbin bufferda bekletilir ve transfer cihazına blotlama kağıdının üzerine yerleştirilir. Yürüme işlemi tamamlanmış olan jeli çıkarmak için öncelikle kaset tanktan çıkartılır. Ardından iki cam birbirinden ayrılır ve jelin üst kısmı ayrılarak sadece ayırıcı kısmı membran üzerine alınır. Üzerine blotlama kağıtlarından kalanı %20 metanollü towbin bufferla ıslatılarak transfer cihazının en üstüne koyulur. Böylece bir sandviç sistemi oluşturulmuş olur ve transfer cihazının kapağı kapatılarak 0,4A° akım ve 25V'da 37 dakika transfer işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemler sırasında sandviç sistemi içerisinde özellikle membranın bulunduğu bölgede hava kabarcığı ya da tütün bulunmamasına dikkat edilmelidir çünkü transfer işlemini olumsuz yönde etkilemektedir.

3.2.8.8.3.5. Membranı bloklama işlemi

Blotlama işlemi tamamlanmış olan membrana daha sonra %6'lık yağsız süt tozunda oda sıcaklığında 1 saat açılı orbital çalkalayıcı üzerinde çalkalanır. Bu işlembir sonraki basamakta kullanılacak olan primer antikor için protein olmayan kısımları örterek spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçmektedir. Süre sonunda bloklama için kullanılan sütfalkon içerisinde kaldırılarak sekonder antikor hazırlanmak üzere +4°C'de buzdolabında saklanır. Daha sonra 2 dakika süresince 10ml 1X TBS-t solüsyonuyla membran yıkanarak fazla süt uzaklaştırılmış olur.

3.2.8.8.3.6. Membranın primer antikor ile muamelesi

ATM, ATM-p, ATR, ATR-p, HIF-1 α , Wip1, Chk1, Chk1-p, Chk2, Chk2-p, p53, p-p53, p-BRCA-1, γ H2AX, p21, p27-Kip ve internal kontrol olarak GAPDH, β -Aktin primer antikorları kullanılmıştır. Bu antikorların Tablo 8.'deki gibi 1ml'de 1 μ g olacak şekilde dilüsyon oranları belirlenmiş ve % 5'lik BSA solüsyonu içerisinde dilüe edilir. Hazırlanan

primer antikor bloklayıcı basamağını tamamlamış olan membranın üzerine eklenerek 16 saat boyunca 4 °C’de açılı çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılır.

Tablo 8. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon katsayıları

Antikor	Dilüsyon Oranı
ATM-t, ATM-p	1:1000
ATR-t, ATR-p	1:1000
HIF-1 α	1:1000
Chk2-t, Chk1-t	1:200
Chk2-p, Chk1-p	1:1000
Wip1	1:500
γ H2AX	1:800
GAPDH	1:10000
β -Aktin	1:5000
P53-t	1:500
P53-p	1:1000
BRCA1-p	1:1000
P27-Kip	1:1000
P21	1:200

3.2.8.8.3.7. Membranın sekonder antikor ile muamelesi

Membranın primer antikorla inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra primer antikorı yeniden kullanabilmek için bir falkona alarak 4°C’de saklanır. Daha sonra membran 5 dakika süreyle 3 kez 1X TBS-t solüsyonu ile yıkanır. Bu basamağı takiben primer antikor hangi canlıda üretildiyse o canlının seconder antikoruna alınarak %6’lık yağsız süt tozu içerisinde Tablo 10.’daki oranlarla hazırlanır. Hazırlanmış olan seconder antikor içerisinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilir. Bu basamaktan sonra membran tekrar 5 dakika süreyle 3 kez 1X TBS-t solüsyonu ile yıkanır.

Tablo 9. Kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyon katsayıları

Antikor	Dilüsyon
Anti-Mouse IgG-HRP	1:1500
Anti-Rabbit IgG-HRP	1:1500

3.2.8.8.3.8. Kemilüminesans yöntem ile membran görüntüleme

Sekonder antikor uzaklaştırmak için yapılan yıkama işlemini takiben membran üzerindeki proteinlerin doğru yerde olduğundan emin olmak için protein marker WesternSurePen (Licor) kalem ile işaretlenir. Membran üzerine ECL solüsyonu eklenerek 5

dakika kadar karanlıkta inkübe edilir. Ardından ChemiDoc-ItR2 Imager (UVP) cihazı ile görüntülenir.

3.2.8.9. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu Thermo Scientific “GeneJET Genomik DNA Purification Kit” kullanılarak yapılmıştır.

Daha önceden MCF-7 ve BJ hücre hatları 10ml’de 1×10^6 hücre olacak şekilde 10cm’lik petriye ekimi yapılır. Petrilerde kültüre edilen bu hücre hatları konfluent olduklarında 1XPBS ile yıkanır. PBS uzaklaştırılır ve scraperla kazıyarak hücreler mikrosantrifüj tüp içerisine alınır. 250xg’de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılır. Pellet 200µl 1XPBS ile süspanse edilir üzerine 200µl Lizis buffer eklenir. 20µl Proteinaz K eklendikten sonra kısaca vortekslenir ve 600rpm’de 10 dakika 56°C’de çalkalanır. Örnekler oda ısısına geldiğinde üzerlerine 20µl RNaz A eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyonun sonunda üzerine 400µl %50’lik etanol eklenir. Bütün lizat kolona aktarılır ve 6000xg’de 1 dakika santrifüj edilir. Ardından toplama tüpü yensiyle değiştirilir ve kolona 500 µl yıkama solüsyonu 1’den eklenerek 8000xg’de 1 dakika santrifüjlenir. Daha sonra toplama tüpü yensiyle değiştirilir ve kolona 500 µl yıkama solüsyonu 2’den eklenerek 12000xg’de 3 dakika santrifüjlenir. Toplama tüpü boşaltılır ve yeniden kolonun altına takılır ardından maksimum hızda 1 dakika daha santrifüjlenerek kolonda herhangi bir şeyin kalması önlenmiş olur. Toplama tüpü atılır ve yerine steril mikrosantrifüj tüpleri yerleştirilir. Tam kolonun ortasına denk gelecek şekilde kolona değmeden 50 µl elüsyon buffer eklenir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildikten sonra 8000xg’de 1 dakikasantrifüj edilir. Qubit DNA Broad Range kiti kullanılarak Qubit cihazında DNA miktar tayini yapılmasının ardından daha sonra kullanmak için hızlıca -20°C’ye kaldırılır.

3.2.8.10. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

MCF-7 hücre dizisinden Bölüm 3.2.8’de belirtildiği gibi izolasyonu ve miktar tayini yapıldıktan sonra Wip1 ekzonlarında mutasyon taraması için sekanslama işlemi öncesi

PCR'ı yapılmıştır. Hücre DNA 2 µl totalde 200ng olacak şekilde ayarlanarak 7 farklı PCR tüpüne eklenmiştir.

Tablo 10'da gösterilen her bir ekzon için ayrı master mix hazırlanmış olup hazırlanışı aşağıdaki gibidir;

10X Buffer (w/20mM Mg²⁺): 5 µl

dNTP(her biri 2,5mM): 5µl

Forward primer (10µM): 1 µl

Reverse primer (10µM): 1 µl

MgCl₂(25mM): 0,5 µl

i-Startaq (5U/µl): 0,5 µl

Steril DNaz RNaz free su:35µl

Tablo 10. Wip1 ekzonlarına spesifik primerler (Kleiblova ve ark, 2013)

Primerler	Forward	Reverse
Ekzon 1	5'-GCGAGCGCCTAGTGTGTCTCC-3'	5'-GCGCCAAACAAGCCAGGGAAC-3'
Ekzon 2	5'-GTTGCCATTTGTATCCTGACAGTG-3'	5'-CTTCAGTAAAAGGGACAGTAGTAGGTC-3'
Ekzon 3	5'-CAGGAATTTTGGCTTATGCATCTTTG-3'	5'-AGTAAGGGTTTAGTTCTGTCTCCTC-3'
Ekzon 4	5'-CTGTTGCTGTTGTACTATTAGCTTCC-3'	5'-TGCAAAAATCTACCCAAGGTCAATG-3'
Ekzon 5	5'-GATACAGATGTAGTGGCAGCTAAATC-3';	5'-CGCTAACCAAAGAACTGGTGTC-3'
Ekzon 6a	5'-TGCCATCCTACTAGCTTCATAAGAAG-3'	5'-TTGGTCCATGACAGTGTGTTGTTG-3'
Ekzon 6b	5'-TTCCAATTGGCCTTGTGCCTA-3'	5'-AAAAAAGTTCAACATCGGCACCA-3'

Her bir ekzon için hem örnek hemde negatif kontrol hazırlanmıştır. Negatif kontrol için 7 farklı tüpe DNA yerine steril su eklenmiştir. Ardından her bir ekzona özel hazırlanan tüplerin üzerlerine 48 µl mastermix eklenir. Yalnızca ekzon 1 için hazırlanan mastermixe enzim eklerken her bir örnek için 1 µl DMSO eklenir. Ayrıca örnekler üzerine mastermixini ekledikten sonra da her bir örneğin üzerine 1 µl daha DMSO eklenir. Hazırlanan örnekler kısaca vorteklenir ve ardından hızlı bir şekilde birkaç saniye santrifüjlenir. Ardından örnekler thermal cycler cihazına konarak çalışılan ekzona bağlı olarak PCR koşulları Tablo 11'de gösterildiği şekilde ayarlanır.

Tablo 11. Ekzonlara spesifik PCR koşulları

Ekzonlar	1.Basamak		2.Basamak		3.Basamak
Ex1-3-5-6b			54°C		
			20sn		
Ex2-4	95°C	94°C	52°C	72°C	72°C
	5 dk	20sn	15sn	40sn	5 dk
Ex6a			55°C		
			15sn		
Döngü sayısı	1X		35X		1X

Bütün basamaklar tamamlandıktan sonra cihazın +4°C'ye gelmesi beklenir. Ardından cihaz açılır ve örnekler daha sonra agaroz jelde yürütülmek üzere -20°C'ye kaldırılır.

3.2.8.10.1. PCR örneklerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

PCR örnekleri sekansa gönderilmeden önce Bölüm 3.2.8.10'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilen PCR sonucunda, %1'lik agaroz jelde yürütülerek PCR'ın verimliliği ve doğruluğundan emin olunmalıdır. Hazırlanacak olan jelin tamponunun içeriği aşağıdaki gibidir;

10X TAE: 48,4 g Tris base, 11,4 ml glasiyal asetik asit (17,4 M), 3,7 g EDTA, üzeri 1L'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenir.

%1'lik agaroz jel hazırlamak için 1g agaroz tartılarak 100 ml 1XTAE içerisinde çözülmek üzere 250 ml'lik erlen içerisine alınır. Agarozun homojen olarak çözülmesi için mikrodalga fırında kaynayana kadar yaklaşık 5 dakika kadar tutulur. Ardından 50°C'ye gelene kadar soğuması beklenir ve içerisine etidyum bromür analogu olan RedSafe'den 5µl eklenir. Jelin döküleceği kabın lastikleri takılır ve tarağı konulduktan sonra jel dökülür. Oda sıcaklığında yaklaşık 20-25 dakika jelin donması beklenir. Donan jelin kabındaki lastikler çıkartılır ve kap, 1XTAE bufferla dolu olan elektroforez tankına kuyucuklar siyah tarafa yani katoda bakacak şekilde oturtulur. Jelin üzerindeki tarak dikkatlice çıkartılır. Herbir kuyucuğa PCR örneklerinden 10µl ve 6XDNA Loading Dye'dan 5µl olmak üzere totalde 15 µl yüklenir. Son olarak 100bp DNA marker'dan 5µl yüklendikten sonra tankın güç kaynağıyla bağlantısı yapılır ve 80V'da 55 dakika katoddan anoda doğru yürütülür. Süre

sonunda jel görüntüsü UV filtresi altında ChemiDoc-ItR2 Imager (UVP) cihazı ile görüntülenir.

3.2.8.10.2. PCR örneklerinin Sanger sekanslama yöntemiyle sekanslanması

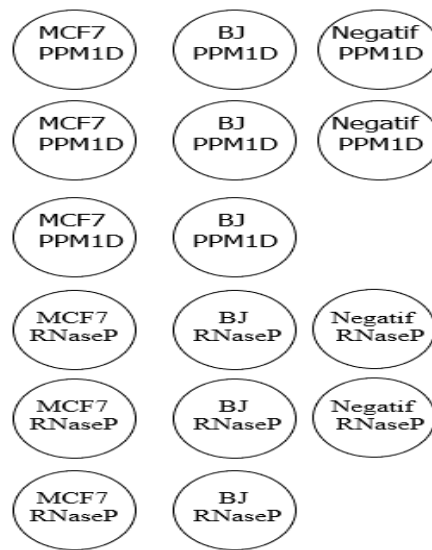
PCR örneklerinin çift yönlü olarak sekanslanması işlemi hizmet alımı olarak yapılmıştır. Sekans primeri her bir ekzonun 5'-3' yönlü (forward) ve 3'-5' yönlü (reverse) primerlerden oluşmaktadır.

3.2.8.11. Real Time PCR analizi (q-PCR)

MCF-7 ve BJ hücre dizilerinde gen kopya sayısı ve gen ekspresyon seviyesini belirlemek için q-PCR yapılmıştır.

3.2.8.11.1. Taqman gen kopya sayısı analizi

MCF-7 hücre dizisinde amplifiye olduğu bilinen *PPM1D*/Wip1 geninin kopya sayısını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bölüm 3.2.8.9.'da tarif edildiği gibi MCF-7 ve BJ hücre dizilerinden genomik DNA ekstraksiyonu yapılır. Bu örneklerden daha sonra q-PCR analizi için steril PCR tüpleri içersine Şekil 7'de gösterildiği gibi üçlü tekrar olarak çalışılır.



Şekil 7. Taqman gen kopya sayısı analizinde kullanılan örnek dizilimi

PPM1D/ *Wip1* geni kopya sayısını belirlemek için iki kopya olduğu bilinen referans gen olan Ribonükleaz P (RNaseP) geni ile karşılaştırılacaktır. q-PCR analizinde aynı zamanda negatif kontrol olarak iki tekrar DNA yerine steril su içeren tüpler ve *PPM1D* geninden iki kopya içerdiği bilinen BJ hücre hattının DNA'sı ekzojen kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 12. 1X Gen kopya sayısı assay için hazırlanan ‘Master Mix’ içeriği

<i>PPM1D</i> için Kullanılan Malzemeler	Miktar
A&B Universal Master Mix(2X)	10 µl
<i>PPM1D</i> Gene Copy Number Assay Prob (20X)	1 µl
Nuclease-free water	7 µl
Total	16 µl
RNase P için Kullanılan Malzemeler	
A&B Universal Master Mix(2X)	10 µl
RNaseP Gene Copy Number Assay Prob (20X)	1 µl
Nuclease-free water	7 µl
Total	16 µl

Örnekler tüplere 5 ng/µl olacak şekilde her bir örnekten 4 µl eklenir. Negatif kontrole ise 4 µl su eklenir. Ardından hazırlanmış olan Master Mix’den her bir tüpe ait olduğu karışımdan 16 µl eklenir. Kısaca vortekslenir ve birkaç saniye santrifüjlendikten sonra analiz edilmeye hazırdır.

Kullanılacak olan ‘Step One Plus’ yazılımında örnekler hazırlanmadan önce Taqman problemlerinin çalışacağı döngü Tablo 13’de gösterildiği gibi ayarlanır. Aynı zamanda kullanılacak olan problemlerin raportör boyaalarını doğru seçimi çok önemlidir. Bu çalışmada kullanılan *PPM1D* geni için FAM ve RNaseP geni için VIC boyası seçilmiştir. Örnekler hazır olduktan sonra q-PCR cihazına alınır ve analiz başlatılır.

Tablo 13. Taqman gen kopya sayısı analizinde kullanılan döngü

Gen Kopya Analizi	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon (1 döngü)	95°C	10 dakika
Amplifikasyon (40 döngü)	95°C	15 saniye
	60°C	60 saniye

Analiz tamamlandıktan sonra A&B q-PCR cihazında bulunan programla analiz edilir ve böylece MCF-7 ve kullanılan internal ve eksternal kontroller arasındaki kopya değişim sayısı belirlenmiştir.

3.2.8.12. Total RNA izolasyonu

RNA izolasyon işlemlerinde ‘GeneJet RNA Purification Kit (Thermo)’ kullanılmıştır.

MCF-7 ve BJ hücre hatları 6ml’de 1×10^6 hücre olacak şekilde 10cm’lik petriye ekimi yapılır. Bir gün önceden hazırlanan deneme MCF-7 kontrol, MCF-7 Doxo $1 \mu\text{M}$ ve BJ kontrol olmak üzere 3 gruptur. Bu gruplar normoksik ve hipoksik koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben steril kabin içerisinde bütün petrilere besiyeri uzaklaştırılır ve steril PBS ile yıkanır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra petrilere %2 β -merkaptoetanol içeren lizis bufferdan 600 μl eklenir ve scraper ile hücreler kazınarak 1,5ml’lik eppendorflara alınır. Daha sonra steril 20G iğne uçlu bir şırınga yardımı ile lizat 3-4 kez şırınga içerisinden geçirilerek içerisindeki hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Üzerine %96’lık steril etanolden 750 μl eklenir ve birkaç saniye vortekslenir. Her bir örnekten ayrı ayrı kolonlara 700 μl eklenerek 12000xg’de 1 dakika santrifüj edilir. Tüm toplama tüpleri ayrı ayrı boşaltılır ve tekrar kolona takılır. Kolon içerisine kalan lizat eklenerek tekrar 12000xg’de 1 dakika santrifüj edilir. Tüm toplama tüpleri ayrı ayrı boşaltılır ve tekrar kolona takılır. Kolonlara 700 μl yıkama tamponu 1 eklenir ve 12000xg’de 1 dakika santrifüj edilir. Tüm toplama tüpleri ayrı ayrı boşaltılır ve tekrar kolona takılır. Kolonlara 600 μl yıkama tamponu 2 eklenir ve 12000xg’de 1 dakika santrifüj edilir. Tüm toplama tüpleri ayrı ayrı boşaltılır ve tekrar kolona takılır. Son işlem bir kez daha tekrar edilir. Ardından kolonların tamponlardan tamamen arınması için boş olarak 12000xg’de 1 dakika santrifüj edilir. Toplama tüpleri atılır ve kolonların altına steril 1,5 ml’lik eppendorflar yerleştirilir. Kolonların üzerlerine 40 μl RNaz-DNazfree su eklenir ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Daha sonra 12000xg’de 1 dakika santrifüj edilir ve ardından kolonlar atılır. Elde edilen RNAların içerisinden 8 μl ayırarak hiç bekletilmeden -80°C de saklanır.

3.2.8.12.1. İzole edilen RNAlara DNaz muamelesi

Elde edilen RNA örneklerinden miktar tayini yapmadan önce DNazla muamele edip cDNA sentezi öncesi DNA kontaminasyonundan kurtulmak gerekmektedir. Bunun için Bölüm 3.2.8.12’de anlatıldığı gibi izole edilen RNA’lardan ayrı bir 1,5ml’lik eppendorfa alınan 8 μl ’nin içerisine buz üzerindeyken 1 μl DNaz buffer ve 1 μl DNaz enzimi eklenerek

oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir. Daha sonra buz üzerine alınarak 0,5µl EDTA eklenir. Örnekler 65°C’de 10 dakika inkübe edilerek DNaz aktivitesi durdurulur. RNA miktar tayini için NanoDrop cihazı kullanılmıştır.

3.2.8.13. Gen ekspresyon analizi

3.2.8.13.1. Komplementer DNA(cDNA)sentezi

Komplementer DNA sentezi Bölüm 3.2.8.12’deki RNA izolasyonunu ve Bölüm 3.2.8.12.1’deki DNaz muamelesini takiben High-Capacity cDNA Revers Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak yapılır. Her bir tüpte 10 µl içerisinde 1µg olacak şekilde RNA miktarı ayarlanır. Tablo 14’de içeriği verilen RT Master Mix’ten her bir örneğin sayısından bir fazlası kadar hazırlanmıştır.

Tablo 14. RT-PCR için hazırlanan 1X ‘Master Mix’

Kullanılan Malzemeler	Miktar
10XRT Buffer	2 µl
10X Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free water	4,2 µl
25XdNTP Mix(100mM)	0,8 µl
Total	10 µl

Her bir tüpün içerisine RT master mixten 10µl eklenir. Hazırlanan tüpler kısaca vortekslenir ve birkaç saniye santrifüjlenerek Termal Cycler cihazına aktarılır. Cihaz, 10 dakika 25°C’de, 120 dakika 37°C’de ve 5 dakika 85°C’de her bir basamak 1X döngüde olacak şekilde sentez toplamda üç basamakta gerçekleşir.

3.2.8.13.2. Gen ekspresyon seviyesinin q-PCR ile belirlenmesi

Hedeflenen *PPM1D* geninin mRNA ekspresyon düzeyini belirlemek için ilgili gen bölgesine spesifik primer ve bu primerlere bağlı Taqman problemleri kullanılmıştır. İnternal kontrol olarak β-aktin, eksternal kontrol olarak Wip1 ekspresyonu düşük olan BJ hücre hattından izole edilen RNAlar baz alınmıştır. Kullanılacak olan RNAlar öncelikle Bölüm 3.2.8.12.1’de bahsedildiği üzere cDNA’ye çevrilmelidir. Örnekler 48 kuyucuklu plate içerisine 1:1 dilüe edildikten sonra 2’şer µl triple tekrarlar şeklinde eklenir. Negatif kontrol

olarak cDNA yerine steril su kullanılmıştır. Tüplere eklenmiş olan cDNA ve steril su üzerine her bir tüpte totalde 20 µl olacak şekilde Tablo 15’deki gibi daha önceden hazırlanan master mix eklenmiştir. Daha sonra cihazda Tablo 16’da bulunan program kurularak analiz başlatılır.

Tablo 15. q-PCR işleminde kullanılanlar ve miktarları

Kullanılan Malzemeler	Miktar
A&B Universal Master Mix(2X)	10 µl
Gene Expression Assay Mix (20X)	1 µl
Nuclease-free water	7 µl
cDNA (Master mixde bulunmaz, önceden tüplere eklenir)	2 µl
Total	20 µl

Çalışmada kullanılan PCR koşulları Tablo 15’de gösterildiği şekildedir.

Tablo 16. PCR aşamaları ile bu aşamalardaki sıcaklık miktarları ve bekleme süreleri

PCR Döngüsü	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon (1 döngü)	95°C	10 dakika
Amplifikasyon (40 döngü)	95°C	15 saniye
	60°C	60 saniye

Relatif mRNA ekspresyon düzeyleri Step One Software tarafından delta C_T metodu uyarlanarak, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ treatment}} - \Delta C_{T \text{ control}}$ formülünden fold change= $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değeri otomatik olarak elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen minimum ve maksimum RQ değerleri Origin Graph programı kullanılarak grafik haline getirilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

3.2.8.14. Floresan in-situ hibridizasyon (FISH) analizi

MCF-7 hücresi *PPM1D*/Wip1 geninde amplifikasyon seviyesini göstermek için floresan in situ hibridizasyon analizi (FISH) yapılmıştır.

3.2.8.14.1. MCF-7 hücresinin parafine gömülmesi

Kültürde bulunan MCF-7 hücre dizisinden iki adet 75’lik flask %100 konfluent hale geldiğinde Bölüm 3.2.2’deki gibi tripsinize edilerek kaldırılır ve bir falkona alınır. Falcon 250xg’de 4°C’de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve pellet 1XPBS ile yıkanır, ardından tekrar 250xg’de 4°C’de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır ve pellet

üzerine yavaş bir şekilde pellet dağıtılmadan üzerine 20ml nötral buffer formalin eklenir 16 saat 4°C’de hücrenin fikse edilmesi sağlanır. Süre sonunda süpernatant uzaklaştırılır ve pelleti kaldırmadan üzerine 20ml %70’lik etanol eklenir. Daha sonra pellet dikkatlice 1µ-Slayt 8 kuyucuklu mikroskop chamberdaki bir kuyucuğa aktarılır. Üzerine mikropipet yardımıyla üzerini geçinceye kadar %4’lük agaroz jel dökülür. Oda sıcaklığında donması için 15 dakika kadar bırakılır. Bu aşamadan sonra agaroz jel içinde donan pellet histolojik kaset içerisine alınmasını takiben 12 saat boyunca Leica marka tam otomatize cihazda histolojik aşamalardan geçer ve ardından parafine gömülür.

3.2.8.14.2. MCF-7 hücresinin hematoksil-eozinle boyanması

Bölüm 3.2.13.1’de histolojik basamakları tamamlanmış olan örnekten 3-5µm kalınlıkta mikrotom yardımıyla kesitler alınır ve polilizinli lamalara aktarılır. Kesitlerin kuruması için 60°C’de bir gece bekletilir. Daha sonra deparafinizasyon için;

- 1) 50 ml Ksilen içerisinde 2X 15 dakika,
- 2) Absolut etanol 2X 2 dakika,
- 3) %85’lik etanol 5 dakika
- 4) %70’lik ethanol 5 dakika
- 5) Distile suda 5 dakika yıkanır.

Daha sonra slaytlar sırasıyla Harris hematoksilende 5 dakika, 5 dakika distile suda ve 5 dakika eozin boyasıyla muamele edilerek boyanır. Akabinde %70, %80, %96 ve %100’lük alkol konsantrasyonlarında 2şer dakika bekletilir. Ksilolde 2 kez 5’er dakika bekletildikten sonra lam entellan ile kapatılır ve ışık mikroskobu altında görüntülenir.

3.2.8.14.3. MCF-7 hücresinin FISH analizi

Bölüm 3.2.8.13.2’de anlatılan deparafinizasyon işlemini takip ederek FISH protokolü uygulanır. Antijen açığa çıkarma basamağına geçmeden önce PBS solüsyonunda 2X 5’er dakika yıkanır. Daha sonra kaynar suya 10 mM’lık sitrik asit buffer şale içerisinde oturtulur. Tampon 80°C’ye geldiğinde deparafinize edilen slaytlar şalelere eklenir ve 30 dk içerisinde bekletilir. Ardından soğumuş olan slaytlar 2X SSC buffer içerisinde 2 kez 5’er

dakika yıkanır. Distile suda 5 dakika daha yıkandıktan sonra protein kesim basamağı için hazır hale gelir.

Protein kesimi için kullanılacak olan 50ml PBS daha önceden 37°C’de 30 dakika kadar ısıtılır. Ardından içerisinde 125 µl Proteinaz K eklenir ve şale içerisine aktarılır. Slaytlar bu şale içerisinde 37°C’de 15 dakika kadar bekletilir. Süre sonunda slaytlar oda sıcaklığında 2X SSC buffer içerisinde 5 dakika yıkanır. Devamında hibridizasyona hazırlık olarak slaytlar 10 dakika oda sıcaklığında kurutulur ve %10’luk formalin buffer içerisinde 10 dakika bekletilerek kesitler fikse edilir. Daha sonra 2X SSC bufferda 2 kez 5’er dakika yıkanır.

Hibridizasyon için öncelikle slaytların oda sıcaklığına gelmeleri beklenir. Daha önceden 73°C’ye ısıtılmış olan 2X SSC buffer 73°C’lik etüv içerisinde slaytlar 30 dakika inkübe edilir. Ardından oda sıcaklığında sırasıyla %70, %80 ve %100’lük etanol konsantrasyonlarında 1’er dakika tutulur. Daha önceden ısıtılmış olan 45°’lik etüve slaytlar koyularak etanol tamamen uçana kadar beklenir. Etanol slaytlardan uzaklaştırılmasını takiben kullanılacak olan *PPM1D* ve sentromerik problemler 73°C’de termal blok içerisinde denatüre edilir, buzda 2 dakika bekletirilir, kısaca santrifüj edilir ve 37°C’de 15 dakika inkübe edilir. İnkübasyonu takiben problemlerden 2’şer µl 8’er µl’de hibridizasyon bufferdan alınarak bir karışım oluşturulur. Bu karışımdan negatif kontrol hariç tutularak her bir slaytın üzerine 10µl damlatılır ve üzerleri 22x22 cm olan lamellerle kapatılır. Slaytlar 2X SSC buffer bulunan etüv içerisinde 37°C’de 16 saat inkübe edilirler.

Önceden 73°C’de ısıtılmış olan WS1 buffer içerisinde lamelleri çıkartılmış olan slaytlar eklenir ve 10 saniye kadar tutulduktan sonra dik bir şekilde konarak 2 dakika bekletilir. Daha sonra oda sıcaklığında WS2 buffer içerisinde 1 dakika bekletilir ve kuruması için karanlık ortama konur. Kuruyan slaytların üzerine 10µl DAPI eklenerek üzeri tekrar lamelle kapatılır ve +4°C’de 30 dakika kadar bekledikten sonra floresan mikroskopta görüntüleri alınır. Bu yöntem uygulanırken kullanılan solüsyonların hazırlanışı aşağıdaki gibidir:

1X Pretreatment Buffer: Trisodyum sitrat dihidrat 2,94 g ve üzeri 1L distile su ile tamamlandıktan sonra pH:6’ya 1N HCl ile ayarlanır. Üzerine 500 µl Tween 20 eklenir.

PBS: 8 g NaCl, 1,43 g of $N_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0,2 g of KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , distile su ile 1L’ye tamamlanır ve pH: 7,5 olacak şekilde ayarlanır.

Proteinaz K 10mg/ml: 5 ml PBS içerisine 50 mg Proteinaz K eklenir.

Digestion Solution: 50 ml PBS içerisine 0.25 ml Proteinaz K eklenir.

20X SSC Buffer: 3M sodyum klorür, 0.3 M trisodyum sitrat dihidrat, distile su ile 1L'ye tamamlanır. pH:7, 1N HCl ile ayarlanır.

2X SSC Buffer: 270 ml distile su içerisine 30ml 20X SSC buffer eklenir.

%10'luk Formalin Buffer: %37'lik formaldehit solüsyonundan 100 ml, sodyum fosfat monobazik 4gr, sodyum fosfat dibazik (anhidro) 6.5gr, distile su 900 ml eklenerek pH: 7.2 $\pm$ 0.5 olacak şekilde ayarlanır.

WS1 Post Hibridizasyon Buffer: 0.4X SSC, %0.3 NP-40

WS2 Post Hibridizasyon Buffer: 2X SSC, %0.1 NP-40

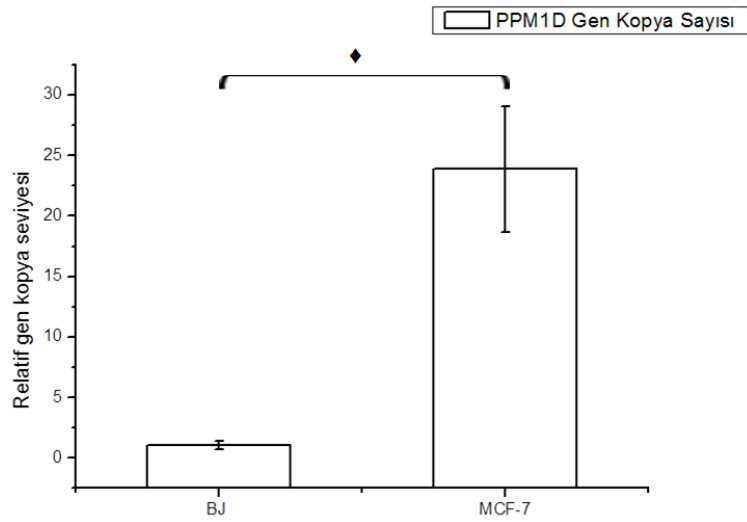
3.2.9. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi

Grafikler birbirinden bağımsız 3 tekrardan oluşan ölçüm sonuçlarının ortalamaları alınarak 'Origin 8.0' programıyla hazırlanmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde ise; gruplar arasında ki anlamlı farklılıklar 'Student-t Testi' (Pair Sample t-Test) kullanılarak belirlenmiş olup $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MCF-7 Hücrelerinde *PPM1D*/Wip1'in Gen Kopya Sayısı Analizi Düzeyi

PPM1D geninin MC7 hücre dizisinde amplifiye olduğu bilinmektedir (Richter ve ark, 2015). Bu çalışmada bunu doğrulamak amacıyla MCF-7 hücrelerinden izole edilen genomik DNA kullanılarak q-RT-PCR'la gen kopya sayısı analizi yapılmıştır. Bu analizde referans olarak normal diploid insan deri fibroblastı olan BJ hücre dizisinden elde edilen genomik DNA kullanılmıştır. Şekil 8'de görüldüğü üzere BJ hücre dizisi ile kıyaslandığında MCF-7 hücrelerinde *PPM1D* gen kopya sayısının 25 kat arttığı görülmektedir (Şekil 8) ($p=0,00752$, $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır).



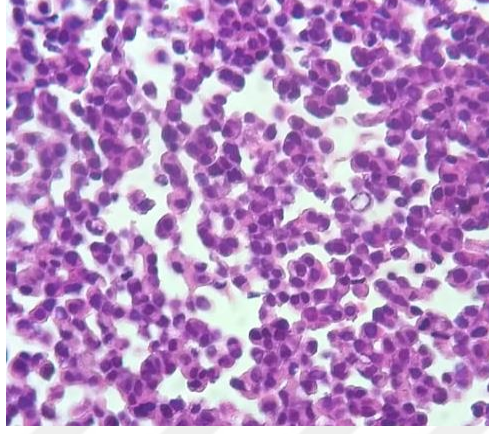
Şekil 8. MCF-7 ve BJ hücre dizisinde *PPM1D* gen kopya sayısı

(♦ : Kontrole kıyasla $p \leq 0,01$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

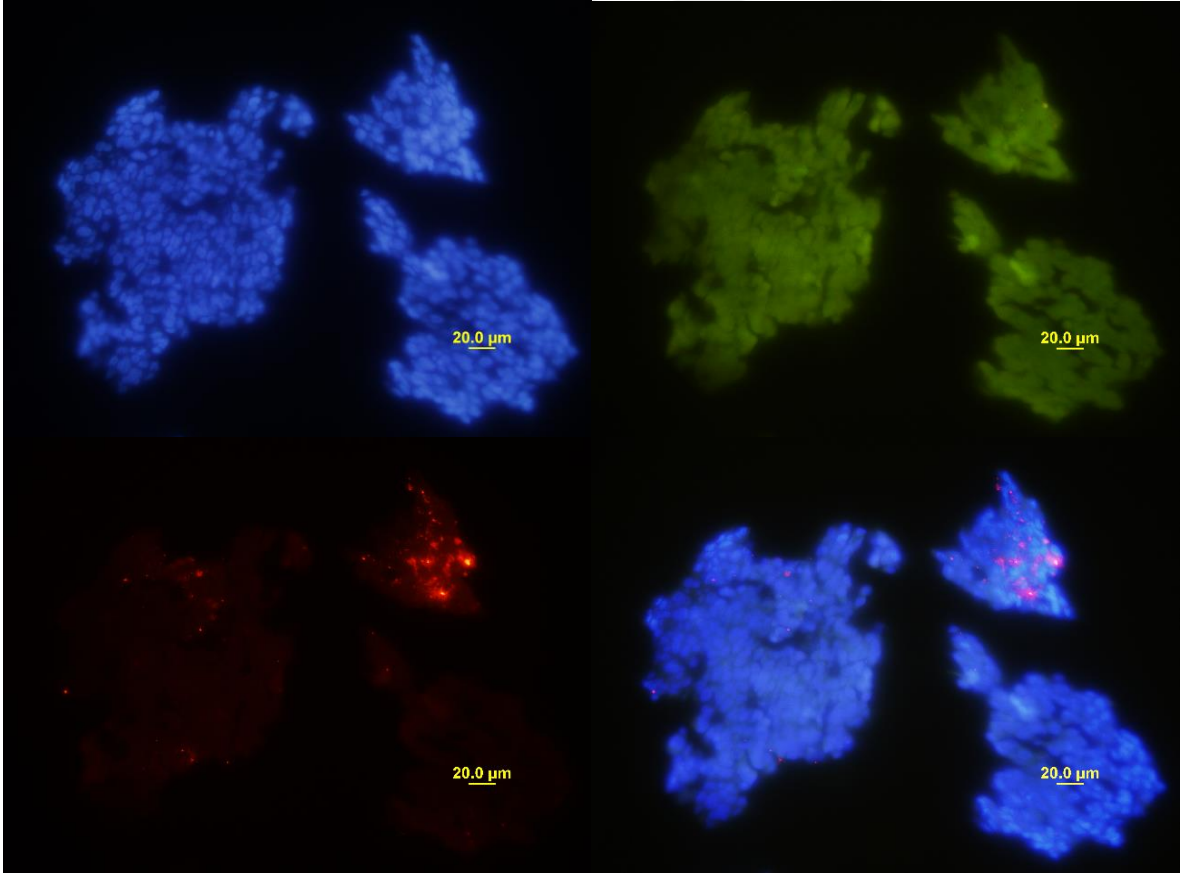
4.2. MCF-7 Hücrelerinde Wip1'in FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) Yöntemiyle Gösterilmesi

MCF-7 hücresinde *PPM1D* geninin gen kopya sayısının FISH yöntemiyle gösterilmesi amaçlanmıştır. MCF-7 hücre dizisi kesitlerinin doğruluğundan emin olmak için öncelikle Bölüm 3.2.8.14.2'de anlatıldığı gibi hematoksilen (kırmızı-pembe) ve eozin (mavi-mor) boyaması yapılmıştır (Şekil 9). Ardından Bölüm 3.2.8.14.3'deki gibi FISH analizi için hücre kesitinden alınan floresan görüntüler sırasıyla DAPI boyama (mavi), kromozom 17

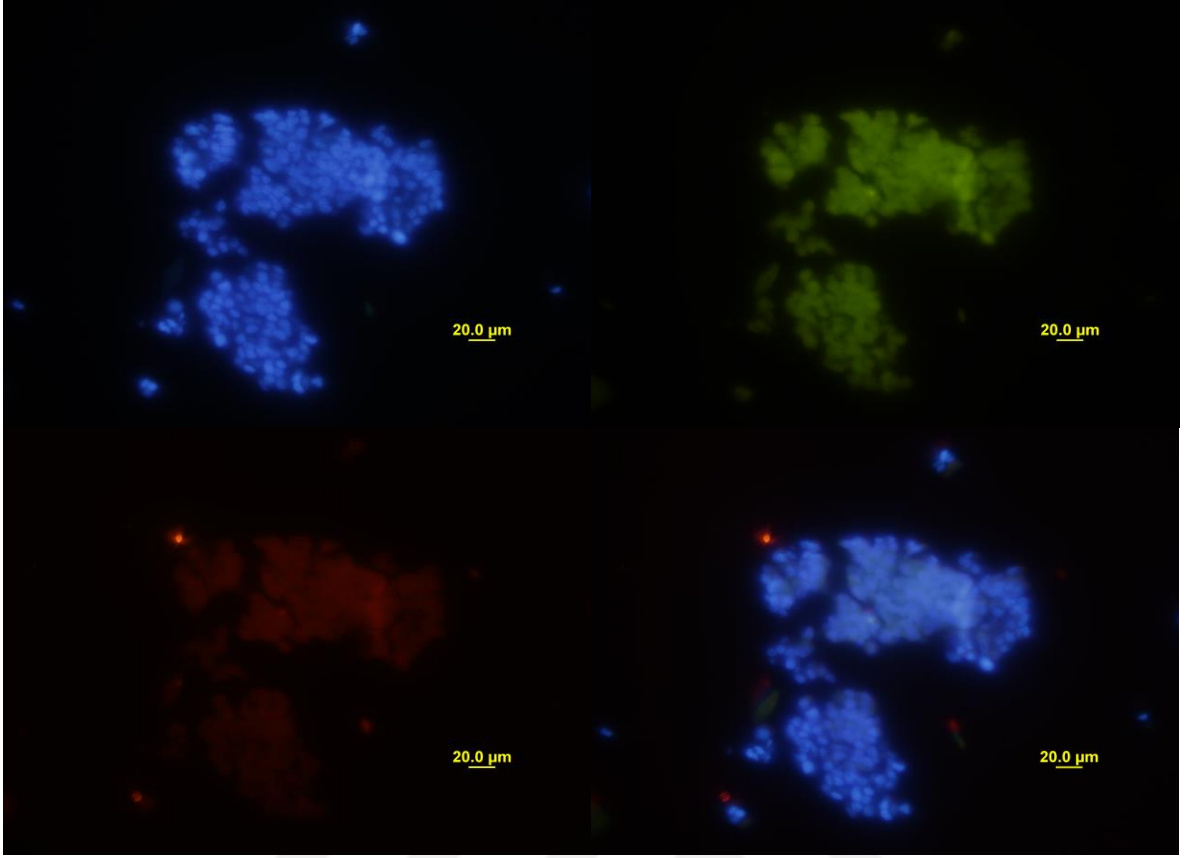
sentromerik floresan probuyla işaretleme (yeşil), *PPM1D* probuyla floresan işaretleme (kırmızı) ve bu üç görselin birleştirilmiş hali şekil 10’da gösterilmiştir. Buna ek olarak MCF-7 hücresinin kesitlerinden biri de negatif kontrol olarak arka planda spesifik olmayan boyamaları kontrol etmek amacıyla yapılmıştır ve şekil 11’de gösterilmiştir.



şekil 9. MCF-7 hücresi kesitisinin Hematoksilen & Eozin boyama görüntüsü (40X)



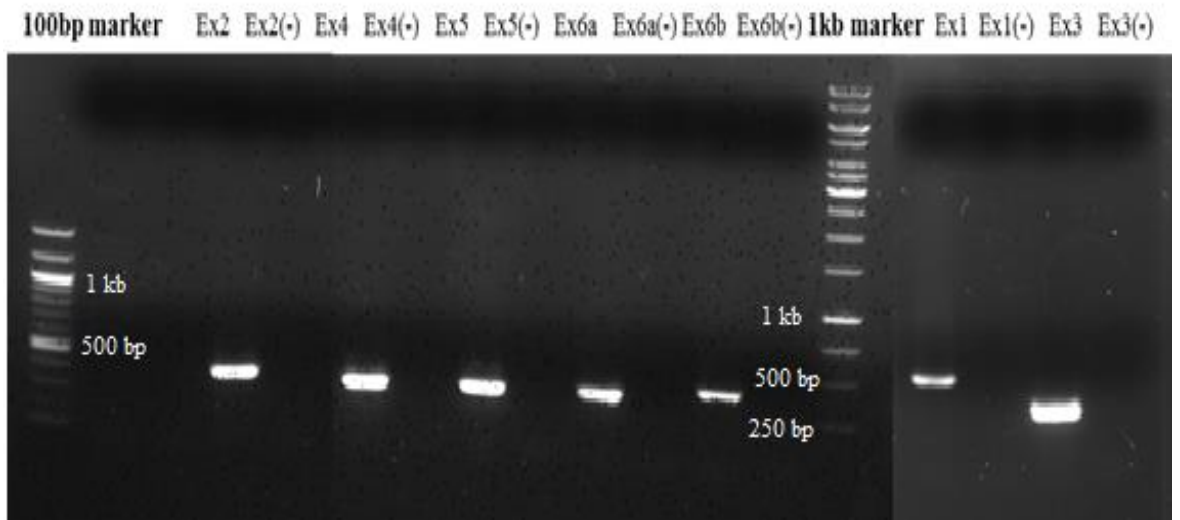
şekil 10. MCF-7 hücre dizisi FISH analiz sonucu görüntüsü



Şekil 11. MCF-7 hücre dizisinin negatif kontrolünün FISH analiz sonucu görüntüsü

4.3. MCF-7 PCR ve Sekans Sonuçları

MCF-7 hücre dizisi DNA'sı kullanılarak Bölüm 3.2.8.10'da anlatıldığı şekilde yapılan PCR örnekleri %1'lik agaroz jelde 110V'da 50 dakika yürütülmüştür.



Şekil 12. Tüm ekzonlar PCR sonucu agaroz jel görüntüsü

Şekil 12’de gösterildiği üzere Wip1’e ait bütün ekzonlar marker ile karşılaştırıldığında olması gereken yerde bant görülmekte (Ex1 550bp, Ex2 380bp, Ex3 350bp, Ex4 350bp, Ex5 350 bp, Ex6a 350 bp, Ex 6b 400bp) ve negatif (-) kontrollerinde de herhangi bir banda rastlanmamıştır. Daha sonra bu örnekler herhangi bir mutasyon taşıyıp taşımadığı belirlenebilmesi için sanger sekanslama yapılmak üzere ilgili firmaya gönderilmiştir. Sekans sonuçları literatürde bulunan dizinin elimizde bulunan primerlere göre kısaltılmak suretiyle BioEdit programında karşılaştırmalı olarak analizi aşağıda sunulmuştur.

					
	10	20	30	40	50
EXON1	GCGAGCGCCT	AGTGTGTCTC	CCGCCGCCGG	ATTCGGCGGG	CTGCGTGGGA
MCF7 Ex1F	-----	-----	-----	--ACTGCAG-	CTGCGTGGGA
EXON2	GTTGCCATTT	GTATCCTGAC	AGTGTATTAA	TGTTTATACT	TGCAAGAGTG
MCF7 Ex2F	-----	-----	-----	-----TTCA	TGCA-GAGTG
EXON3	CAGGAATTTT	GGCTTATGCA	TCTTTGTATT	TGAAACACAT	AAGACATTAT
MCF7 Ex3F	-----	-----	-----	-----CT	AAGAC-TTAT
EXON4	CTGTTGCTGT	TGTACTATTA	GCTTCCAAC	AATACTTCTT	GCTTTTTCTG
MCF7 Ex4F	-----	-----	-----	-----TAA	GCTTTTTCTG
EXON5	GATACAGATG	TAGTGGCAGC	TAAATCTGAG	TTACTTTCC	TCTCCTTGTT
MCF7 Ex5F	-----	-----	-----	-----AATTCG	TCTC-TTGTT
EXON6A	TGCCATCCTA	CTAGCTTCAT	AAGAAGCCTA	ATATCACATG	CATAGATTTG
MCF7 Ex6aF	-----	-----	-----	-----ATCATG	CATAGATTTG
EXON 6B	CCTTCCAATT	GGCCTTGTGC	CTACTAATTC	AACAAACACT	GTCATGGACC
MCF7 Ex6bF	-----	-----	-----	-----C	GTCATGGAC-
					
	60	70	80	90	100
EXON1	CCGGCGGGAT	CCCGGCCAGC	CGGCCATGGC	GGGGCTGTAC	TCGCTGGGAG
MCF7 Ex1F	C-GGCGGGAT	CCCGGCCAGC	CGGCCATGGC	GGGGCTGTAC	TCGCTGGGAG
EXON2	AAATATTTTA	TTTCTTATTA	CAGCGGAATG	GCCAAAGACT	ATGACGGGTC
MCF7 Ex2F	AA-TATTTTA	TTTCTTATTA	CAGCGGAATG	GCCAAAGACT	ATGACGGGTC
EXON3	TTTGTAATAA	TGTAGTCTTA	TTTTATTAGT	GATTTAATAT	ACTGAGCTAT
MCF7 Ex3F	TTTGTAATAA	TGTAGTCTTA	TTTTATTAGT	GATTTAATAT	ACTGAGCTAT
EXON4	CTCCCTTCCC	CCAGGTGATT	TGTGGAGCTA	TGATTTCTTC	AGTGGTGAAT
MCF7 Ex4F	CTCC-TTCCC	CCAGGTGATT	TGTGGAGCTA	TGATTTCTTC	AGTGGTGAAT
EXON5	CTTTTGAATA	CAGGGTGAGC	ATGGACAATC	TTGTGCCAAA	ATGCTTGTGA
MCF7 Ex5F	CTTTTGA-TA	CAGGGTGAGC	ATGGACAATC	TTGTGCCAAA	ATGCTTGTGA
EXON6A	TTGAGTTCTG	GGATAAATTT	TTTCTTATTT	GTTTTACCTT	CTTATTTTTT

MCF7 Ex6aF	TTGAGTTCTG	GGATAAATTT	TTTCTTATTT	GTTTTACCTT	CTTATTTTTTC
EXON 6B	AAAAAAATTT	GAAGATGTCA	ACTCCTGGCC	AAATGAAAGC	CCAAGAAATT
MCF7 Ex6bF	---AAAATTT	GAAGATGTCA	ACTCCTGGCC	AAATGAAAGC	CCAAGAAATT
					
	110	120	130	140	150
EXON1	TGAGCGTCTT	CTCCGACCAG	GGCGGGAGGA	AGTACATGGA	GGACGTTACT
MCF7 Ex1F	TGAGCGTCTT	CTCCGACCAG	GGCGGGAGGA	AGTACATGGA	GGACGTTACT
EXON2	TTCTTAGCAC	ATCAGGGACA	ACTGCCAGTG	TGGTCATCAT	TCGGGGCATG
MCF7 Ex2F	TTCTTAGCAC	ATCAGGGACA	ACTGCCAGTG	TGGTCATCAT	TCGGGGCATG
EXON3	CTTAGTTGTT	GTATTTTAAT	CATTTAGATT	ATTTATGTGA	ACTCTTTATT
MCF7 Ex3F	CTTAGTTGTT	GTATTTTAAT	CATTTAGATT	ATTTATGTGA	ACTCTTTATT
EXON4	TTGTGGTGTC	ACCTGAACCA	GACACAAGTG	TCCACACTCT	TGACCCTCAG
MCF7 Ex4F	TTGTGGTGTC	ACCTGAACCA	GACACAAGTG	TCCACACTCT	TGACCCTCAG
EXON5	ATCGAGCATT	GGGCCGCTGG	AGGCAGCGTA	TGCTCCGAGC	AGATAAACT
MCF7 Ex5F	ATCGAGCATT	GGGCCGCTGG	AGGCAGCGTA	TGCTCCGAGC	AGATAAACT
EXON6A	AGTCACTGGA	GGAGGATCCA	TGGCCAAGGG	TGAATTCTAA	GGACCATATA
MCF7 Ex6aF	AGTCACTGGA	GGAGGATCCA	TGGCCAAGGG	TGAATTCTAA	GGACCATATA
EXON 6B	GAAAGAACCC	CTCCAACAAA	CTTTAAAAGG	ACATTAGAAG	AGTCCAATTC
MCF7 Ex6bF	GAAAGAACCC	CTCCAACAAA	CTTTAAAAGG	ACATTAGAAG	AGTCCAATTC
					
	160	170	180	190	200
EXON1	CAAATCGTTG	TGGAGCCCGA	ACCGACGGCT	GAAGAAAAGC	CCTCGCCGCG
MCF7 Ex1F	CAAATCGTTG	TGGAGCCCGA	ACCGACGGCT	GAAGAAAAGC	CCTCGCCGCG
EXON2	AAGATGTATG	TAGCTCACGT	AGGTGACTCA	GGGGTGGTTC	TTGGAATTCA
MCF7 Ex2F	AAGATGTATG	TAGCTCACGT	AGGTGACTCA	GGGGTGGTTC	TTGGAATTCA
EXON3	TTTAGTGTA	TGAACAAGTC	TGGGGTGAAT	CGTGTAGTTT	GGAAACGACC
MCF7 Ex3F	TTTAGTGTA	TGAACAAGTC	TGGGGTGAAT	CGTGTAGTTT	GGAAACGACC
EXON4	AAGCACAAGT	ATATTATATT	GGGGAGTGAT	GGACTTTGGA	ATATGATTCC
MCF7 Ex4F	AAGCACAAGT	ATATTATATT	GGGGAGTGAT	GGACTTTGGA	ATATGATTCC
EXON5	AGTGCCATAG	TAATCTGCAT	CTCTCCAGAA	GTGGACAATC	AGGGAACTT
MCF7 Ex5F	AGTGCCATAG	TAATCTGCAT	CTCTCCAGAA	GTGGACAATC	AGGGAACTT
EXON6A	CCTGCCCTGG	TTCGTAGCAA	TGCCTTCTCA	GAGAATTTTT	TAGAGGTTTC
MCF7 Ex6aF	CCTGCCCTGG	TTCGTAGCAA	TGCCTTCTCA	GAGAATTTTT	TAGAGGTTTC
EXON 6B	TGGCCCCCTG	ATGAAGAAGC	ATAGACGAAA	TGGCTTAAGT	CGAAGTAGTG
MCF7 Ex6bF	TGGCCCCCTG	ATGAAGAAGC	ATAGACGAAA	TGGCTTAAGT	CGAAGTAGTG
					
	210	220	230	240	250
EXON1	GCGGTCGCTG	TCTCAGCCGT	TGCCTCCGCG	GCCGTCGCCG	GCC-GCCCTT

MCF7 Ex1F	GCGGTCGCTG	TCTCAGCCGT	TGCCTCCGCG	GCCGTCGCCG	GCCCGCCCTT
EXON2	GGATGACCCG	AAGGATGACT	TTGTCAGAGC	TGTGGAGGTG	ACACAGGACC
MCF7 Ex2F	GGATGACCCG	AAGGATGACT	TTGTCAGAGC	TGTGGAGGTG	ACACAGGACC
EXON3	TCGACTCACT	CACAATGGAC	CTGTTAGAAG	GAGCACAGTT	ATTGACCAGA
MCF7 Ex3F	TCGACTCACT	CACAATGGAC	CTGTTAGAAG	GAGCACAGTT	ATTGACCAGA
EXON4	ACCACAAGAT	GCCATCTCAA	TGTGCCAGGA	CCAAGAGGAG	AAAAAATACC
MCF7 Ex4F	ACCACAAGAT	GCCATCTCAA	TGTGCCAGGA	CCAAGAGGAG	AAAAAATACC
EXON5	TACCAATGAA	GATGAGTTAT	ACCTGAACCT	GACTGACAGC	CCTTCCTATA
MCF7 Ex5F	TACCAATGAA	GATGAGTTAT	ACCTGAACCT	GACTGACAGC	CCTTCCTATA
EXON6A	AGCTGAGATA	GCTCGAGAGA	ATGTCCAAGG	TGTAGTCATA	CCCTCAAAAG
MCF7 Ex6aF	AGCTGAGATA	GCTCGAGAGA	ATGTCCAAGG	TGTAGTCATA	CCCTCAAAAG
EXON 6B	GTGCTCAGCC	TGCAAGTCTC	CCCACAACCT	CACAGCGAAA	GAACTCTGTT
MCF7 Ex6bF	GTGCTCAGCC	TGCAAGTCTC	CCCACAACCT	CACAGCGAAA	GAACTCTGTT

					
	260	270	280	290	300
EXON1	CCCGGCGGCG	AAGTCTCGGG	GAAAGGCCCA	GCGGTGGCAG	CCCGAGAGGC
MCF7 Ex1F	CCCGGCGGCG	AAGTCTCGGG	GAAAGGCCCA	GCGGTGGCAG	CCCGAGAGGC
EXON2	ATAAGCCAGA	ACTTCCCAAG	GAAAGAGAAC	GAATCGAAGG	ACTTGGTGGG
MCF7 Ex2F	ATAAGCCAGA	ACTTCCCAAG	GAAAGAGAAC	GAATCGAAGG	ACTTGGTGGG
EXON3	TTCTTTTCT	GGCAGTAGCA	AGAGCACTTG	GTAAGTAGGA	CTTAATTTGG
MCF7 Ex3F	TTCTTTTCT	GGCAGTAGCA	AGAGCACTTG	GTAAGTAGGA	CTTAATTTGG
EXON4	TGATGGTGAG	ATGTGATTGA	ATAACTTGAT	ATTGTTGTCT	AAACATTGTT
MCF7 Ex4F	TGATGGTGAG	ATGTGATTGA	ATAACTTGAT	ATTGTTGTCT	AAACATTGTT
EXON5	ATAGTCAAGA	AACCTGTGTG	ATGACTCCTT	CCCCATGTTT	TACACCACCA
MCF7 Ex5F	ATAGTCAAGA	AACCTGTGTG	ATGACTCCTT	CCCCATGTTT	TACACCACCA
EXON6A	ATCCAGAACC	ACTTGAAGAA	AATTGCGCTA	AAGCCCTGAC	TTTAAGGATA
MCF7 Ex6aF	ATCCAGAACC	ACTTGAAGAA	AATTGCGCTA	AAGCCCTGAC	TTTAAGGATA
EXON 6B	AAACTCACCA	TGCGACGCAG	ACTTAGGGGC	CAGAAGAAAA	TTGGAAATCC
MCF7 Ex6bF	AAACTCACCA	TGCGACGCAA	ACTTAGGGGC	CAGAAGAAAA	TTGGAAATCC

					
	310	320	330	340	350
EXON1	TCGCGACCCCT	CTCCCGGACG	CCGGGGCCTC	GCCGGCACCT	AGCCGCTGCT
MCF7 Ex1F	TCGCGACCCCT	CTCCCGGACG	CCGGGGCCTC	GCCGGCACCT	AGCCGCTGCT
EXON2	AGGTAACATT	CTGTCGTTTT	CTCTTTCCTC	TTTTGGTTCT	ATTTAGTCCT
MCF7 Ex2F	AGGTAACATT	CTGTCGTTTT	CTCTTTCCTC	TTTTGGTTCT	ATTTAGTCCT
EXON3	TGAAATTATA	TTGAATTTTC	TACAATATAT	GGTGGCAAAA	TAAAAGAGGA
MCF7 Ex3F	TGAAATTATA	TTGAATTTTC	TACAATATAT	GGTGGCAAAA	TAAAAGAGGA
EXON4	TTGGTACTTC	TGTCAGAATC	TTGAATATGA	ACTAAGGACA	TTGACCTTGG
MCF7 Ex4F	TTGGTACTTC	TGTCAGAATC	TTGAATATGA	ACTAAGGACA	TTGACCTTGG

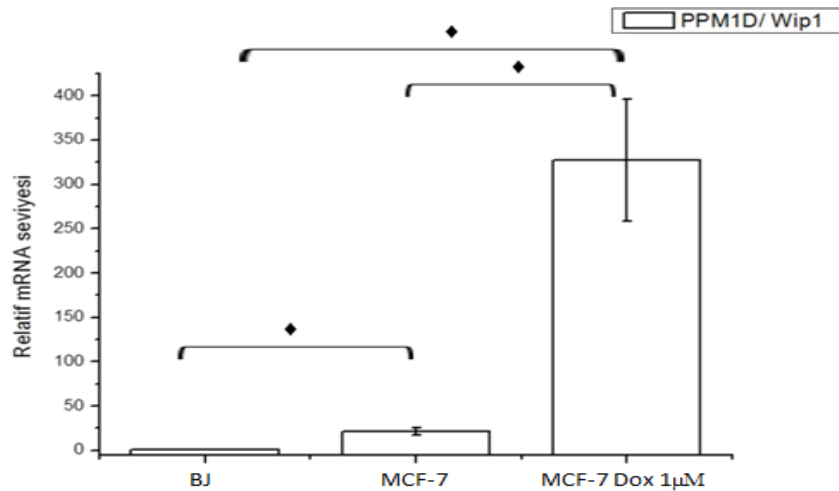
EXON5	GTCAAGGTAT ATAGTTCCAT AGTTTTTAAG TTATGTTTTA ATAGACACCA
MCF7 Ex5F	GTCAAGGTAT ATAGTTCCAT AGTTTTTAAG TTATGTTTTA ATAGACACCA
EXON6A	CATGATTCTT TGAATAATAG CCTTCCAATT GGCCTTGTGC CTACTAATTC
MCF7 Ex6aF	CATGATTCTT TGAATAATAG CCTTCCAATT GGCCTTGTGC CTACTAATTC
EXON 6B	TTTACTTCAT CAACACAGGA AAACGTGTTG TGTTTGCTGA AATGCATCTG
MCF7 Ex6bF	TTTACTTCAT CAACACAGGA AAACGTGTTG TGTTTGCTGA AATGCATCTG
	
	360 370 380 390 400
EXON1	GCCGCCGCCG TTCCTCCGTG GCCTTTTTTCG CCGTGTGCGA CGGGCACGGC
MCF7 Ex1F	GCCGCCGCCG TTCCTCCGTG GCCTTTTTTCG CCGTGTGCGA CGGGCACGGC
EXON2	TTTATGCTTT ACTAATGAAA TTGACCTACT ACTGTCCTT TTAAGTGAAG-
MCF7 Ex2F	TTTATGCTTT ACTAATGAAA TTGACCTACT ACTGTCCTT TATCCGGGAA
EXON3	GACAGAACTA AACCC--TTA CT-.....
MCF7 Ex3F	GACAGAACAA ACCCCCTTTA CTA.....
EXON4	GTAGATTTTT -GCA----.....
MCF7 Ex4F	GAAATTTTTT TGCAAAAA.....
EXON5	GTTCTTT--- GGTTAGCG-.....
MCF7 Ex5F	GTTTTTGTGG AGTTAGCGA.....
EXON6A	AACAAACACT GTCATGGA-C CAA--.....
MCF7 Ex6aF	AACAAACACT GCAGGGAAAC CAAAA.....
EXON 6B	GGAAATGAGG TTTTTCCTCAA CTTAGGATAT AAGAGGGCTT TTTAAATTTG
MCF7 Ex6bF	GGAAATGAGG TTTTTCCTCAA CTTAGGATAT AAGAGGGCTT TTTAAATTTG
	
	410 420 430 440 450
EXON1	GGGCGGGAGG CGGCACAGTT TGCCCGGGAG CACTTGTGGG GTTTCATCAA
MCF7 Ex1F	GGGCGGGAGG CGGCACAGTT TGCCCGGGAG CACTTGTGGG GTTTCATCAA
EXON2	-----.....
MCF7 Ex2F	GAAGA.....
EXON3	
MCF7 Ex3F	
EXON4	
MCF7 Ex4F	
EXON5	
MCF7 Ex5F	
EXON6A	
MCF7 Ex6aF	
EXON 6B	GTGCCGATGT TGAACTTTTT TT-----.....
MCF7 Ex6bF	GTGCCG-TGA AAAAATTTTT TTAAAAAGT.....

	
	460 470 480 490 500
EXON1	GAAGCAGAAG GGTTCACCT CGTCCGAGCC GGCTAAGGTT TGCCTGCCA
MCF7 Ex1F	GAAGCAGAAG GGTTCACCT CGTCCGAGCC GGCTAAGGTT TGCCTGCCA
	
	510 520 530 540 550
EXON1	TCCGCAAAGG CTTTCTCGCT TGTCACCTTG CCATGTGGAA GAACTGGGT
MCF7 Ex1F	TCCGCAAAGG CTTTCTCGCT TGTCACCTTG CCATGTGGAA GAACTGGGT
	
	560 570 580
EXON1	AAGTTCCCTG GCTTGTTTG- ---GCGC--
MCF7 Ex1F	AAGTTCCCTG TTGTGTTTGT GAGGCGCAA

Analiz sonucunda herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir.

4.4. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında MCF-7 Hücrelerinde Wip1 mRNA Düzeyi

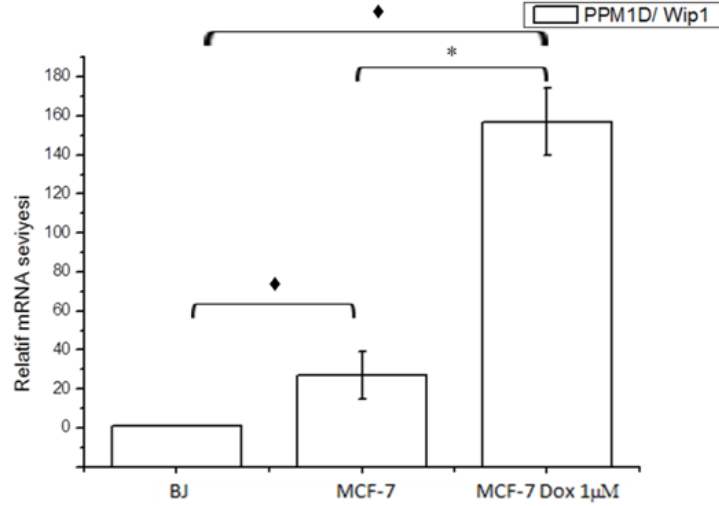
Normoksik ve hipoksik koşullarda MCF-7 hücresinde Wip1 mRNA düzeyini belirlemek amacıyla kantitatif Real-time PCR analizi yapılmıştır. Bu analiz sırasında eksojen negatif kontrol ve referans olarak Wip1 ifadesinin bazal seviyede olduğu bilinen insan normal dermal fibroblast hücre dizisi (BJ) kullanılmıştır. Endojen kontrol olarak ise her iki hücre hattında da β -aktin mRNA düzeyi ölçülmüştür. Analiz sonucunda elde edilen veriler Şekil 13, 14 ve 15’de sunulmaktadır.



Şekil 13. Normoksik şartlar altında MCF-7 hücre dizisinde Wip1 mRNA düzeyi

(♦ : Kontrole kıyasla $p \leq 0,01$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Şekil 13’de görüldüğü üzere normoksik koşullar altında MCF-7 hücre dizisinde relatif Wip1 mRNA seviyesinin, sağlıklı hücre dizisi BJ’e kıyasla 25 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,00551$ $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı). MCF-7 hücre dizisi bir DNA hasarı ajanı olan doksorubisin (Doxo) ($1\mu\text{M}$) ile 24 saat muamele edildiğinde ise relatif Wip1 mRNA düzeyinin muamele edilmeyen hücrelere kıyasla 10 kat daha arttığı tespit edilmiştir (Şekil 6, $p=0,00742$, $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır).



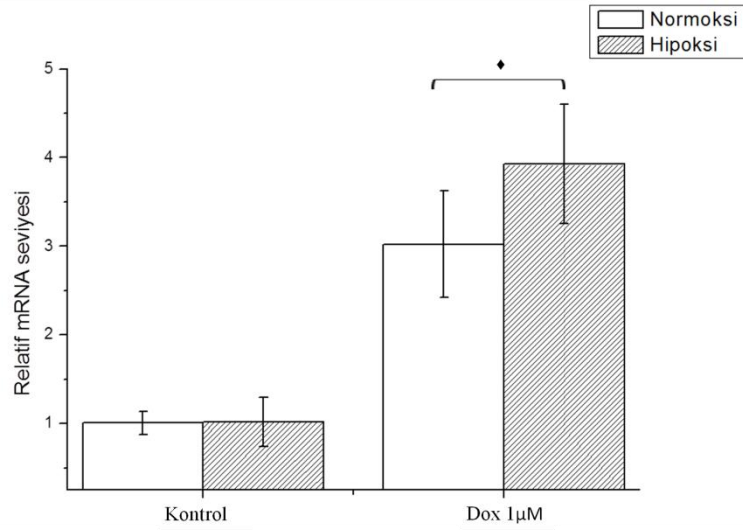
Şekil 14. Hipoksik şartlar altında MCF-7 ve BJ hücre dizisinde Wip1 mRNA düzeyi

(♦ : Kontrole kıyasla $p \leq 0,01$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(* : Kontrole kıyasla $p \leq 0,001$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Hipoksi koşullarında ise Şekil 14’de görüldüğü üzere MCF-7 hücre dizisinde Wip1’in relatif mRNA seviyesinin, BJ hücre dizisi ile kıyaslandığında normoksi koşullarına benzer şekilde kaldığı ve aralarındaki yaklaşık 20 kat farkın korunduğu görülmektedir ($p=0,03477$, $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır). Hipoksiste MCF-7 hücre dizisinin 24 saat $1\mu\text{M}$ Doxo ile muamelesi sonucunda ise Wip1 relatif mRNA düzeyinin muamele edilmeyen hücrelere kıyasla normoksiye benzer şekilde yaklaşık 10 kat daha arttığı tespit edilmiştir ($p=0,000237$, $p \leq 0,001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır).

4.5. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında MCF-7 Hücrelerinde HIF1- α mRNA düzeyi



Şekil 15. Normoksi ve hipokside MCF-7 hücre dizisinde HIF1- α 'nın mRNA düzeyi

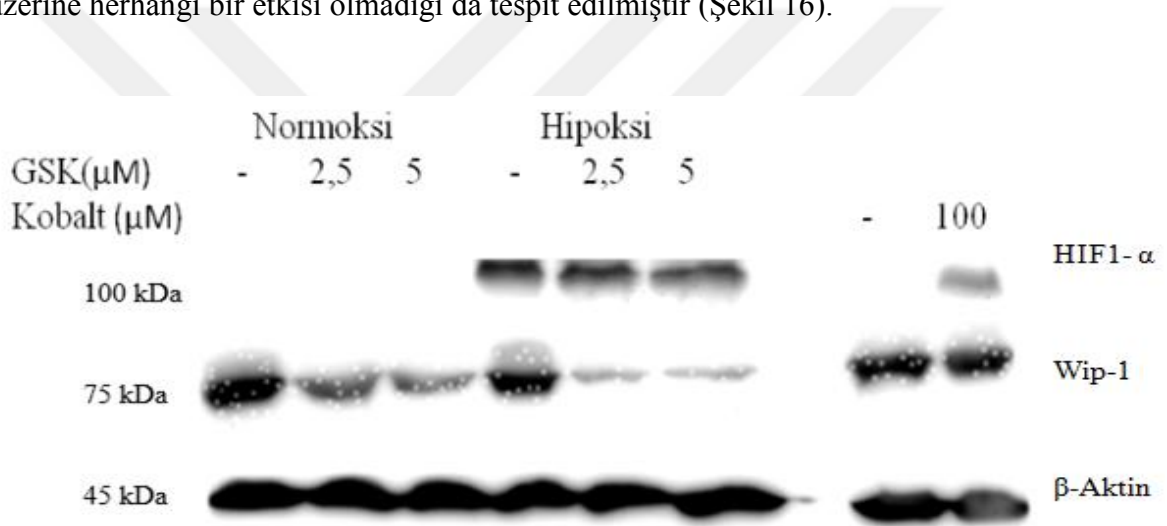
(♦ : Kontrole kıyasla $p \leq 0,01$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Şekil 15'te görüldüğü üzere hem normoksik hemde hipoksik koşullar altında MCF-7 hücre dizisindeki HIF1- α 'nın relatif mRNA seviyeleri birbirleriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak hipoksik ve normoksik şartlarda MCF-7 hücre dizisi 24 saat 1 μ M Doxo ile muamelesi sonucunda HIF1- α 'nın relatif mRNA düzeyinin arttığı görülmektedir. Normoksi ve hipokside mRNA seviyeleri birbirleriyle kıyaslandığında ise aralarındaki farkın ($p=0,0011$) $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir.

4.6. MCF-7 Hücrelerinde Normoksi ve Hipokside Wip1'in GSK2830371 Tarafından İnhibisyonu

Spesifik bir Wip1 antagonisti olan küçük molekül GSK2830371 (GSK) allosterik bir inhibitör olarak etkisini ve spesifikliğini proteinin flap alt bölgesine bağlanarak fosfataz aktivitesini inhibe ederek göstermektedir (Gilmartin ve ark, 2014; Richter ve ark, 2015). *PPM1D* gen amplifikasyonuna ve dolayısıyla Wip1 proteininin aşırı ekspresyonuna sahip olan MCF-7 hücrelerinde; GSK2830371 (GSK), onkogenik Wip1'in etkilerini baskılamak amacıyla kullanılmıştır. Bu nedenle öncelikle MCF-7 hücreleri 24 saat boyunca hem normoksi hem de hipokside farklı konsantrasyonlarda GSK ile (2,5 μ M/ml ve 5 μ M/ml) muamele edildikten sonra aynı hücrelerden yapılan protein izolasyonu yapılarak hem Wip1'in baskılanıp baskılanmadığını göstermek amacıyla Western Blot (WB) analizi

yapılmıştır. MCF-7 hücrelerinden hipoksi koşullarının protein izolasyonu yapılarak aynı zamanda hipoksi ortamının doğrulanması için oksijensiz ortamda stabilize olan majör transkripsiyon faktörü HIF-1 α için de WB analizi yapılmıştır. Hipoksi için pozitif kontrol olarak hipoksinin kimyasal indükleyicisi olarak bilinen CoCl₂ kullanılmıştır. 4 saat boyunca 100 μ M CoCl₂'le muame edilen MCF-7 hücrelerinden protein izolasyonu sonrasında HIF-1 α WB analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 14'de görüldüğü üzere hem normoksi hem de hipoksida MCF-7 hücrelerinde Wip1 protein düzeyinin değişmediği görülmektedir. Bunun yanısıra MCF-7 hücrelerinin GSK'nın artan konsantrasyonlarda muamelesi sonucunda Wip1 protein düzeyinde giderek bir azalma olduğu bulunmuştur. Hipoksi koşullarında ve CoCl₂ muamelesi sonucunda HIF-1 α 'nın protein olarak stabilizasyonu görülürken normoksida tespit edilmemiştir. Ayrıca GSK muamelesinin HIF-1 α 'nın stabilizasyonu üzerine herhangi bir etkisi olmadığı da tespit edilmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. MCF-7 hücresinin 24 saat GSK2830371 tarafından Wip1 inhibisyonu ve 4 saat kobalt inkübasyonu sonucu protein düzeyi

4.7. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında GSK2830371 ve Doksorubisin Uygulamasının MCF-7 Hücreleri Üzerinde Etkileri

Onkogenik Wip1 fosfataza sahip olan MCF-7 hücrelerinde Wip1 fosfatazın baskılanması sonucunda hem normoksi hem de hipoksi koşullarında DNA hasarı cevabı ve buna bağlı olarak indüklenen hücre döngüsünün durudurulması, apoptozis ve senesens gibi hücrel stres cevaplarının analizi için DNA hasarı cevabının aktivasyonunu sağlayacak bir anti-kanser ajanı olan Doksorubisin (Doxo) kullanılmıştır. Doxo bir topoizomeraz II

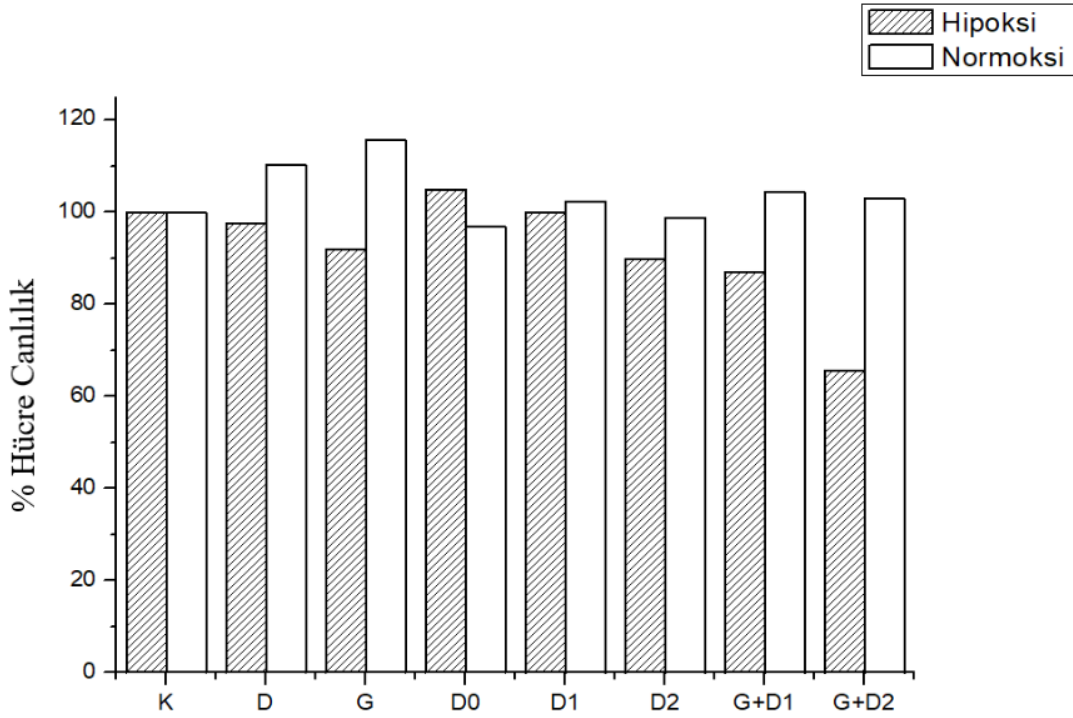
inhibitörü olarak, DNA'ya interkale olmakta ve DNA hasarı cevabının aktivasyonunu sağlayabilmektedir (Pommier ve ark, 2010).

MCF-7 hücrelerinde DNA hasarı cevabı aktivasyonuna bağlı olarak apoptozis ve senesensin indüklenebilmesi için farklı sürelerde ve farklı konsantrasyonlarda doxo uygulaması gerçekleştirilmiştir. Apoptozis indüksiyonu için MCF-7 hücrelerine 1 μ M ve 1,75 μ M Doxo, 24 saat süreyle GSK varlığında ve yokluğunda hem normoksi hem de hipoksi koşullarında uygulanarak hücrelerde apoptozis analizi yapılmıştır. Senesens indüksiyonu içinse 0,5 μ M Doxo 72 saat süreyle GSK varlığında ve yokluğunda hem normoksi hem de hipoksi koşullarında uygulanmıştır. Hem apoptozis hem de senesens indüksiyonu için kullanılan Doxo konsantrasyonlarında aynı zamanda hücre döngüsü analizi de yapılmıştır. Apoptozis indüksiyonu için Doxo uygulaması sonrası hücrelere hücre canlılığı analizi için Wst-1 testi uygulanmıştır.

4.7.1. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 24 Saat GSK2830371 ve Doxorubicin Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

MCF-7 hücrelerinin hem normoksi hem de hipoksi koşullarında Wip1'i inhibe etmek amacıyla kullanılan GSK varlığında ve yokluğunda Doxo ile 24 saat muamelesi sonucunda hücre canlılığı WST-1 analizi ile test edilmiştir. WST-1 testi canlı hücrelerde formazan oluşturmak üzere mitokondriyal dehidrojenazlarla tetrazolium tuzunun (MTS) parçalanması esasına dayanan kolorimetrik bir testtir. Canlı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı arttıkça, formazan ürününün miktarı da artar, azaldıkça da formazon ürünü azalmaktadır. Hücrelerdeki formazan seviyesinin tespiti ile hücre sayısı, hücre çoğalması, ölçülebilir. Bu çalışmada da bu nedenle Doxo'ya cevaben WST-1 analizi kullanılmıştır. Ancak bu analiz sonucunda MCF-7 hücrelerinin kültürü için kullanılan, DMEM besiyerinin içerisinde yer alan fenol-red'in absorbans okumasında formazona karşı yüksek interferans oluşturduğu tespit edilmiştir. Fenol red sarıdan (= 443 nm) kırmızıya (= 570 nm) kademeli bir geçiş göstermekte ve kolorimetrik testlerde girişime yol açabilmektedir. Doksorubisin ise intrinsik floresans göstermekte ve 470 nm lazerle uyarılmasının ardından 595 nm'de bir emisyon sinyali oluşturmaktadır. Formazan kristallerinin oluşumu ise 450 nm - 600 nm aralığındaki dalga boylarında absorbans okumaları ile ölçülebilmektedir (Luis ve ark, 2019). MCF-7 hücrelerinin Doxo 0,5 μ M, 1 μ M ve 1,75 μ M konsantrasyonlarıyla 24 saat muamelesi sonrasında özellikle Doxo 1 μ M ve 1,75 μ M konsantrasyonlarında mikroskopik olarak hücre

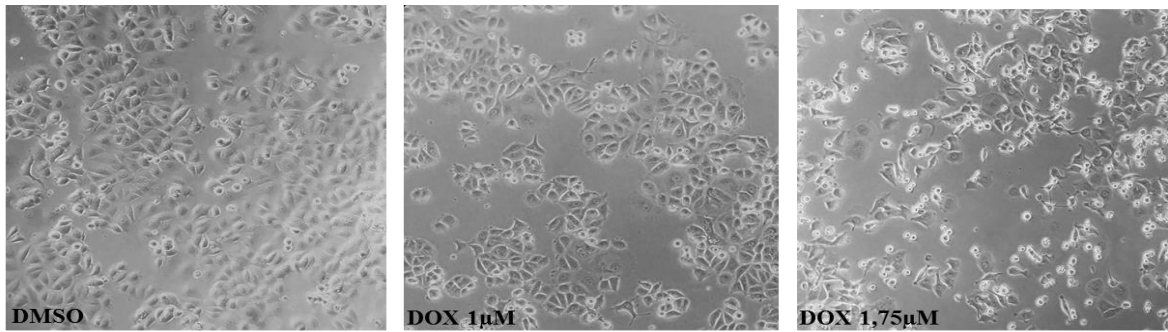
ölümü gözlenirken WST -1 sonucunda bu konsantrasyonlarda hücre canlılığı artmışcasına yüksek absorbands değerleri elde edilmiştir (Şekil 17, 18).



Şekil 17. Normoksida ve hipoksida 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri

Şekil 17’de gösterilen WST-1 testinde elde edilen sonuçlar arasında yapılan istatistiksel analiz sonucunda kontrole kıyasla örnekler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

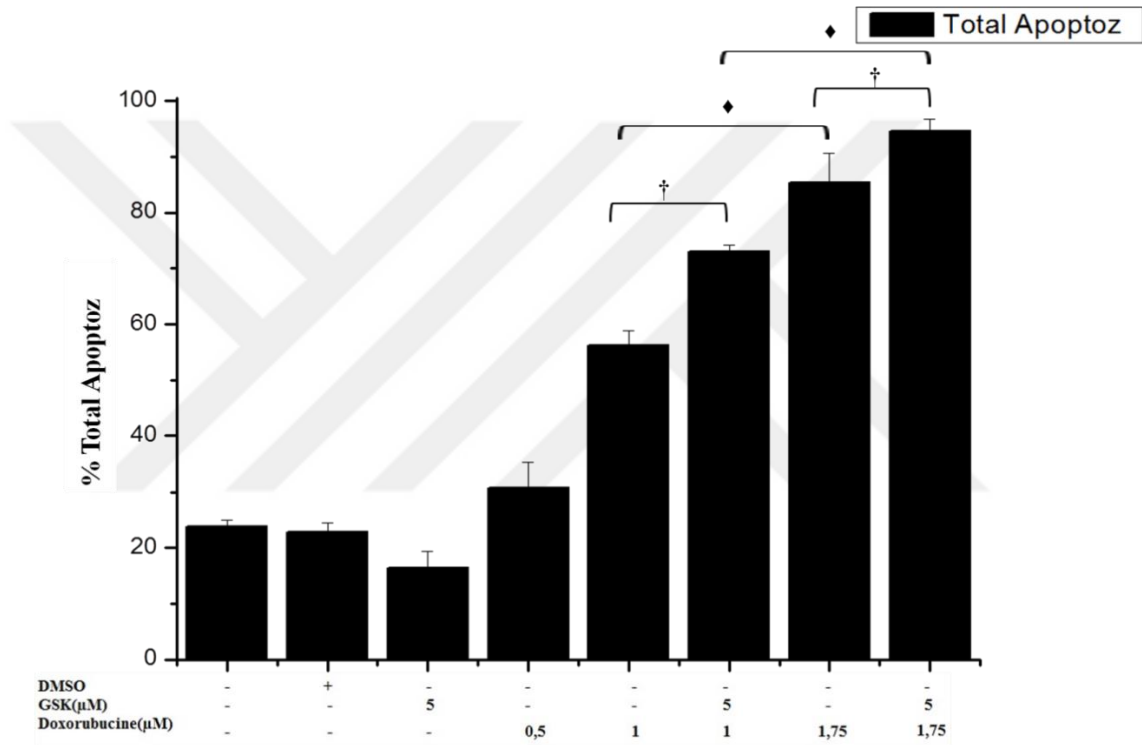
Esasen formazan absorpsiyon spektrumlarının, DMEM/fenol kırmızısı ve Doksorubisin absorpsiyon spektrumları ile örtüşmesi nedeniyle WST-1 testi sonuçlarında yanlış pozitif etkiye yol açtığı tespit edilmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Farklı konsantrasyonlarda 24 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin ışık mikroskopunda görünümü (10X)

4.7.2. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 24 Saat GSK2830371 ve Doxorubicin Uygulamasının Apoptotik etkileri

Normoksi ve hipoksi koşullarında MCF7 hücreleri 24 saat boyunca ayrı ayrı ve birlikte GSK ve Doxo ile muamele edildikten sonra apoptozis analizi için Annexin V/7 AAD analizi gerçekleştirilmiştir. Bu test sonucunda hem erken apoptotik hem nekrotik hem de geç apoptozis miktarları ölçülebilmektedir. Erken ve geç apoptozis yüzde oranları hücresel total apoptoz miktarları olarak hesaplanmıştır. Üç bağımsız tekrardan oluşan veriler daha sonra Origin Graph veri analiz ve grafik programı kullanılarak grafiğe aktarılmış ve Student's t testi ile istatistiksel olarak analizi yapılmıştır (Şekil 19-21).



Şekil 19. Normoksida 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptoz miktarı

(♦ : Kontrole kıyasla $p \leq 0,01$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(† : Kontrole kıyasla $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

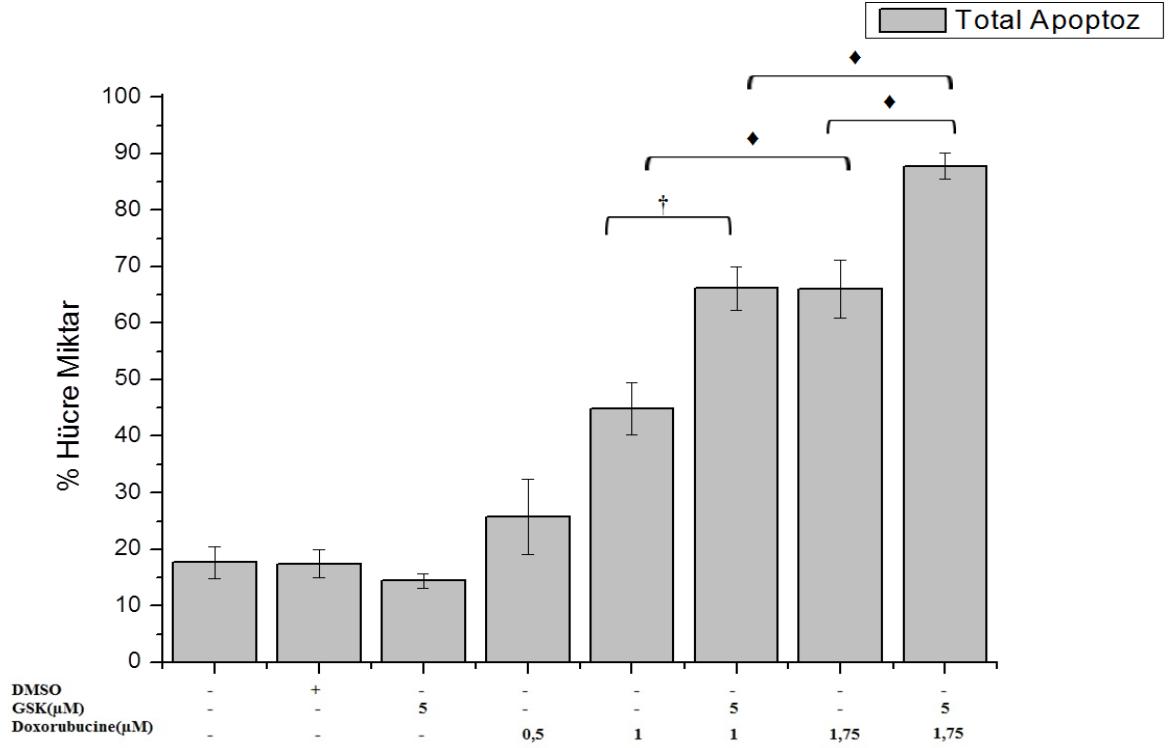
Normoksida 24 saat inkübasyonu takiben kontrolde %23 (±1), DMSO'da %22 (±1), GSK2830371'de (GSK) %16 (±2), oranında apoptozis tespit edilmiştir. Doksorubisin'in tek başına uygulandığı konsantrasyonlarda ise hücrelerde sırasıyla D0'da (0,5µM) %30 (±4), D1'da (1 µM) %56 (±2), ve D2'de (1,75 µM) ise %85 (±2), oranında total apoptozis tespit edilmiştir. Doxo ve GSK (5 µM) birlikte uygulandığında ise sırasıyla G+D1' de %72 (±1)

ve G+-D2’de ise % 94 (± 2) oranında total apoptoz tespit edilmiştir. Kontrol, DMSO ve GSK grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. DMSO ile ilaç verilen gruplar karşılaştırılarak istatistiksel analizleri yapıldığında ise aralarındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Buna göre normoksi koşullarında GSK ve Doxo’nun birlikte uygulamasının apoptozis oranını tek başına Doxo uygulamasına kıyasla yaklaşık % 20 oranında artırdığı tespit edilmiştir. Bütün normoksik gruplar arasındaki istatistiksel değerler Tablo 17’de gösterildiği gibidir.

Tablo 17. Normoksik koşullarda 24 saat ilaçla muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptotik değerlerinin istatistik sonuçları

p değeri	GSK	D1	G+D1	D2	G+D2
DMSO	Anlamsız	0,00228	5,13E-04	2,50E-05	8,12E-04
G+D1	9,02E-04	0,01605	-	-	0,0037
D2	-	0,00281	-	-	-
G+D2	7,79E-05	-	-	0,03575	-

DMSO; D1, G+D1, D2 ve G+D2 grupları ile kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,00228$ ($p \leq 0,01$), $p=0,000513$ ($p \leq 0,001$), $p=0,000025$ ($p \leq 0,001$), $p=0,000812$ ($p \leq 0,001$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. G+D1; GSK, D1 ve G+D2 grupları ile kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,000902$ ($p \leq 0,001$), $p=0,01605$ ($p \leq 0,05$) ve $p=0,0037$ ($p \leq 0,01$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. D2 ve D1 grupları kıyaslandığında aralarındaki fark $p=0,00281$ yani $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. G+D2; GSK ve D2 gruplarıyla kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,0000779$ ($p \leq 0,001$) ve $p=0,03575$ ($p \leq 0,001$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 20. Hipoksizde 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptoz miktarı

(♦ : Kontrole kıyasla $p \leq 0,01$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(† : Kontrole kıyasla $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

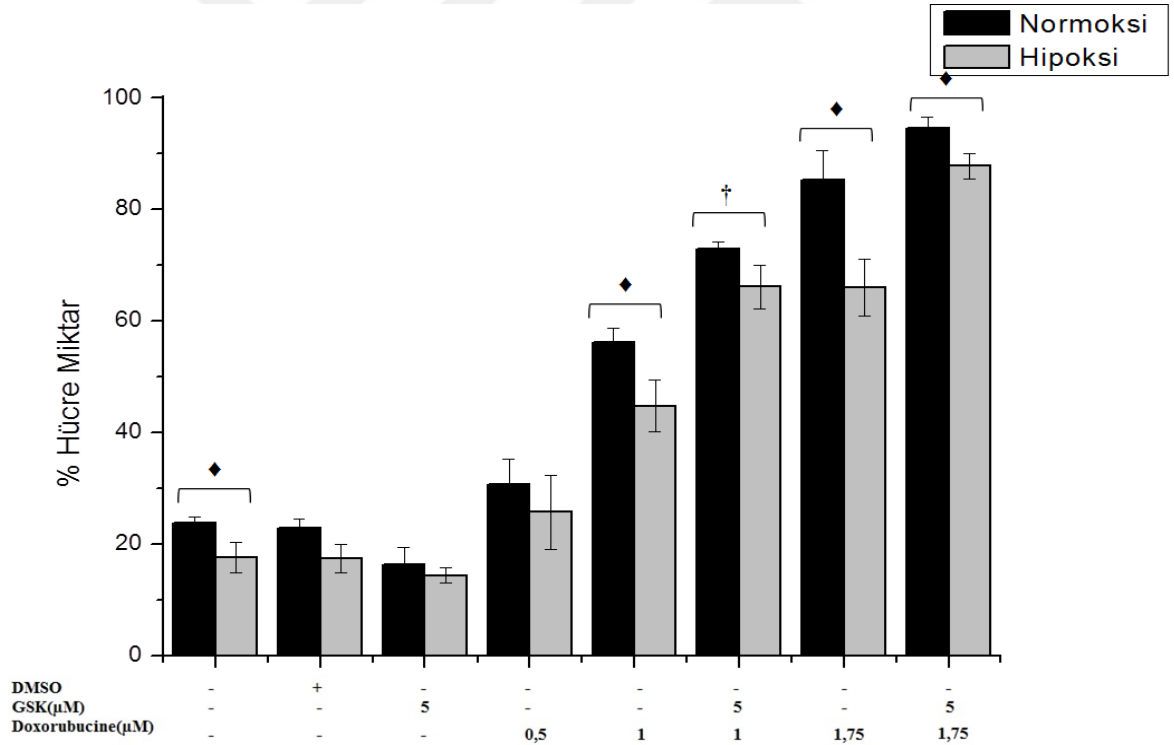
Benzer şekilde hipoksizde 24 saat inkübasyonu takiben kontrolde % 17 (± 2), DMSO'da % 17 (± 2), GSK2830371'de (GSK) % 14 (± 1), oranında total apoptozis ölçülürken sırasıyla uygulanan farklı doxorubicine konsantrasyonlarında D0 (0,5 μM)'da % 25 (± 6), D1'de (1 μM) % 44 (± 4), D2'de (1,75 μM) % 66 (± 5) oranlarında apoptozis ölçülmüştür. GSK (5 μM) ve Doxo birlikte uygulandığında ise (G+D1)'de % 66 (± 3) ve G+D2' de % 87 (± 2) oranında total apoptoz tespit edilmiştir. Kontrol, DMSO ve GSK grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. DMSO ile ilaç verilen gruplar karşılaştırılarak istatistiksel analizleri yapıldığında aralarındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Buna göre normoksiye benzer şekilde hipoksizde de GSK ve Doxo birlikte uygulandığında tek başına Doxo uygulamasına kıyasla total apoptozis miktarı yaklaşık %20 oranında daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bütün hipoksik gruplar arasındaki istatistiksel değerler Tablo 18'de gösterildiği gibidir.

Tablo 18. Hipoksik koşullarda 24 saat ilaçla muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptotik değerlerinin istatistik sonuçları

p değeri	G	D1	G+D1	D2	G+D2
D	Anlamsız	0,01902	0,00266	6,41E-04	1,14E-05
G+D1	3,74E-03	0,03114	-	-	0,00495
D2	-	0,02348	-	-	-
G+D2	5,44E-06	-	-	0,00661	-

DMSO; D1, G+D1, D2 ve G+D2 grupları ile kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,01902$ ($p \leq 0,05$), $p=0,00266$ ($p \leq 0,01$), $p=0,000641$ ($p \leq 0,001$), $p=0,0000114$ ($p \leq 0,001$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. G+D1; GSK, D1 ve G+D2 grupları ile kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,00374$ ($p \leq 0,01$), $p=0,03114$ ($p \leq 0,05$) ve $p=0,00495$ ($p \leq 0,01$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. D2 ve D1 grupları kıyaslandığında aralarındaki fark $p=0,02348$ yani $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. G+D2; GSK ve D2 gruplarıyla kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,00000544$ ($p \leq 0,001$) ve $p=0,00661$ ($p \leq 0,001$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır.



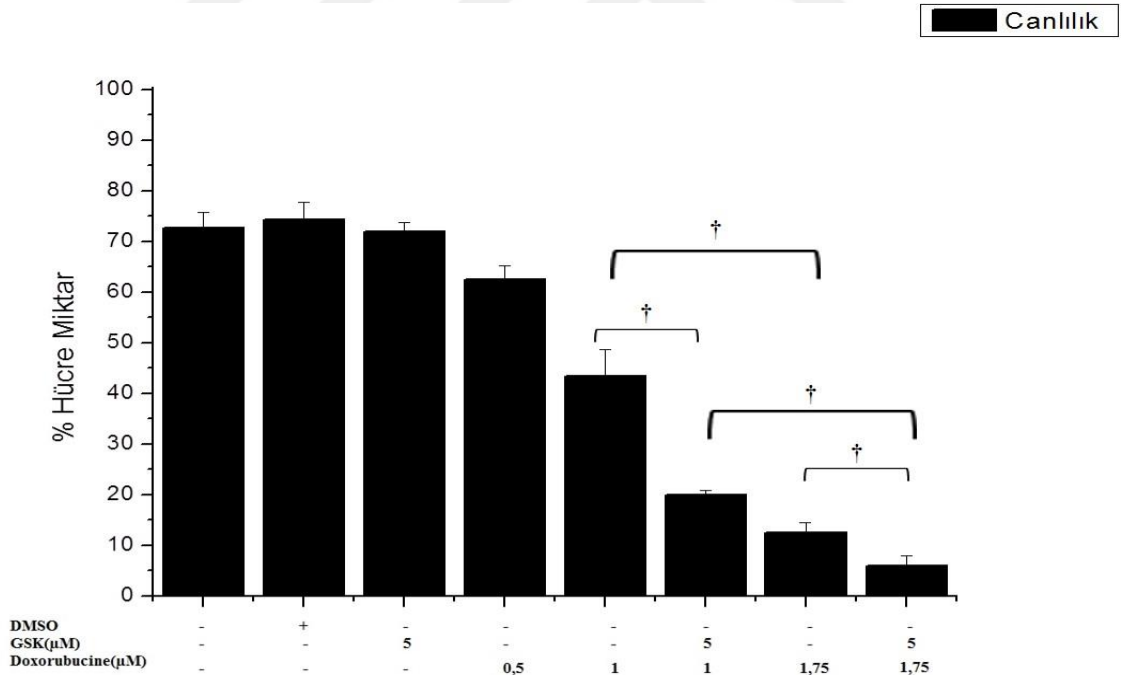
Şekil 21. Normoksik ve Hipoksik 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin total apoptoz miktarı

(♦ : Kontrole kıyasla $p \leq 0,01$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(† : Kontrole kıyasla $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Normoksik ve hipoksik 24 saat inkübasyonu takiben hesaplanan sonuçlar birbirleriyle kıyaslandığında kontrol, D1, D2 ve G+D2 grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Normoksi kontrol ile hipoksi kontrol karşılaştırıldığında total apoptozis oranının hipoksikde yaklaşık % 5 daha düşük olduğu ve bu farkın ($p=0,0155$) $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu farklılığın Doxo uygulaması sonucunda da ortaya çıktığı ve normoksi D1 ile hipoksi D1 grubu arasındaki total apoptozis farkının yaklaşık % 5 civarında olduğu ($p=0,0139$) ve bu farkın $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Benzer farklılıklar normoksi D2 ve hipoksi D2 arasında da tespit edilip bu farkın ($p=0,01857$) $p \leq 0,05$ düzeyinde yine istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Normoksi G+D2 ile hipoksi G+D2 arasında da farklılık olup $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,00755$).

Normoksik ve hipoksik şartlar altında MCF-7 hücreleri Bölüm 3.2.8.5’de bahsedildiği gibi Annexin V testi sonucunda hücresel canlılık miktarları da yüzde veri olarak hesaplanmıştır. Üç bağımsız tekrardan elde edilen veriler Şekil 22-25’teki gibi grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 22. Normoksik 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık miktarı

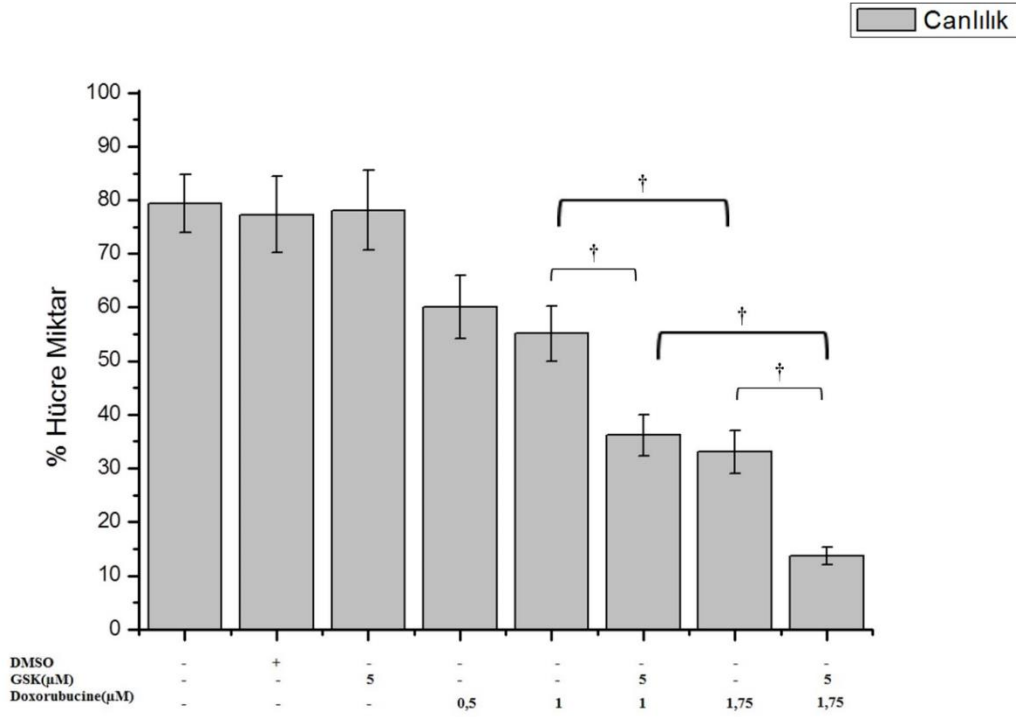
(† : Kontrole kıyasla $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Normoksida 24 saat inkübasyonu takiben elde edilen veriler göre canlılık oraları kontrolde %74 (± 1), DMSO'da %74 (± 3), GSK2830371'de (GSK) %72 (± 1) olarak tespit edilirken sırasıyla farklı konsantrasyonlarda doksorobusin uygulaması sonucunda D0'de %62 (± 2), D1'de %41 (± 6), D2'de %20 (± 2) olarak bulunmuştur. GSK2830371 ve farklı konsantrasyonlarda doksorobusine ve uygulamasın sonrasında ise hücresel canlılık G+D1'de %12 (± 2) G+D2'de ise %6 (± 2) oranında tespit edilmiştir. Kontrol, DMSO ve GSK grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken DMSO ile ilaç verilen gruplar karşılaştırıldığında aralarındaki istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu belirlenmiştir. Bütün normoksik gruplar arasındaki istatistiksel değerler Tablo 19'da gösterildiği gibidir.

Tablo 19. Normoksik koşullarda 24 saat ilaçla muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık değerlerinin istatistik sonuçları

p değeri	G	D1	G+D1	D2	G+D2
D	Anlamsız	0,00567	0,00292	9,02E-04	0,001
G+D1	7,29E-04	0,01774	-	-	0,05
D2	-	0,00681	-	-	-
G+D2	2,93E-04	-	-	0,01315	-

DMSO; D1, G+D1, D2 ve G+D2 grupları ile kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,00567$ ($p \leq 0,01$), $p=0,00292$ ($p \leq 0,01$), $p=0,000902$ ($p \leq 0,001$), $p=0,001$ ($p \leq 0,001$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. G+D1; GSK, D1 ve G+D2 grupları ile kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,000729$ ($p \leq 0,001$), $p=0,01774$ ($p \leq 0,05$) ve $p=0,05$ ($p \leq 0,05$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. D2 ve D1 grupları kıyaslandığında aralarındaki fark $p=0,00681$ yani $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. G+D2; GSK ve D2 gruplarıyla kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,000293$ ($p \leq 0,001$) ve $p=0,01315$ ($p \leq 0,005$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 23. Hipoksizde 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık miktarı

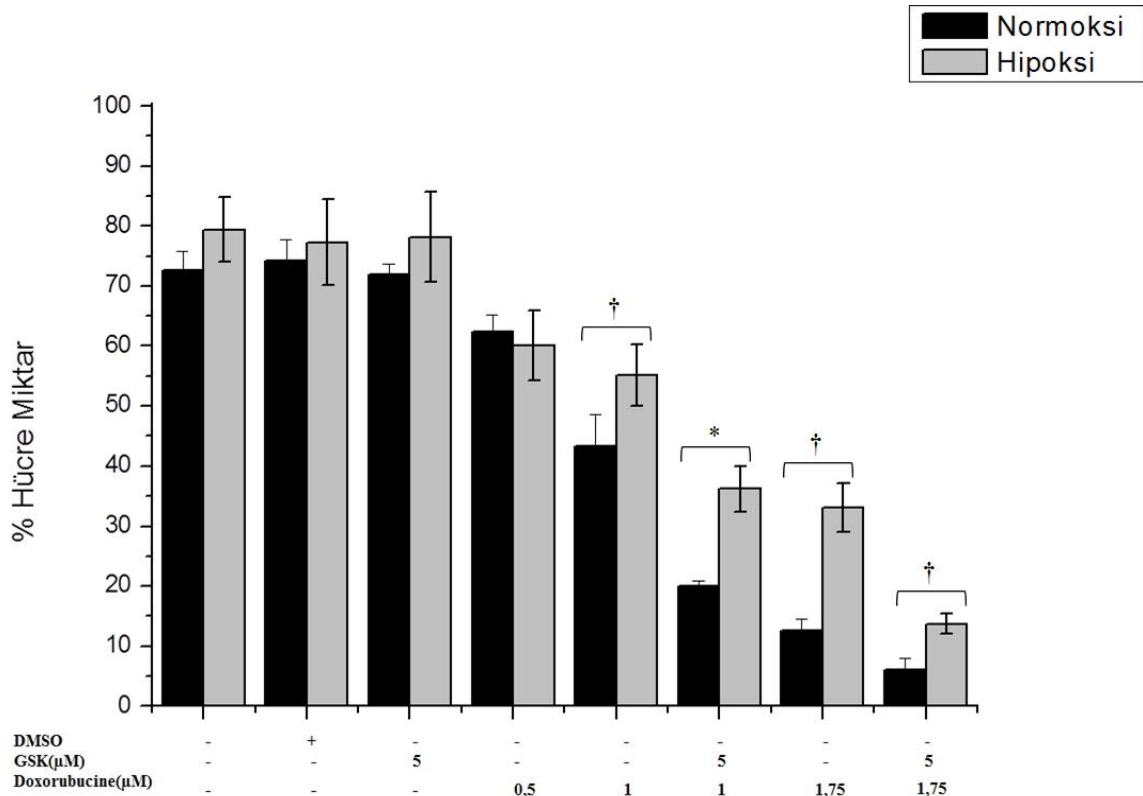
(† : Kontrole kıyasla $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Hipoksizde 24 saat inkübasyonu takiben elde edilen verilere göre hücre canlılık oranları; kontrolde %79 (± 5), DMSO'da %77 (± 7), GSK2830371'de (GSK) %78 (± 7) bulunmuştur. Farklı Doxo konsantrasyonlarında ise hücre canlılık D0'da %60 (± 5), D1'de %53 (± 5), D2'de ise %34 (± 4), olarak tespit edilmiştir. GSK ve farklı konsantrasyonlarda Doxo uygulaması sonucunda ise hücre canlılık miktarları G+D1'de %33 (± 3) ve G+D2'de ise grubunda %13 (± 1) oranında tespit edilmiştir. Kontrol, DMSO ve GSK grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. DMSO ile ilaç verilen gruplar karşılaştırıldığında ise aralarındaki farklılığın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bütün hipoksik gruplar arasındaki istatistiksel değerler Tablo 20'de gösterildiği gibidir.

Tablo 20. Hipoksik koşullarda 24 saat ilaçla muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık değerlerinin istatistik sonuçları

p değeri	G	D1	G+D1	D2	G+D2
D	Anlamsız	0,01657	0,00185	4,60E-03	1,68E-04
G+D1	9,76E-03	0,05	-	-	0,02196
D2	-	0,02895	-	-	-
G+D2	1,64E-03	-	-	0,00498	-

DMSO; D1, G+D1, D2 ve G+D2 grupları ile kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,01657$ ($p \leq 0,05$), $p=0,00185$ ($p \leq 0,01$), $p=0,00460$ ($p \leq 0,01$), $p=0,000168$ ($p \leq 0,001$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. G+D1; GSK, D1 ve G+D2 grupları ile kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,00976$ ($p \leq 0,01$), $p=0,05$ ($p \leq 0,05$) ve $p=0,02196$ ($p \leq 0,05$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. D2 ve D1 grupları kıyaslandığında aralarındaki fark $p=0,02895$ yani $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. G+D2; GSK ve D2 gruplarıyla kıyaslandığında aralarındaki fark sırasıyla $p=0,00164$ ($p \leq 0,01$) ve $p=0,00498$ ($p \leq 0,005$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 24. Normoksik ve hipoksik 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık miktarı

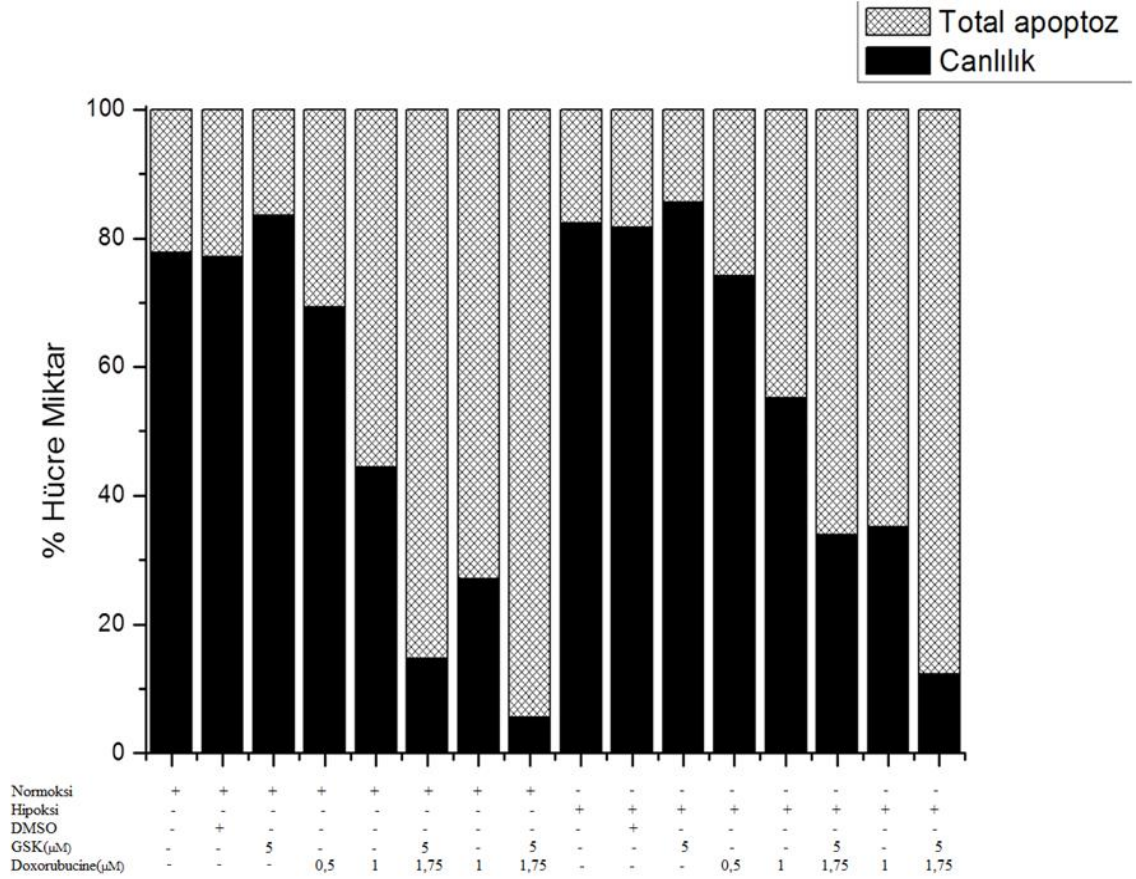
(* : Kontrole kıyasla $p \leq 0,001$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(† : Kontrole kıyasla $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Normoksik ve hipokside 24 saat inkübasyonu takiben hesaplanan hücre canlılık sonuçları birbirleriyle kıyaslandığında D1, D2, G+D1 ve G+D2 grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Normoksi D1 ile hipoksi D1 grubu arasındaki fark ($p=0,000304$) $p \leq 0,001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Normoksi D2 ile hipoksi D2 grubu arasındaki fark ($p=0,00408$) yine $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Normoksi D2 ve hipoksi D2 arasındaki fark ($p= 0,01334$) ise $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel

olarak anlamlı bulunmuştur. Benzer şekilde normoksi G+D2 ile hipoksi G+D2 arasındaki farklılık ($p=0,01677$) $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır.

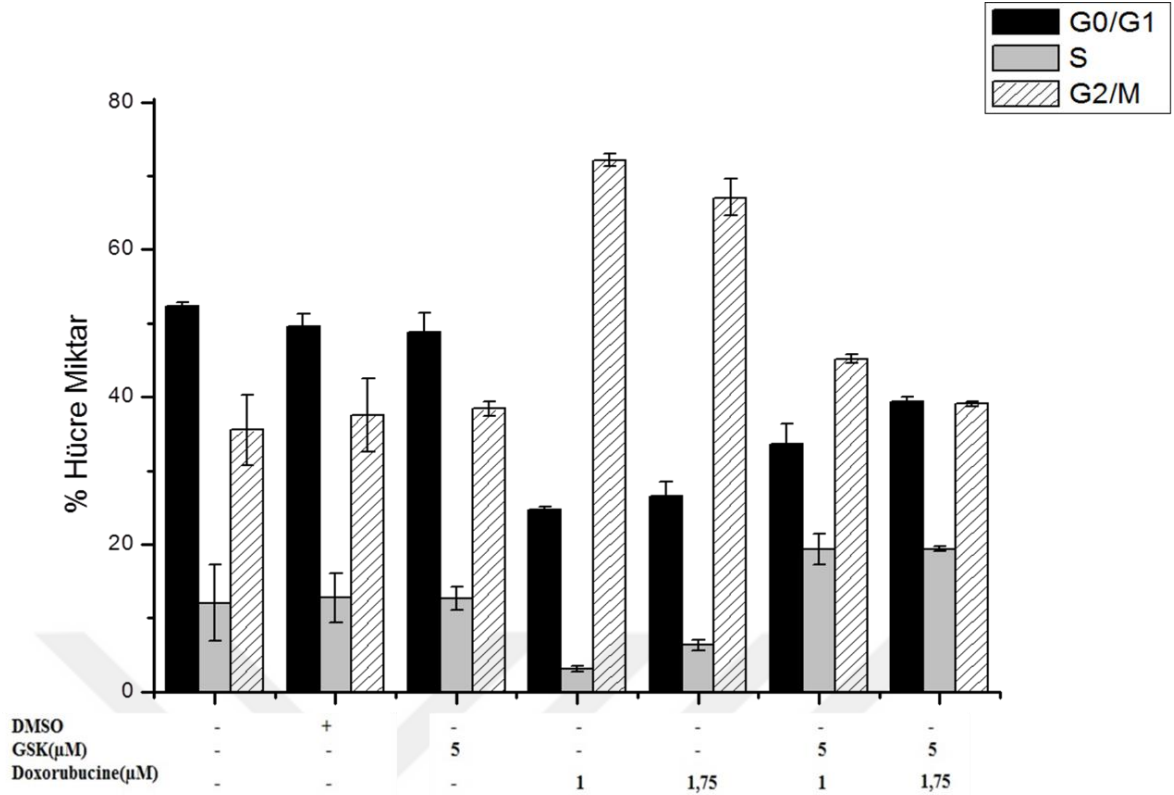
Normoksi ve hipokside alınan Annexin V sonuçları birleştirilerek total apoptoz ve canlılık oranları Şekil 25'te ortak grafik üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 25. Normoksi ve hipokside 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisine ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde canlılık ve total apoptoz miktarı

4.7.3. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin Uygulamasının Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri

Normoksi ve hipokside 24 saat tek tek veya GSK2830371 ve Doksorubisin birlikte muamele edilen MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Hücre döngüsü analizi hücrenin G0/G1, S ve G2 evrelerinin yüzde olarak oranlarının ölçülmesini sağlayan bir analizdir. Elde edilen veriler istatistiksel analizler yapılarak yapılarak Şekil 26-29'daki gibi grafiğe aktarılmıştır.

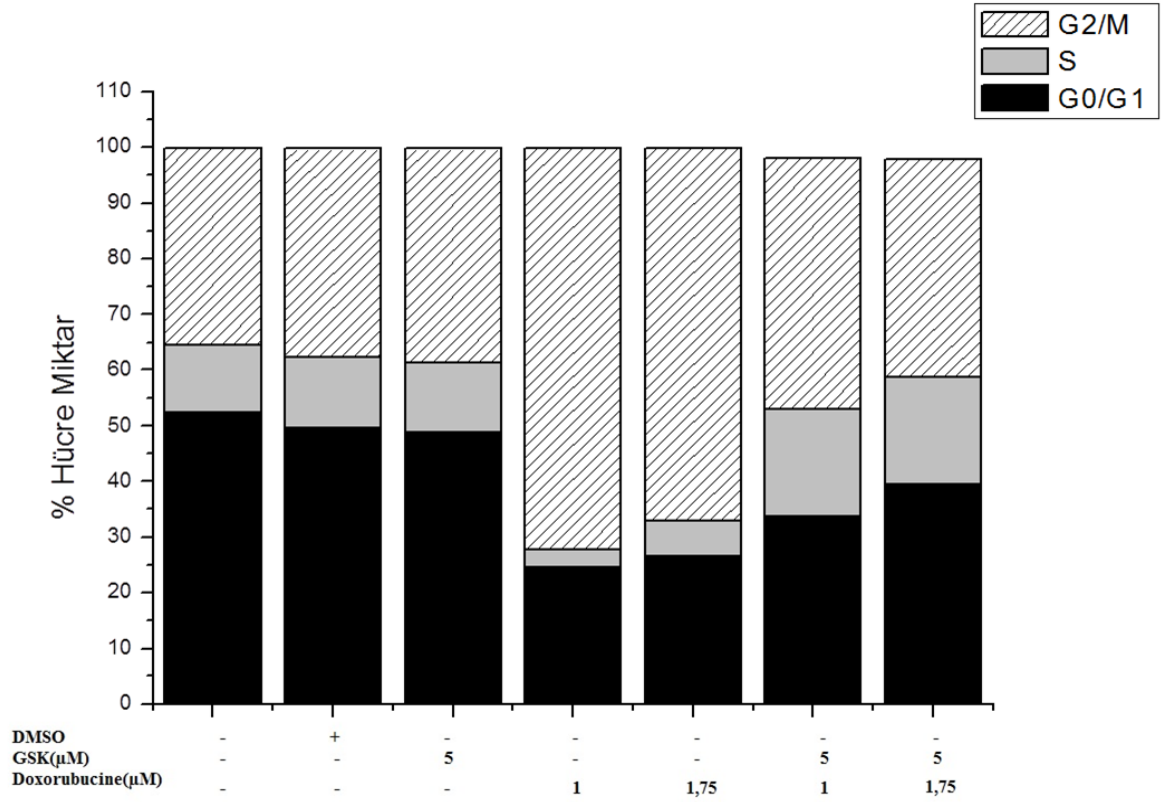


Şekil 26. Normokside 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı

Normokside 24 saat inkübasyonu takiben elde edilen veriler ve $\pm$ standart sapma değerleri Tablo 21’de ayrıntılı olarak verilmektedir.

Tablo 21. Normokside MCF-7 hücre döngüsü faz oranları

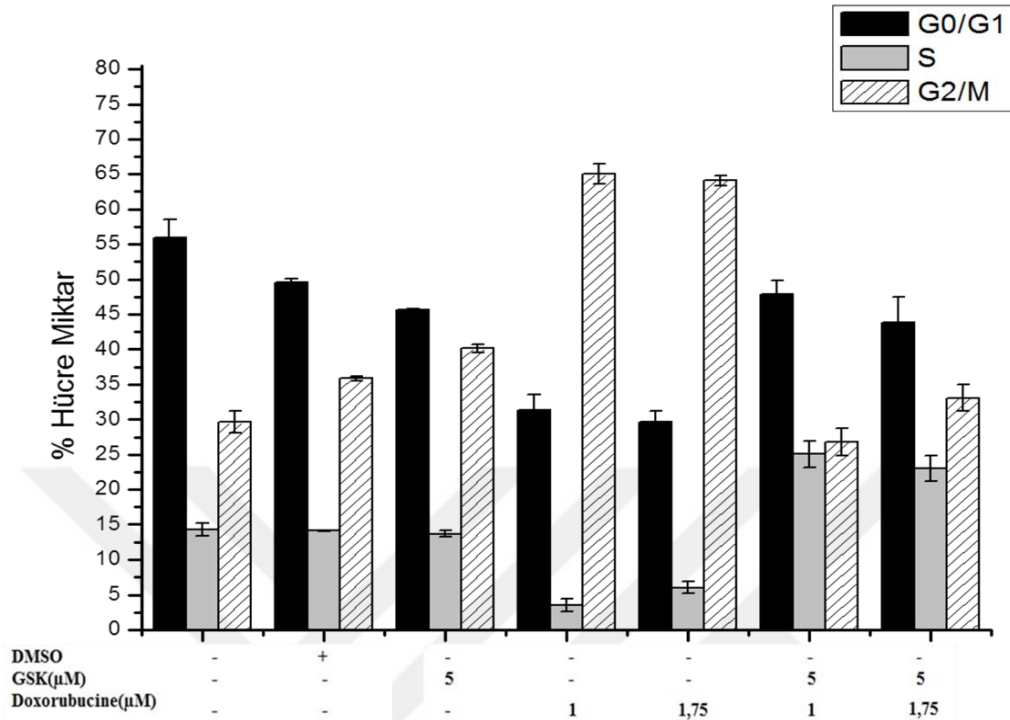
Normoksi Cell Cycle	%G0/G1	%S	%G2/M
Kontrol	52 ($\pm 0,4$)	12 (± 5)	35 (± 4)
DMSO	49 (± 1)	12 (± 3)	37 (± 4)
GSK	48 (± 2)	12 (± 1)	38 ($\pm 0,9$)
D1	24 ($\pm 0,4$)	3 ($\pm 0,4$)	72 ($\pm 0,8$)
D2	26 (± 2)	6 ($\pm 0,7$)	67 (± 2)
G+D1	33 (± 2)	19 (± 2)	45 ($\pm 0,6$)
G+D2	39 ($\pm 0,5$)	19 ($\pm 0,2$)	39 ($\pm 0,3$)



Şekil 27. Normoksida 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı kümülatif grafiği

Şekil 27 ve Tablo 21’ de görüldüğü üzere DMSO ve GSK ile muamele hücrelerde kontrole kıyasla hücre döngüsü fazları arasında herhangi bir anlamlı farklılık saptanmamıştır. Doxo ile muamele edilen hücrelerde ise sırasıyla D1 ve D2 konsantrasyonlarında hücre döngüsünün G2 fazında bulunan hücrelerin kontrole kıyasla yaklaşık % 50 daha fazla olduğu bulunmuştur (D1: $p=0,0023$ ($p \leq 0,01$), D2: $0,00117$ ($p \leq 0,01$)). D1 ve D2 ile muamele edilen hücrelerde G2 faz oranında görülen artışla birlikte G1 (D1: $p=0,000435$ ($p \leq 0,001$), D2: $p=0,0000063$ ($p \leq 0,001$)) ve S (D1: $p=0,01471$ ($p \leq 0,05$), D2: $p=0,0263$ ($p \leq 0,05$)) fazında bulunan hücre oranlarının kontrole kıyasla %50 oranında azaldığı da tespit edilmiştir. Buna göre D1 ve D2 uygulaması sonucu MCF-7 hücrelerinin G2 fazında durdurulduğu görülmektedir. GSK+Doxo ile muamele edilen hücrelerde ise doxorubicinin tek başına etkisinin kompanse edildiği, G2 (G+D1/D1: $p=0,000505$ ($p \leq 0,001$), G+D2/D2: $p=0,0017$ ($p \leq 0,01$)) faz oranının azaldığı ve hücrelerin G1 (G+D1/D1: $p=0,02108$ ($p \leq 0,05$), G+D2/D2: $p=0,00182$ ($p \leq 0,01$)) ve S (G+D1/D1: $p=0,00182$ ($p \leq 0,01$), G+D2/D2: $p=0,00095$ ($p \leq 0,001$)) faz oranlarında tekrar bir artış gerçekleştiği tespit edilmiştir. GSK+Doxo uygulaması sonucunda özellikle G1 ve S faz oranlarında gerçekleşen artışın tek doxo uygulamasından elde edilen G1 ve S faz oranlarıyla

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir (Şekil 26, 27, Tablo 21).



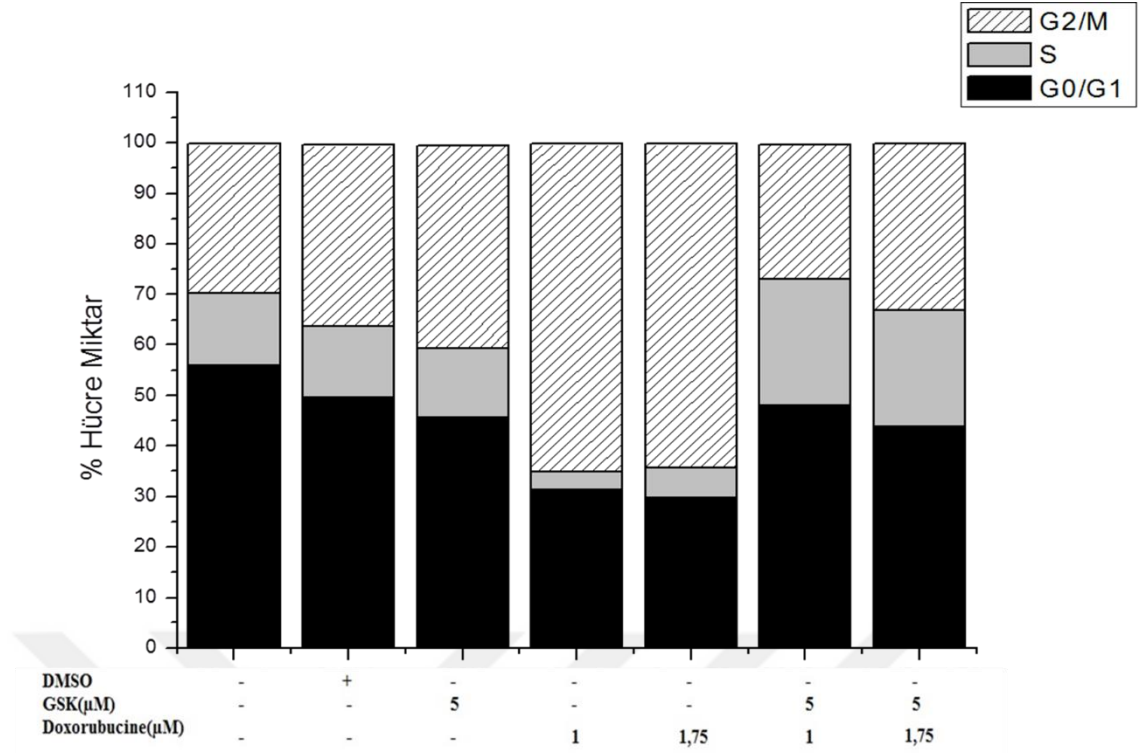
Şekil 28. Hipoksik ortamda 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı

Şekil 28 ve Tablo 22’ de görüldüğü üzere hipoksi koşullarında kontrol ve DMSO arasında hücre döngüsü fazları arasında yine herhangi bir anlamlı farklılık saptanmazken, GSK ile muamele hücrelerde DMSO ile kıyaslandığında bu artışın istatistiksel olarak $p=0,00872$ ($p \leq 0,01$) düzeyinde anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Doksorubisin ile muamele edilen hücrelerde ise sırasıyla D1 ($p=0,000612$ ($p \leq 0,001$)) ve D2 ($p=0,000026$ ($p \leq 0,001$)) konsantrasyonlarında normoksiye benzer şekilde hücre döngüsünün G2 faz oranında kontrole kıyasla yaklaşık % 25 oranında bir artış olduğu bulunmuştur. D1 ve D2 ile muamele edilen hücrelerde G2 faz oranında görülen artışla birlikte G1 (D1: $p=0,00361$ ($p \leq 0,01$), D2: $p=0,000475$ ($p \leq 0,001$)) ve S (D1: $p=0,00105$ ($p \leq 0,01$), D2: $p=0,00211$ ($p \leq 0,01$)) fazında bulunan hücre oranlarında kontrole kıyasla bir azalma olduğu da tespit edilmiştir. Buna göre hipoksida D1 ve D2 uygulaması sonucu MCF-7 hücrelerinin normoksiye benzer şekilde çok büyük oranda G2 fazında durdurulduğu görülmektedir. Hipoksida GSK+Doxo ile muamele edilen hücrelerde de normoksiye benzer şekilde doksorubisinin tek başına etkisinin GSK tarafından kompanse edildiği, G2 (G+D1/D1:

p=0,00097 ($p \leq 0,001$), G+D2/D2: p=0,000249 ($p \leq 0,001$)) faz oranının azaldığı ve hücrelerin G1 (G+D1/D1: p=0,00334 ($p \leq 0,01$), G+D2/D2: p=0,00025 ($p \leq 0,001$)) ve S (G+D1/D1: p=0,00166 ($p \leq 0,01$), G+D2/D2: p=0,00056 ($p \leq 0,001$)) faz oranlarında tekrar bir artış gerçekleştiği tespit edilmiştir. GSK+Doxo uygulaması sonucunda özellikle G1 ve S faz oranlarında gerçekleşen artışın tek doxo uygulamasından elde edilen G1 ve S faz oranlarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir (Şekil 28, 29 ve Tablo 22).

Tablo 22. Hipoksi gruplarının hücre döngüsü faz oranları

Hipoksi Cell Cycle	%G0/G1	%S	%G2/M
Kontrol	55 (± 2)	14 ($\pm 0,9$)	29 (± 1)
DMSO	49 ($\pm 0,4$)	14 ($\pm 0,07$)	35 ($\pm 0,3$)
GSK	45 ($\pm 0,1$)	13 ($\pm 0,4$)	40 ($\pm 0,6$)
D1	31 (± 2)	3 ($\pm 0,9$)	65 (± 1)
D2	29 (± 1)	6 ($\pm 0,8$)	64 ($\pm 0,7$)
G+D1	47 (± 3)	23 (± 2)	26 (± 2)
G+D2	43 (± 3)	23 (± 1)	33 (± 2)



Şekil 29. Hipoksik ortamda 24 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımı kümülatif grafiği

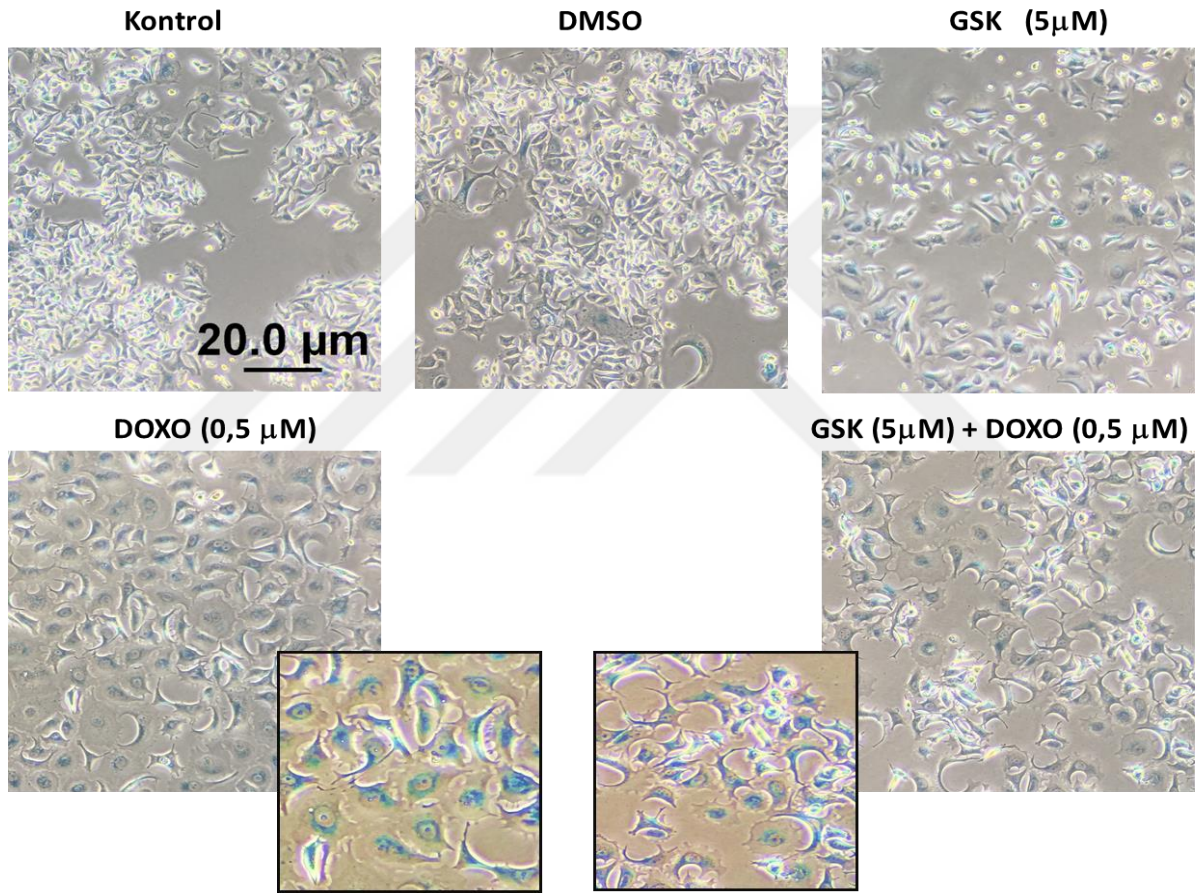
4.8. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 72 Saat GSK2830371 ve Doksorubisin Uygulamasının MCF-7 Hücrelerinde Senesens İndükleyici Etkileri

Wip1 fosfatazin baskılanmasının DDR'nin diğer bir önemli bir sonucu olan hücre senesensin indüksiyonu üzerine etkilerini test etmek amacıyla MCF-7 hücreleri GSK varlığında ve yokluğunda 0,5 μ M Doxo ile 72 saat süreyle hem normoksi hem de hipoksi koşullarında uygulanmıştır.

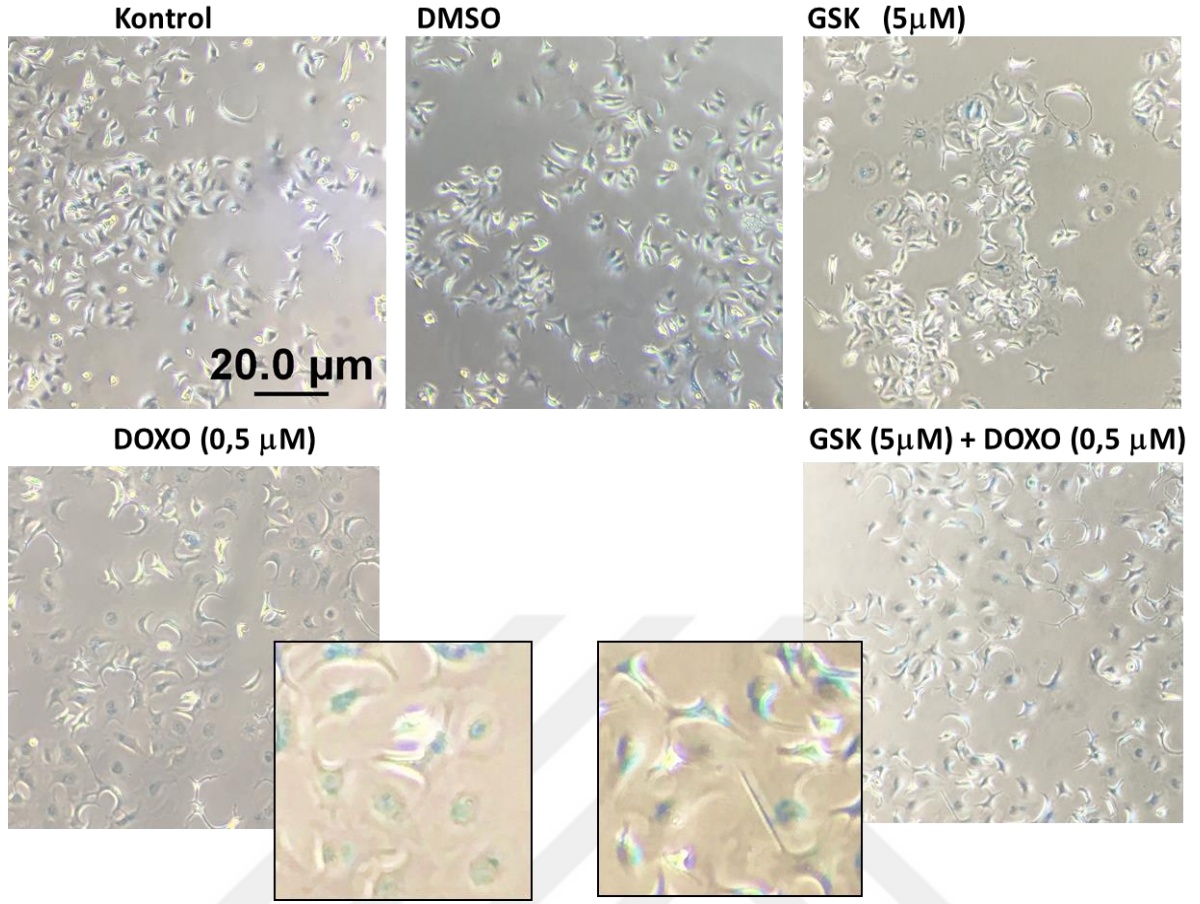
4.8.1. SA- β -Galaktosidaz Boyaması

Normoksi ve hipoksi koşullarında tek başına Doxo veya GSK+Doxo ile 72 saat muamele edilen MCF7 hücreleri inkübasyon süresinin bitiminde fikse edilerek SA- β -Galaktosidaz boyaması yapılmıştır. Senesense uğrayan hücrelerde lizozomal β -Galaktosidaz aktivitesinin artmasıyla ortama eklenen substratın parçalanmasıyla (X-gal) bu hücrelerin sitoplazmalarının maviye boyandığı görülmektedir. SA- β -Galaktosidaz boyaması senesens için iyi belirteçlerden birisi olarak literatürde yer almaktadır. Buna göre normoksi

koşullarında kontrol veya DMSO gruplarında çok düşük miktarlarda hafif bir boyama görülürken, GSK uygulanan hücrelerde boyama oranının daha fazla olduğu görülmektedir. Tek başına Doxo uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla hücrelerin morfolojik olarak senesens karakteristiklerini gösterdikleri (sitoplazması genişlemiş, hücresel olarak daha düz ve şeffaf görünümlü) ve daha fazla boyandıkları görülmektedir. GSK+Doxo grubunda da benzer şekilde hücrelerin morfolojik olarak senesens karakteristiklerini gösterdikleri ve maviye boyandıkları görülmektedir. GSK+Doxo uygulamasının senesens indüklenme oranının tek başına Doxo uygulamasıyla karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmektedir.



Şekil 30. Normoksik ortamda inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde 72 saat GSK ve Doxo uygulamasına cevaben SA- β galaktosidaz boyaması mikroskop görüntüsü (10X)



Şekil 31. Hipoksik ortamda inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde 72 saat GSK ve Doxo uygulamasına cevaben SA-β galaktozidaz boyaması mikroskop görüntüsü (10X)

Şekil 30 ve 31’de görüldüğü üzere Doksorubisin içerenler kontrole kıyasla sitoplazması genişlemiş, hücresel olarak daha şeffaf görünümlü ve daha belirgin şekilde boyanmışlardır. Doxo 0,5 grubu GSK+Doxo 0,5 grubuna kıyasla miktar olarak daha fazla olduğu görülmektedir.

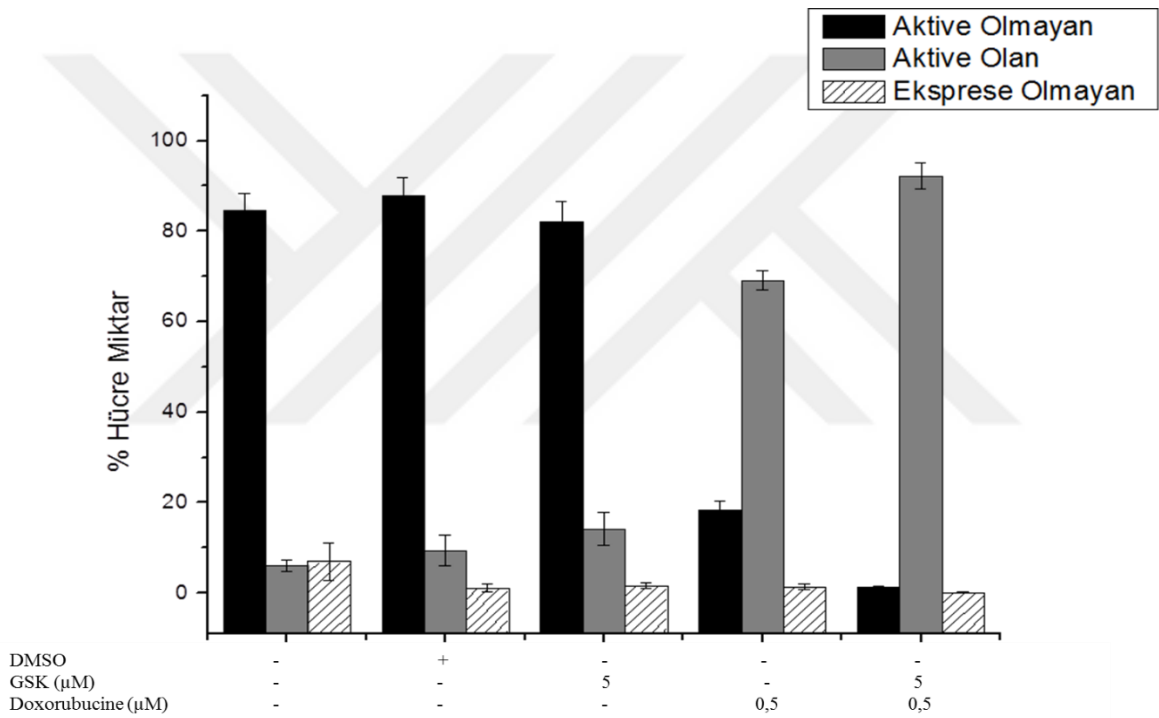
Normoksi ve hipoksi kendi arasında karşılaştırıldığında ise normokside hücrelerin 72 saatte daha fazla miktarda senesense uğramış hücre olduğu gözlemlenmiştir.

4.8.2. H2A.X Analizi

Normoksi ve hipoksi koşullarında senesens indüksiyonu için 72 saat Doxo ve GSK+ Doxo uygulanan MCF7 hücrelerinde aynı zamanda γH2A.X testi yapılmıştır. Bu test hücrenin total H2AX ve γ-H2AX (Ser 139) ekspresyon seviyesini ölçmektedir. γ-H2AX

seviyesi hücrelerde çift zincir DNA kırığı ve aynı zamanda senesens indüksiyonu için kullanılan önemli bir belirteçtir.

Şekil 32'de görüldüğü üzere normoksik şartlarda Kontrol, DMSO ve GSK gruplarında total H2AX ekspresyon seviyesi (aktif olmayan) oldukça yüksek düzeyde seyredirken aktif (γ -H2AX (Ser 139)) seviyesinin düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Normoksi koşullarında 72 saat süreyle tek başına Doxo uygulanan gruplarda ise aktif γ -H2AX (Ser 139) seviyesinin yüksek olduğu ve hatta bu seviyenin GSK + Doxo uygulanan grupta daha da artmış olduğu görülmektedir (G+D0/D0: $p=0,00056$ ($p=0,001$)). Aynı gruplarda aktif olmayan H2AX seviyesinin düşük olduğu görülmektedir (G+D0/D0: $p=0,0000323$ ($p=0,001$)) (Şekil 32).

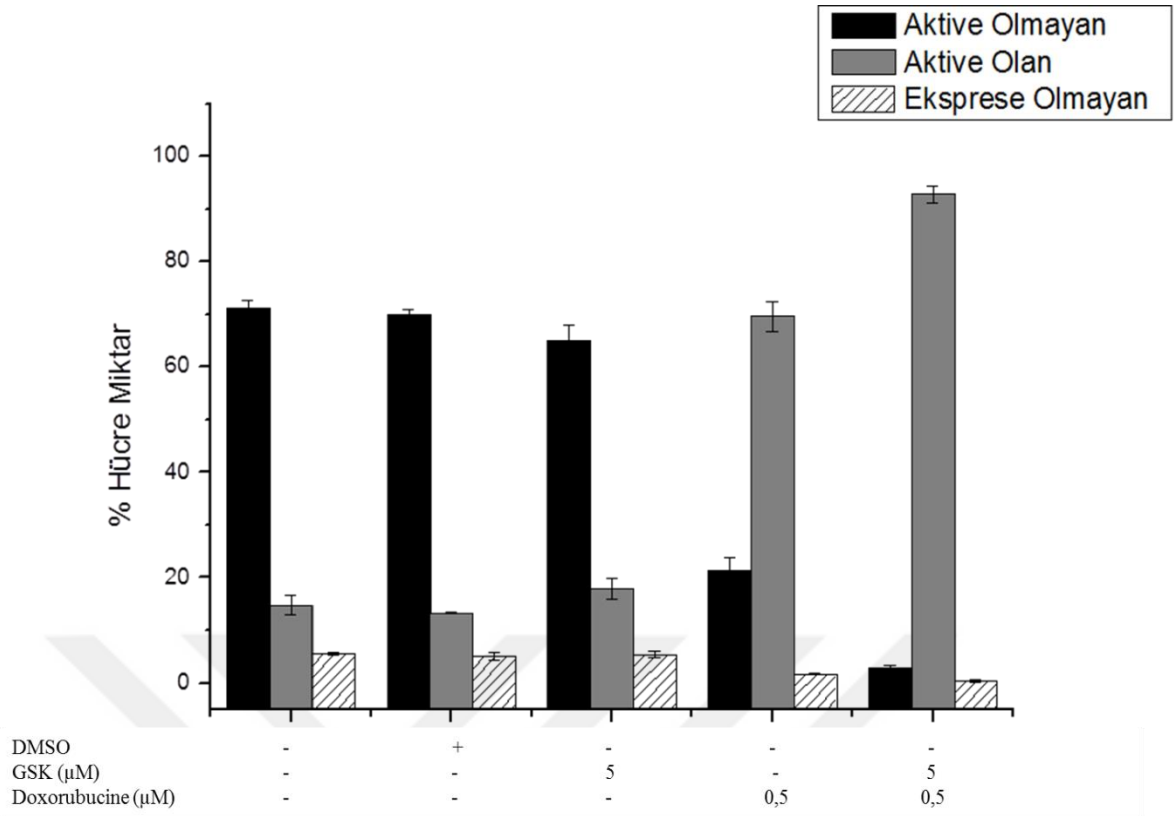


Şekil 32. Normoksik ortamda 72 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin H2A.X analizi grafiği

Tablo 23. Normoksi gruplarının H2A.X analizi sonuçları

Normoksi H2AX	Aktive olmayan	Aktive olan	Eksprese edilmeyen
Kontrol	%84,5 ($\pm 3,7$)	%6 ($\pm 1,2$)	%7 ($\pm 4,2$)
DMSO	%87,8 (± 4)	%9,4 ($\pm 3,3$)	%1,1 ($\pm 0,7$)
GSK	%82,1 ($\pm 4,4$)	%14,2 ($\pm 3,7$)	% 1,6 ($\pm 0,6$)
D0	%18,5 (± 2)	%69 (± 2)	%1,3 ($\pm 0,6$)
G+D0	% 1,3 ($\pm 0,3$)	%92,2 (± 3)	%0,14 ($\pm 0,06$)

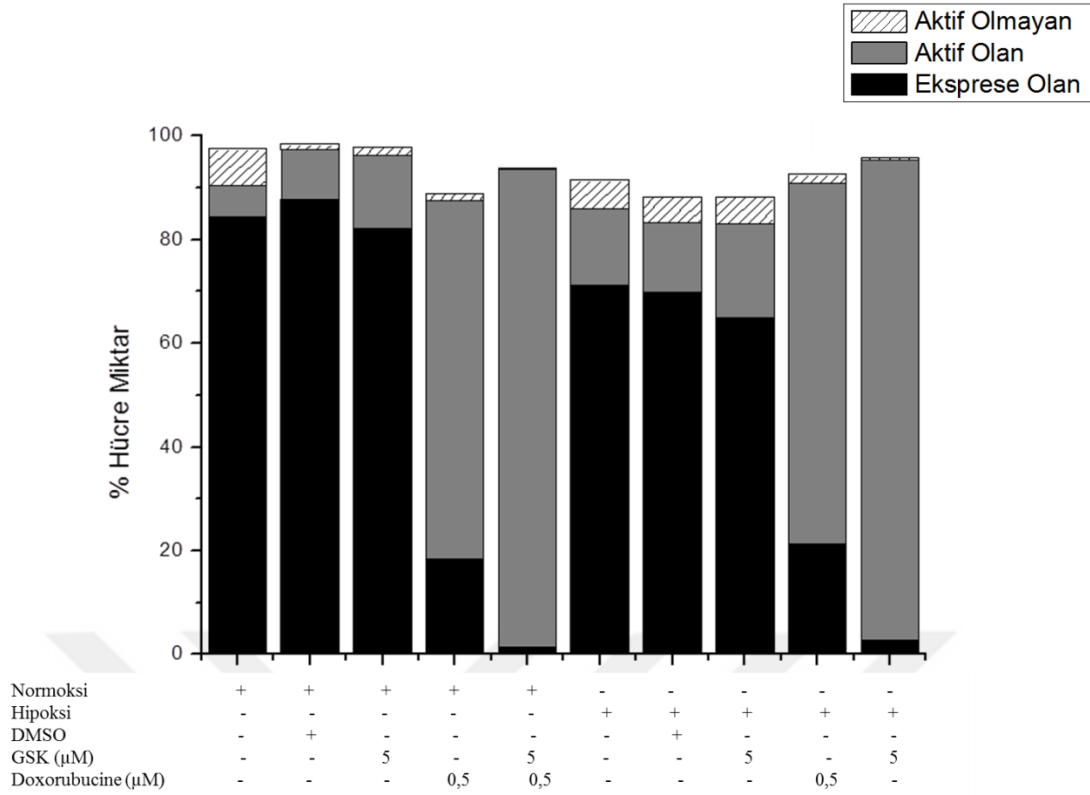
Hipoksi koşullarında ise yine benzer şekilde Kontrol, DMSO ve GSK gruplarında total H2AX seviyesinin (aktive olmayan) her üç grupta da neredeyse eşit düzeyde ve oldukça yüksek olduğu görülürken aktif (γ -H2AX (Ser 139)) seviyesinin düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Normoksiye benzer şekilde hipoksi koşullarında da 72 saat süreyle tek başına Doxo uygulanan gruplarda ise aktif γ -H2AX (Ser 139) seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. GSK+Doxo uygulanan grupta ise yine aktif γ -H2AX (Ser 139) seviyesinin Doxo uygulaması ile kıyaslandığında daha da artmış olduğu görülmektedir (G+D0/D0: $p=0,000094$ ($p=0,001$)). Doxo ve GSK + Doxo gruplarında aktif olmayan H2AX seviyesinin ise düşük olduğu görülmektedir (G+D0/D0: $p=0,000271$ ($p=0,001$)) (Şekil 33).



Şekil 33. Hipoksik ortamda 72 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin H2A.X analizi grafiği

Tablo 24. Hipoksi gruplarının H2A.X analizi sonuçları

Normoksi H2AX	Aktive olmayan	Aktive olan	Eksprese edilmeyen
Kontrol	%71,2 (±1,5)	%14,8 (±1,9)	%5,5 (±0,2)
DMSO	%70 (±1)	%13,3 (±0,2)	%5 (±0,7)
GSK	%65 (±2,8)	%18 (±2)	%5,35 (±0,6)
D0	%21,4 (±2,3)	%70 (±3)	%1,7 (±0,2)
G+D0	% 2,7 (±0,7)	%92,8 (±1,7)	%0,4 (±0,1)



Şekil 34. Normoksik ve hipoksik ortamda 72 saat GSK2830371 ve Doksorubisin ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin H2A.X analizi grafiği

4.8.3. Hücre Döngüsü Analizi

Senesens genellikle hücrelerin metabolik olarak aktif olduğu ancak hücre döngüsünün ve bölünmemin durdurulmasıyla karakterize bir süreçtir. Bu nedenle senesensin indüklenmesi amacıyla normoksi ve hipoksi koşullarında kontrol gruplarıyla birlikte 72 saat süreyle Doxo ve GSK+Doxo uygulanan MCF-7 hücrelerinde inkübasyon süresinin bitiminde hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Bu analiz ile hücreler, döngünün hangi fazında bulunduğu (G0/G1, S ve G2 evreleri) kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Bu analiz sonucunda elde edilen yüzdelik veriler hem orjinal histogramları (Şekil 35, 36) hem de grafiksel olarak (Şekil 37, 38, 39) sunulmuştur.

Tablo 25. Normoksi gruplarının hücre döngüsü faz oranları

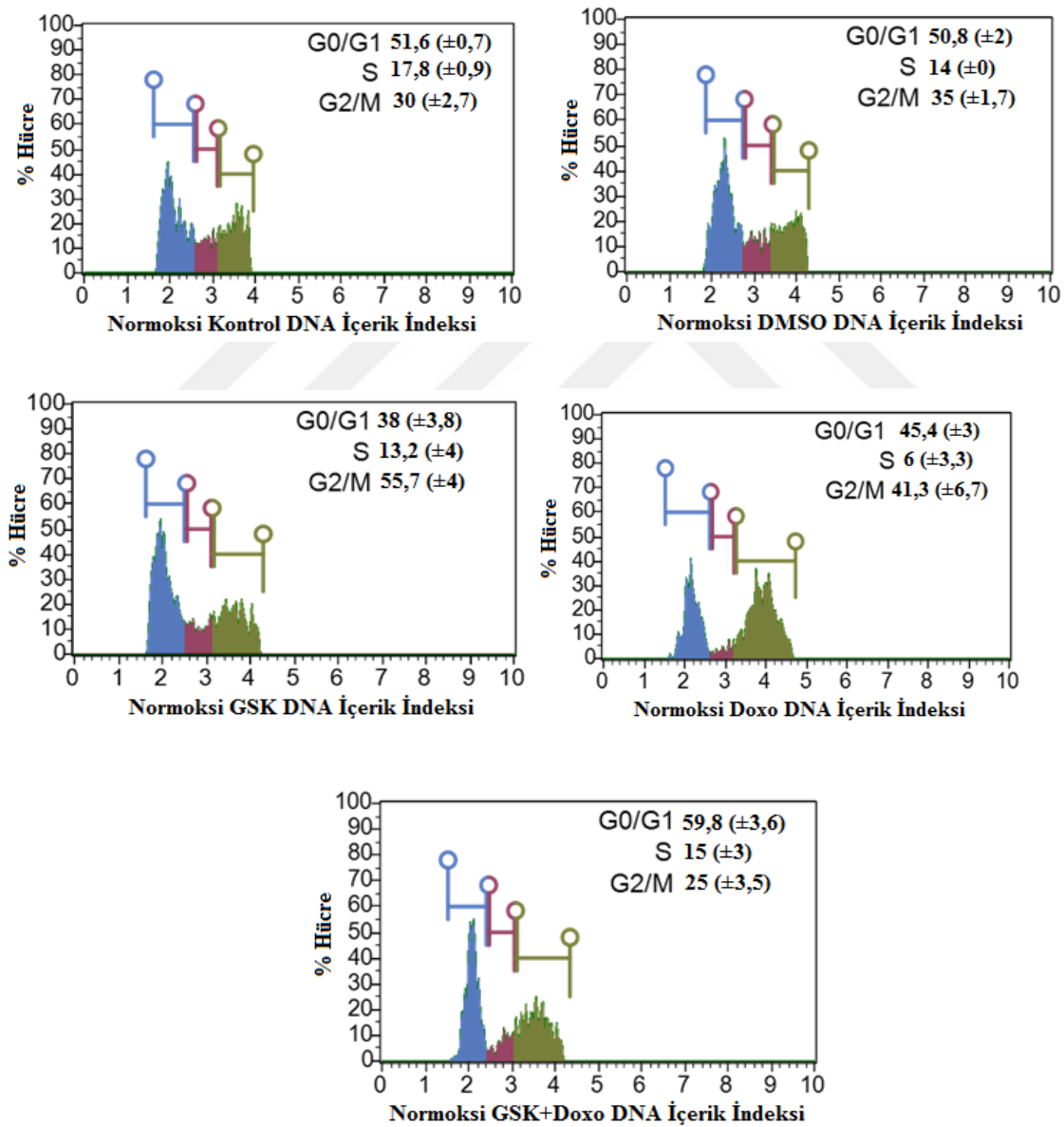
Normoksi Cell Cycle	%G0/G1	%S	%G2/M
Kontrol	51,6 ($\pm 0,7$)	17,8 ($\pm 0,9$)	30 ($\pm 2,7$)
DMSO	50,8 (± 2)	14 (± 0)	35 ($\pm 1,7$)
GSK	38 ($\pm 3,8$)	13,2 (± 4)	55,7 (± 4)
D0	45,4 (± 3)	6 ($\pm 3,3$)	41,3 ($\pm 6,7$)
G+D0	59,8 ($\pm 3,6$)	15 (± 3)	25 ($\pm 3,5$)

Bu sonuçlara göre normoksi koşullarında kontrole kıyasla DMSO grubunda hücre döngüsü evreleri açısından herhangi bir farklılık görülmezken 72 saat süreyle GSK ve Doxo uygulanan hücrelerde G2/M evresinin kontrole kıyasla sırasıyla yaklaşık %15- 20 oranında bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. GSK+ Doxo uygulanan grupta ise tek başına Doxo uygulanan hücrelere göre G2/M evresinin azaldığı ve S fazının biraz artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak kontrole kıyasla bu hücrelerde G2/M fazının halen daha yüksek oranda olduğu görülmektedir (Şekil 37, 39).

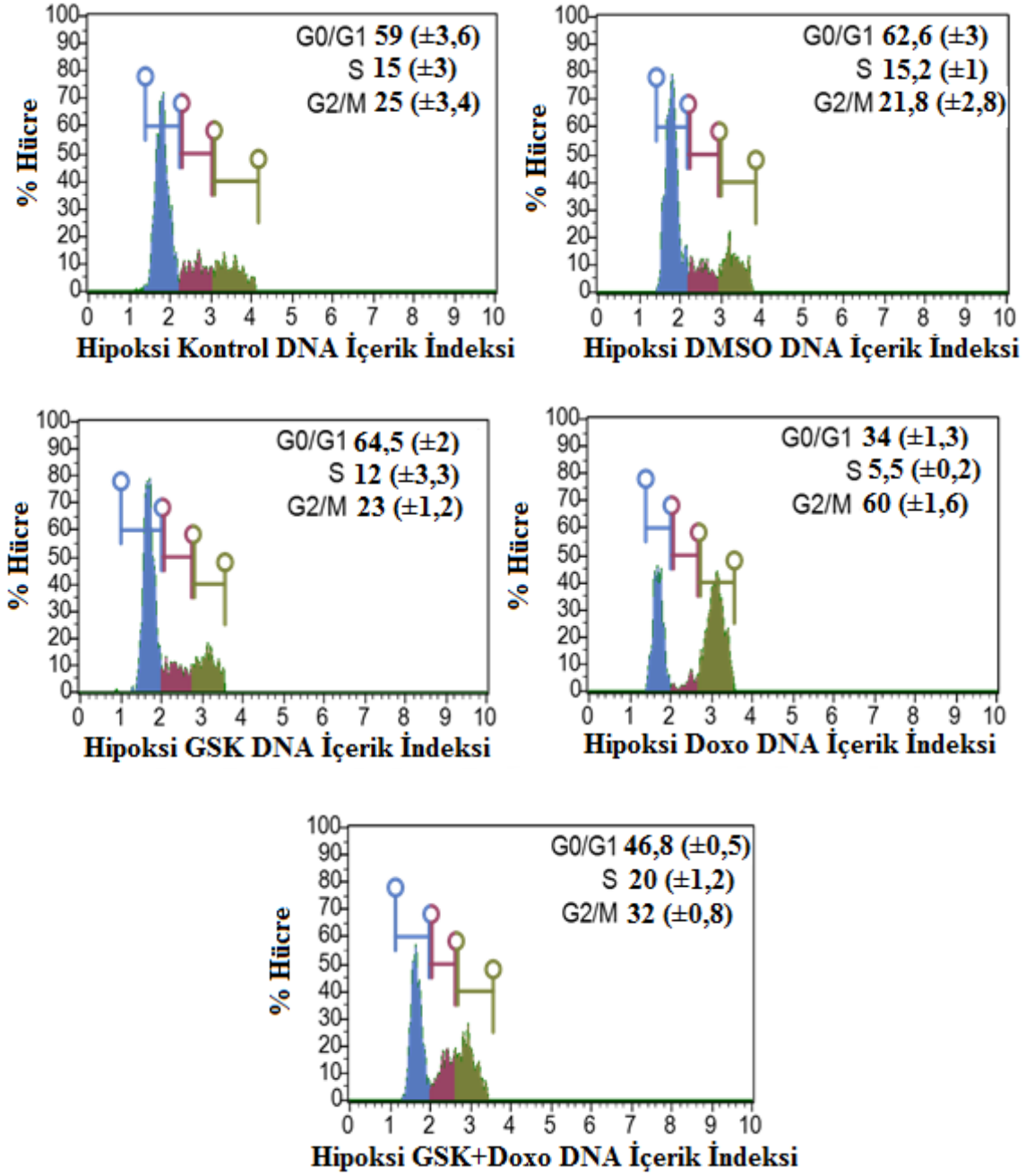
Tablo 26. Hipoksi gruplarının hücre döngüsü faz oranları

Hipoksi Cell Cycle	%G0/G1	%S	%G2/M
Kontrol	59 ($\pm 3,6$)	15 (± 3)	25 ($\pm 3,4$)
DMSO	62,6 (± 3)	15,2 (± 1)	21,8 ($\pm 2,8$)
GSK	64,5 (± 2)	12 ($\pm 3,3$)	23 ($\pm 1,2$)
D0	34 ($\pm 1,3$)	5,5 ($\pm 0,2$)	60 ($\pm 1,6$)
G+D0	46,8 ($\pm 0,5$)	20 ($\pm 1,2$)	32 ($\pm 0,8$)

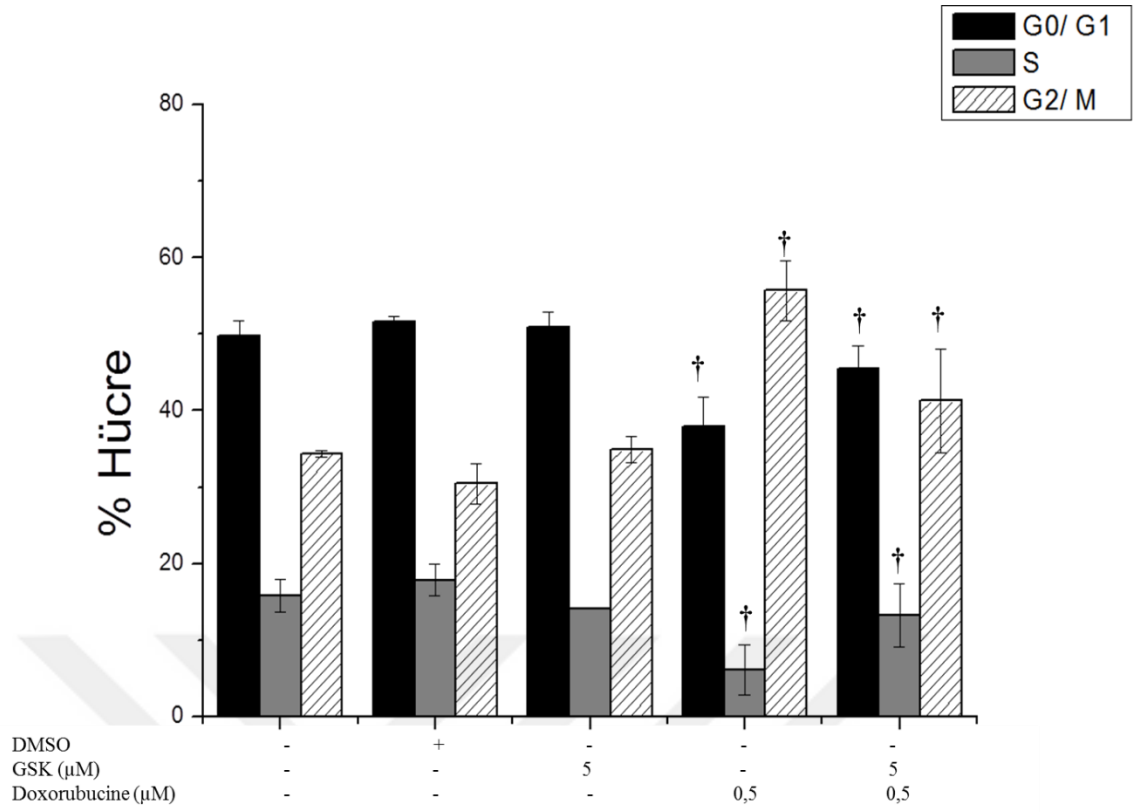
Hipoksi koşullarında da ise hipoksinin etkisiyle kontrol grubu hücrelerde normoksi kontrol grubu ile kıyaslandığında G1 faz oranının yüksek olduğu görülmektedir. DMSO ve GSK uygulanan hücrelerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hipoksi kontrol, DMSO ve GSK hücreleri arasında hücre faz oranları açısından herhangi bir farklılık görülmemiştir. Hipoksi koşullarında tek başına Doxo uygulanan hücrelerde ise normoksiye benzer şekilde G2/M faz oranının diğer gruplara kıyasla oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. GSK+ Doxo uygulanan hücrelerde ise yine G2/M faz oranının Doxo uygulanan hücrelere kıyasla yaklaşık %50 oranında azaldığı ve S fazında belirgin bir artış olduğu görülmektedir (Şekil 38, 39).



Şekil 35. Normoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü histogram profilleri

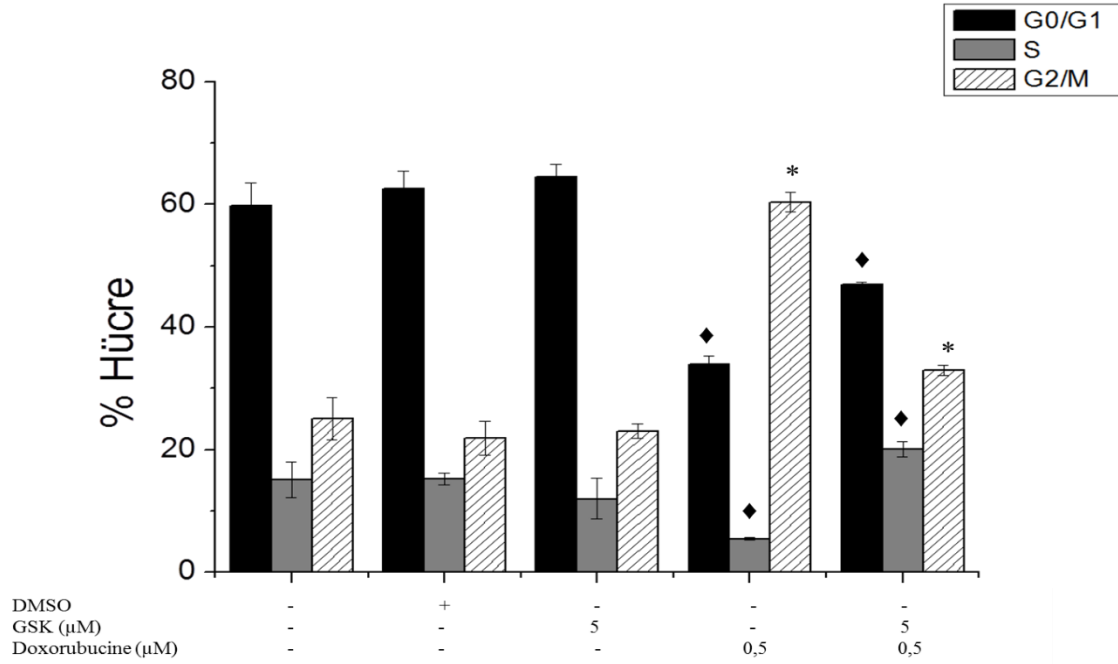


Şekil 36. Hipoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü histogram profilleri



Şekil 37. Normoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü grafiği

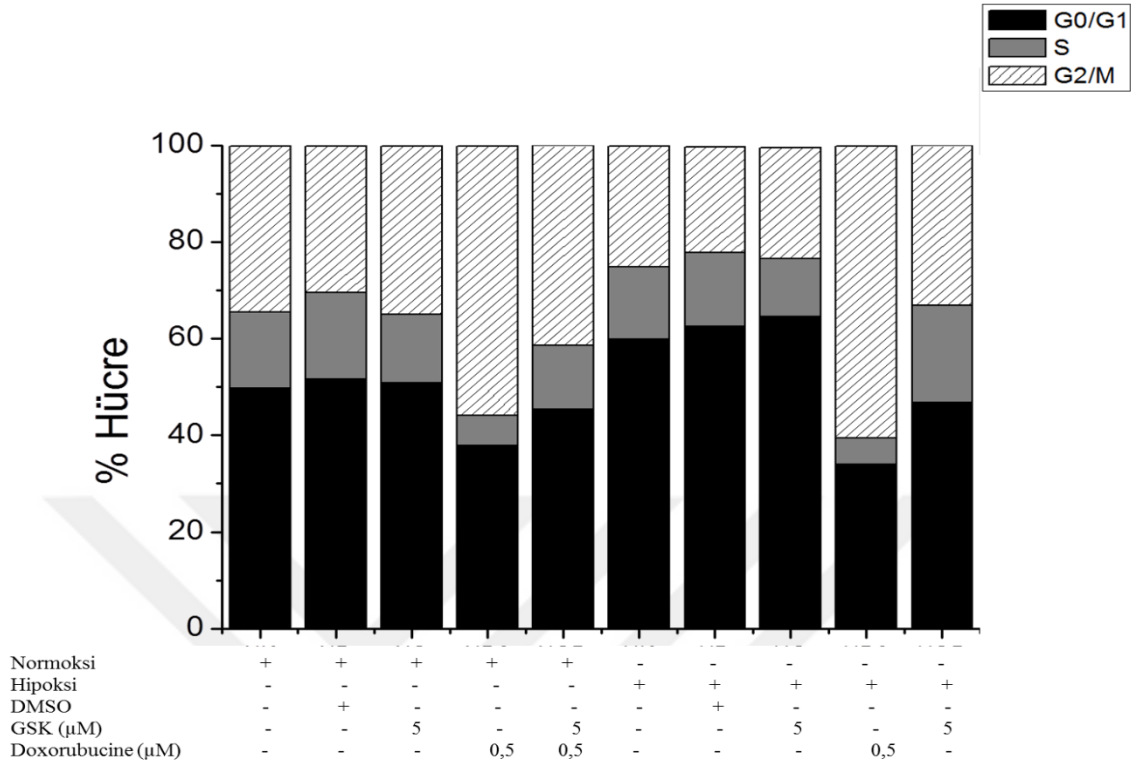
(† : Kontrole kıyasla $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)



Şekil 38. Hipoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü grafiği

(♦ : Kontrole kıyasla $p \leq 0,01$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(* : Kontrole kıyasla $p \leq 0,001$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)



Şekil 39. Normoksik ve hipoksik şartlarda 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü grafiği

4.8.4. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 24 saat Doxorubicine veya GSK2830371 ve Doksorubisin Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde DDR Analizi

MCF-7 hücrelerinin normoksi ve hipokside 24 saat doxo ile tek başına veya GSK2830371 ile birlikte muamelesi sonrasında DNA hasarı cevabının aktive olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla ATM, ATR, Chk1, Chk2, H2AX, p53, BRCA1, p21, p27/Kip1 gibi proteinlerin fosforilasyon ve/veya total protein düzeyleri Western Blot (WB) analiziyle test edilmiştir. Normoksi ve hipokside doxo tek başına veya GSK ile birlikte 24 saatlik inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından MCF-7 hücrelerinden protein izolasyonu yapılarak Bölüm 3.2.8.8.'de anlatıldığı gibi WB analizi gerçekleştirilmiştir. Western Blot analizlerinde endojen kontrol olarak housekeeping gen olan GAPDH proteinini kullanılmıştır.

Normoksi koşullarında tek başına Doxo uygulamasına (1 ve 1,75 μM) cevaben MCF-7 hücrelerinde kontrole kıyasla Wip1 protein düzeyinin arttığı tespit edilirken GSK+

Doxo uygulaması sonucunda Wip1 düzeyinin azaldığı görülmektedir. Benzer şekilde tek başına Doxo uygulamasının total p53 protein düzeyini artırdığı ancak bu koşullarda p53 (Ser 15) fosforilasyonunun gerçekleşmediği görülmektedir. Doxo, Wip1 inhibitörü GSK ile birlikte uygulandığında ise p53'ün Ser 15'ten fosforile olduğu görülmektedir.

Normoksi koşullarında DDR'in kinaz aktivitesine sahip iki temel proteini olan ATM ve ATR'nin total protein düzeyleri test edilmiştir. Şekil 40'da görüldüğü üzere tüm gruplarda total protein düzeyinde herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Her iki proteinin fosforilasyonları ise görsel olarak saptanmamıştır.

Normoksi ve hipoksi koşullarında DDR'in önemli elemanları olan ve aynı zamanda Wip1'in defosforile ettiği hedefleri arasında bulunan Chk1, Chk2, H2AX proteinlerinin de fosforilasyon düzeyleri WB analizi ile test edilmiştir. Şekil 40'da görüldüğü üzere normoksi de özellikle Doxo tek başına (1 ve 1,75 μ M) veya GSK+Doxo (G+D1 ve G+D2) gruplarında Chk1'in fosforilasyon (Ser345) düzeyinde kontrole kıyasla artış gözlemlenmiştir. Normoksi de tek başına Doxo uygulamasına cevaben Chk2 fosforilasyonu (Thr68) görülmezken GSK+Doxo gruplarında Chk2'nin fosforilasyonu tespit edilmiştir. Total Chk2 protein düzeyinde normokside DMSO grubuna kıyasla Doxo veya GSK + Doxo gruplarında da birbirine yakın düzeyde olduğu görülmektedir (Şekil 40).

Bunun dışında hem normoksi hem de hipokside Doxo tek başına veya GSK + Doxo uygulanan gruplarında BRCA-1'in fosforilasyon düzeyi (Ser1524) test edilmiştir. BRCA1 esasen çift sarmal DNA kırılarının onarımında, yanlış eşleşme hatalarının onarımında ve hatta NHEJ onarım sisteminde görev alan bir onarım proteinidir ve meme kanseri duyarlılık proteini olarak da bilinir (Isobe ve ark, 2017). BRCA1 aslında Wip1'in defosforile ettiği bilinen hedeflerinden birisi değildir. Normokside K ve D grubuna kıyasla Doxo tek başına veya GSK+Doxo uygulanan gruplarda BRCA1 fosforilasyonunda artış olduğu görülmektedir (Şekil 40).

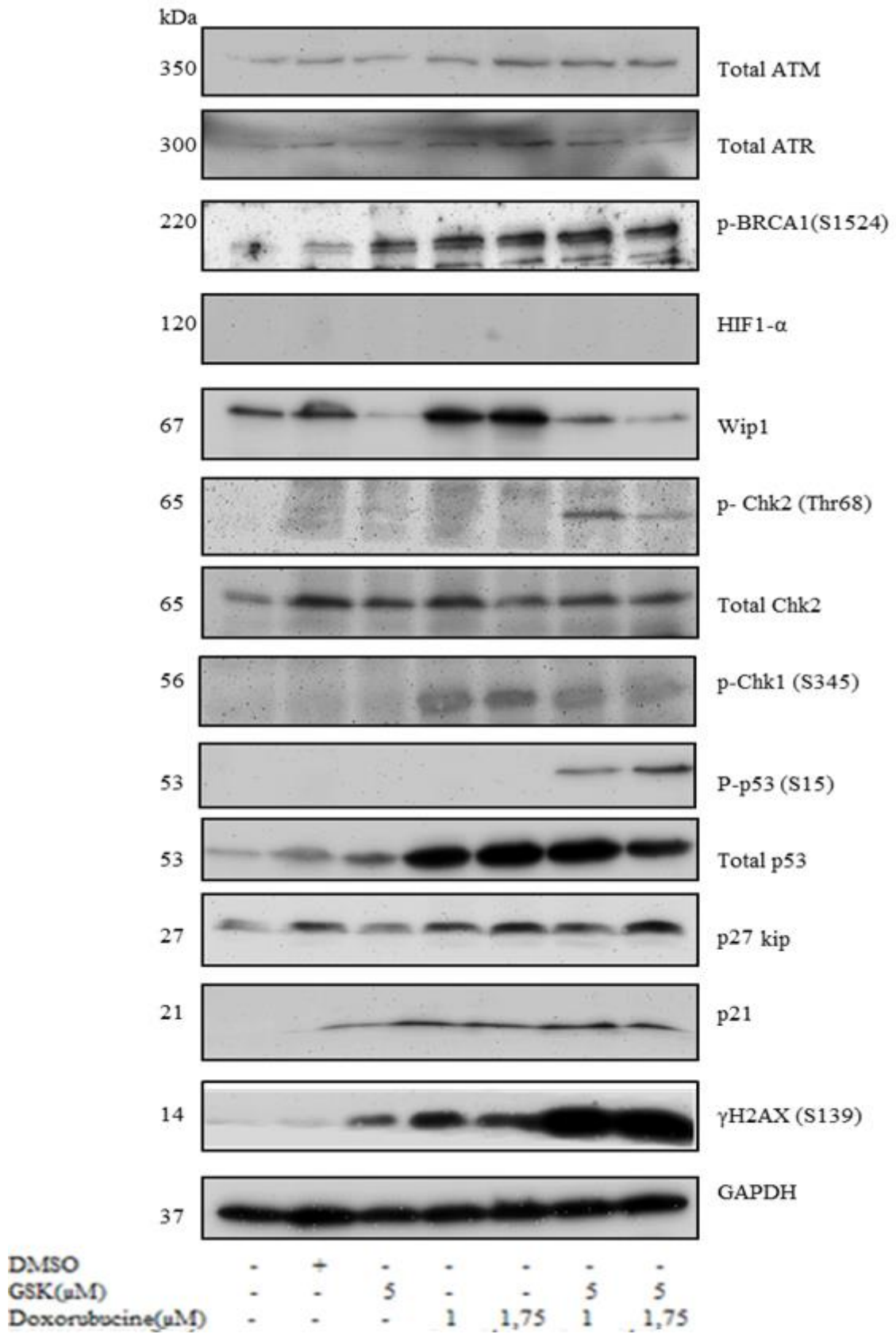
DDR'in aktivasyonunda önemli sensör proteinlerden olan γ -H2AX (Ser139) fosforilasyon düzeyi normoksi de K ve DMSO gruplarında oldukça düşük düzeyde iken GSK, Doxo veya GSK+Doxo gruplarında kontrole kıyasla artış olduğu görülmüştür. Normokside en yüksek seviye de fosforilasyonun GSK+Doxo uygulanan grupta olduğu görülmektedir.

DDR'in aktivasyonu sonucunda hücre döngüsünün durdurulmasında önemli rol oynayan p27/ Kip1 ve p21/Cip total protein düzeyleri de normokside WB analiziyle test edilmiştir. Şekil 40'da görüldüğü üzere p21 protein düzeyinde normoksi de DMSO grubuna

kıyasla diğ er grupların tümünde (Doxo veya GSK+Doxo) bir artış olduğu görülmektedir. p27/Kip1 protein düzeyinde ise DMSO grubuna kıyasla ve endojen kontrole göre tüm gruplarda herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir (şekil 40).



NORMOKSİ



Şekil 40. Normoksik şartlarda 24 saat inkübe edilen hücrelerde DDR aktivasyonu

Hipoksi koşulunda ise öncelikle HIF-1 α proteininin stabilizasyonu WB analizi ile test edilerek hipoksi ortamının doğruluğu sağlanmıştır. Şekil 41’de görüldüğü üzere normoksi koşullarında WB analiziyle HIF-1 α proteini tespit edilemezken hipoksi koşullarında protein olarak varlığının gösterilmesi ile stabilize olduğu tespit edilmiştir. Hipoksi koşullarında tüm deney grupları karşılaştırıldığında HIF-1 α protein düzeyi açısından gruplar arasında herhangi bir fark olmadığı görülmüştür. Hipoksi koşullarında Wip1 protein düzeyinde ise normoksiye benzer şekilde doxo uygulanan deney gruplarında kontrole göre protein düzeyinde bir artış tespit edilirken, GSK uygulaması ile Wip1 protein düzeyinin tamamen azaldığı bulunmuştur (Şekil 41). Böylece Wip1 inhibitörü GSK her iki koşulda da Wip1 proteinini inhibe edebildiği gösterilmiştir. Hipoksi koşulunda yine normoksiye benzer şekilde özellikle Doxo uygulaması sonucunda kontrole kıyasla p53 protein düzeyinde artış olduğu ancak fosforile olamadığı görülürken GSK+Doxo uygulaması sonucunda Wip1 inhibisyonu ile p53’ün Ser 15’ten fosforile olabildiği görülmektedir. Bununla beraber total p53 protein düzeyi açısından hipoksi ve normoksi koşulları arasında bir farklılık görülmemiştir (Şekil 40, 41).

Hipoksi koşullarında da ATM ve ATR total protein düzeyleri test edilmiştir. Şekil 41’de görüldüğü üzere K, D ve GSK gruplarına kıyasla Doxo veya GSK + Doxo uygulanan gruplarda hem ATM hem de ATR total protein düzeyinde bir artış olduğu saptanmamıştır. Hipokside de her iki proteinin fosforilasyonları görsel olarak saptanamamıştır (Şekil 41).

Hipoksi koşullarında DDR’in önemli elemanları olan ve aynı zamanda Wip1’in defosforile ettiği hedefleri arasında bulunan Chk1, Chk2, H2AX proteinlerinin de fosforilasyon düzeyleri WB analizi ile test edilmiştir. Şekil 41’de görüldüğü üzere özellikle hipokside, Doxo tek başına ve GSK + Doxo uygulanan gruplarda Chk1 fosforilasyonu oldukça düşük oranda iken Chk2 fosforilasyonu aynı gruplar kontrolle kıyaslandığında bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 41).

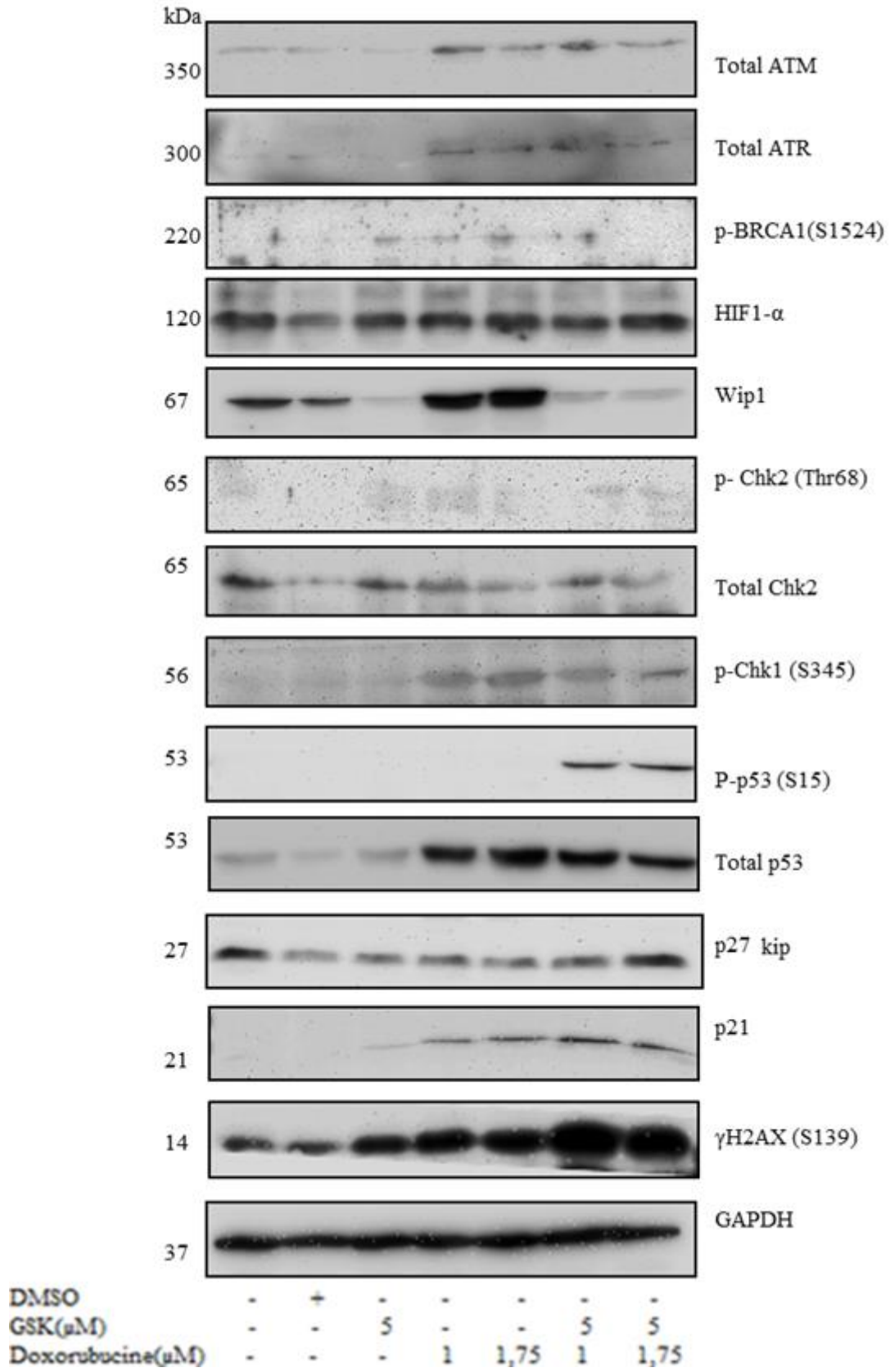
Hipokside de genel olarak K ve D gruplarına kıyasla Doxo uygulamasıyla γ -H2AX’in fosforile olduğu görülürken GSK+Doxo uygulanan gruplarında fosforilasyon düzeyinin oldukça artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 41).

Şekil 41’de görüldüğü üzere BRCA1 fosforilasyonunun WB analizi hipokside de gerçekleştirilmiştir. BRCA1 fosforilasyon düzeyinde normoksi ve hipoksi koşullarında belirgin bir fark olduğu görülmektedir. BRCA1 için hipoksik şartlarda fosforile olan protein miktarı normoksiye kıyasla, görsel olarak düşük düzeyde tespit edilmiştir.

Hipoksi koşullarında da döngüsünün durdurulmasında önemli rol oynayan p27/ Kip1 ve p21/ Cip total protein düzeyleri WB analiziyle test edilmiştir. Şekil 41’de görüldüğü üzere p21 protein düzeyinde hipokside de DMSO grubuna kıyasla diğer gruplarda (Doxo veya GSK+Doxo) artış olduğu görölmektedir. P27/ Kip1 protein düzeyinde ise hipokside DMSO grubuna kıyasla ve endojen kontrole göre tüm gruplarda herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. (Şekil 41).



HIPOKSI



Şekil 41. Hipoksik şartlarda 24 saat inkübe edilen hücrelerin DDR aktivasyonu

4.8.5. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında 72 saat Doxorubicine veya GSK2830371 ve Doksorubisin Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde DDR Analizi

MCF-7 hücrelerinin normoksi ve hipokside 72 saat doxo ile tek başına veya GSK ile birlikte muamelesi sonrasında özellikle senesensin aktivasyonunda DNA hasarı cevabının aracı olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla ATM, ATR, Chk1, Chk2, H2AX, p53, BRCA1, p21, p27/Kip1 gibi proteinlerin fosforilasyon ve/veya total protein düzeyleri Western Blot analiziyle test edilmiştir. Normoksi ve hipokside doxo tek başına veya GSK ile birlikte 72 saatlik inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından MCF-7 hücrelerinden protein izolasyonu yapılarak Bölüm 3.2.8.8’de anlatıldığı gibi Western Blot analizi gerçekleştirilmiştir. Western Blot analizlerinde endojen kontrol olarak housekeeping gen olan GAPDH proteinini kullanılmıştır.

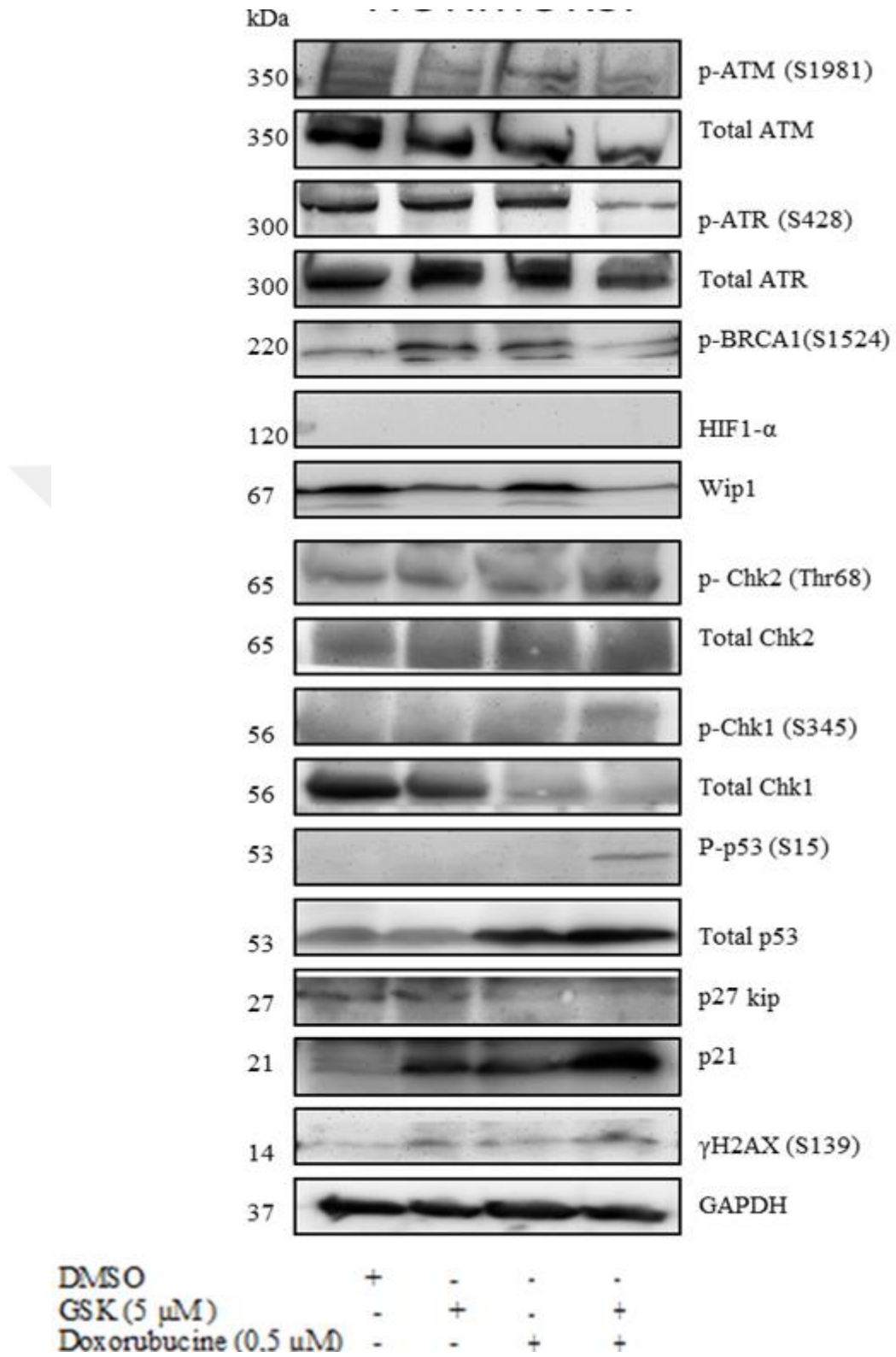
Normoksi koşullarında senesens indüksiyonu için kullanılan tek başına Doxo uygulamasına cevaben MCF-7 hücrelerinde kontrole kıyasla Wip1 protein düzeyinin arttığı tespit edilirken GSK+ Doxo uygulaması sonucunda Wip1 düzeyinin azaldığı görülmektedir. Benzer şekilde tek başına Doxo ve GSK+Doxo uygulamasının total p53 protein düzeyini artırdığı ancak bu koşullarda p53 (Ser 15) fosforilasyonunun gerçekleşmediği görülmektedir. Doxo, Wip1 inhibitörü GSK ile birlikte uygulandığında ise p53’ün Ser 15’ten fosforile olduğu görülmektedir. Normoksi koşullarında DDR’ın önemli elemanlarından olan ve aynı zamanda Wip1’in defosforile ettiği hedefleri arasında bulunan Chk1, Chk2, γ -H2AX proteinlerinin de fosforilasyon düzeyleri WB analizi ile test edilmiştir. Şekil 42’de görüldüğü üzere normokside özellikle total Chk1 miktarında Doxo tek başına (D) veya GSK + Doxo (G+D) gruplarında kontrole kıyasla bir azalma görülse de GSK + Doxo grubunda Chk1’in fosforilasyon (Ser345) düzeyinde kontrole kıyasla artış görülmektedir. Normokside tek başına Doxo uygulamasına cevaben Chk2 fosforilasyonu (Thr68) görülmezken GSK + Doxo (G+D1 ve G+D2) gruplarında Chk2’nin fosforile olduğu tespit edilmiştir. Total Chk2 protein düzeyinde ise herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 42).

Normokside total ATR ve total ATM protein düzeylerinde tek başına Doxo veya GSK+Doxo uygulamasıyla endojen kontrole kıyasla herhangi bir değişiklik olmadığı görülürken bu proteinlerin tüm gruplarda fosforile oldukları ve genel olarak fosforilasyon düzeylerinde Doxo veya GSK+ Doxo uygulamasıyla endojen kontrole kıyasla herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 42).

Bunun dışında hem normoksi hem de hipokside Doxo tek başına veya GSK + Doxo gruplarında BRCA1'in fosforilasyon düzeyi (Ser1524) test edilmiştir (Şekil 42, 43). Şekil 42'de görüldüğü üzere normokside senesens indüksiyonu sırasında BRCA1'in fosforilasyon düzeyinde tek başına GSK, Doxo veya GSK+Doxo gruplarında artış görülmektedir.

DDR'in aktivasyonunda bir diğer önemli protein olan γ -H2AX (Ser139) fosforilasyon düzeyinin normokside tüm gruplarda oldukça düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Senesensin indüksiyonu sırasında ve DDR'in aktivasyonu sonucunda hücre döngüsünün durdurulmasında önemli rol oynayan p27/ Kip1 ve p21/Cip total protein düzeyleri de WB analiziyle test edilmiştir. Şekil 42'de görüldüğü üzere p21 protein düzeyinde normokside GSK, Doxo veya GSK+ Doxo gruplarında DMSO'ya göre artış görülmektedir. GSK+ Doxo grubunda ise bu artışın diğerlerine göre en yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. p27/ Kip1 protein düzeyinde ise normoksi de DMSO grubuna kıyasla ve endojen kontrole göre tüm gruplarda herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. (Şekil 42).

NORMOKSİ



Şekil 42. Normoksik şartlarda 72 saat inkübe edilen hücrelerin DDR yanıtı

Senesens indüksiyonu sırasında hipoksi koşulunda ise öncelikle HIF-1 α proteininin stabilizasyonu WB analizi ile test edilerek hipoksi ortamının doğruluğu sağlanmıştır. Şekil 43'de görüldüğü üzere hipoksi koşullarında HIF-1 α 'nın protein olarak varlığının gösterilmesi ile stabilize olduğu tespit edilmiştir. Hipoksi koşullarında tüm deney grupları karşılaştırıldığında ise 72 saat GSK veya GSK+ Doxo uygulamasıyla HIF-1 α protein düzeyinde bir azalma olduğu görülmektedir (Şekil 43). Hipoksi koşullarında Wip1 protein düzeyinde ise normoksiye benzer şekilde doxorubicin uygulanan deney gruplarında kontrole göre protein düzeyinde bir artış tespit edilirken GSK uygulaması ile Wip1 protein düzeyinin tamamen azaldığı bulunmuştur (Şekil 43). Böylece Wip1 inhibitörü GSK2830371'nin her iki koşulda da Wip1 proteinini inhibe edebildiği gösterilmiştir. Hipoksi koşulunda yine normoksiye benzer şekilde özellikle Doxo uygulaması sonucunda kontrole kıyasla total p53 protein düzeyinde artış olduğu ancak fosforile olamadığı görülürken, GSK+Doxo uygulaması sonucunda Wip1 inhibisyonuyla p53'ün Ser 15'ten fosforile olabildiği görülmektedir (Şekil 43).

Hipoksida total ATM ve ATR protein düzeyleri incelendiğinde ise total ATM protein düzeyi açısından gruplar arasında herhangi bir fark tespit edilmezken, GSK+Doxo uygulamasıyla total ATR protein düzeyinde artış olduğu görülmektedir. Hipoksida bu proteinlerin DMSO hariç tüm gruplarda fosforile oldukları ve genel olarak fosforilasyon düzeylerinde GSK+ Doxo uygulamasıyla endojen kontrole kıyasla en yüksek artışın gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 43).

Hipoksida senesens indüksiyonu sırasında Chk1 ve Chk2 proteinleri incelendiğinde ise bu proteinlerin hem total protein hem de fosforilasyon düzeylerinde tüm gruplarda birbirine yakın düzeyde olduğu ve aralarında belirgin bir fark olmadığı görülmektedir (Şekil 43).

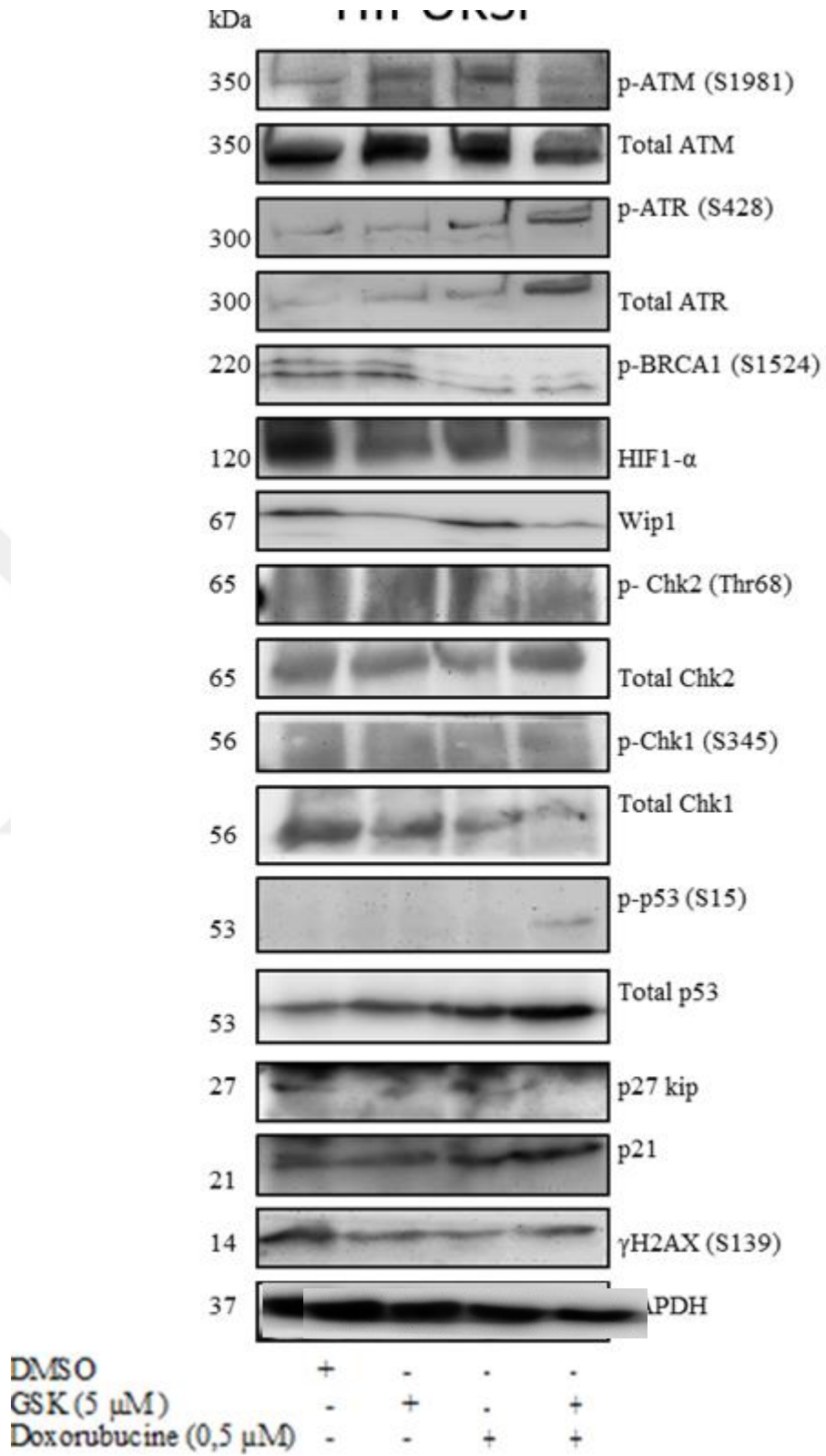
Bunun dışında senesens indüksiyonu sırasında hipoksi BRCA-1'in fosforilasyon düzeyi (Ser1524) test edilmiştir. Şekil 43'de görüldüğü üzere hipoksi de senesens indüksiyonu sırasında BRCA1'in fosforilasyon düzeyinde tek başına Doxo veya GSK+Doxo gruplarında DMSO veya tek başına GSK grubuna göre bir azalma olduğu görülmektedir (Şekil 43).

Hipoksida γ -H2AX'in fosforilasyon düzeyi incelendiğinde ise endojen kontrole kıyasla GSK+Doxo uygulamasıyla fosforilasyon düzeyinde az da olsa bir artış olduğu görülmektedir (Şekil 43).

Hipokside senesensin indüksiyonu sırasında DDR'ın aktivasyonu sonucunda hücre döngüsünün durdurulmasında önemli rol oynayan p27/ Kip1 ve p21/Cip total protein düzeyleri de WB analiziyle test edilmiştir. P27/Kip1 protein düzeyinde DMSO grubuna kıyasla ve endojen kontrole göre tüm gruplarda herhangi bir değişiklik tespit edilmezken p21 protein düzeyinde normokside Doxo veya GSK+ Doxo gruplarında DMSO'ya göre artış olduğu, GSK+Doxo grubunda ise bu artışın Doxo'ya göre yüksek düzeyde olduğu görülmektedir (Şekil 43).



HIPOKSİ



Şekil 43. Hipoksik şartlarda 72 saat inkübe edilen hücrelerin DDR yanıtı

5. TARTIŞMA

Solid tümörlerin hemen hemen hepsinde görülen bir karakteristik olan tümör hipoksisi, kanser tedavisine cevabın yetersiz ya da zayıf olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Tümör hücrelerinin aşırı proliferasyonu hücreleri damarlardan uzaklaştırır ve böylece kan dolaşımının yeterince olmadığı bu alanda besin ve oksijen yetersizliği görülmeye başlar. Böyle bir oksijen yetersizliği (hipoksi) hem normal hücrelerde hem de neoplastik hücrelerde sonunda hipoksiye bağlı olarak indüklenen majör transkripsiyon faktörü HIF-1 α 'ın aktivasyonu indükler. HIF-1 α ise tümör hücrelerinin hayatta kalmalarını, tedaviye direnç kazanmaları ve besin olmayan bu alandan kaçmak için kullanılacak olan oldukça geniş panelde genlerin transkripsiyonunu sağlayarak kanser hücrelerinin hipoksik ortama adaptasyonunu ve hayatta kalmalarını sağlar (Semenza, 2003, 2012). Özellikle anjiyogenik faktörler (örn. vasküler endotelial büyüme faktörü VEGF), diğer büyüme faktörleri (insulin-like büyüme-faktörü-II, IGF-II) ve glikolitik enzimler, (AldolazA/C gibi), antiapoptotik proteinler (örn. Bcl-2) gibi çok sayıda genin transkripsiyonunu sağlar (Kilic ve ark, 2007; Semenza, 2003, 2012). Böylece HIF-1 solid tümörleri anjiyogenezi teşvik ederek, büyüme faktörlerinin ifadesini artırarak, apoptozisi önleyerek ve anaerobik metabolizmayı artırarak hipoksiye karşı korumaktadır. Tümör hipoksisinin insan kanserlerinde kötü prognoz ve radyoterapi ve kemoterapiye karşı dirençle korelasyon gösterdiği ve apoptozis üzerindeki negatif etkileri de bilinmektedir (Kilic ve ark, 2007; Semenza, 2015).

Hipoksi aynı zamanda DNA hasarı cevabı ve onarımıyla ilgili çok sayıda genin transkripsiyon ve translasyonunu değiştirmekte ve böylelikle DNA onarımını da inhibe etmektedir. Hipoksik tümörlerde, onkogen amplifikasyonu, DNA replikasyon stresi ve regülasyonu bozulmuş DNA hasarı cevabı sinyalleşmesi, bu hücrelerin hücre ölümünden kaçma yeteneğiyle birlikte hasarlı DNA'yla prolifer olmalarına ve daha da fazla mutasyon kazanmalarına neden olmaktadır (Kaplan ve Glazer, 2019).

Hipoksik tümörlerde DNA hasarı yaratan ajanların normoksiye göre daha az etkili olduğu bilinmektedir (Kaplan ve Glazer, 2019). Ancak bu durumun DNA hasarı cevabının regülasyonu ile ilişkili olup olmadığı konusunda literatürde yeterince çalışma bulunmamaktadır.

Ökaryotik hücreler herhangi bir DNA hasarı saptandığında genomik bütünlüğün sürdürülmesi için hücre döngüsü kontrol noktalarını ve DNA onarım yollarını aktive eden için korunmuş bir DNA hasarı yanıtı (DNA Damage Response (DDR)) bulunur. Hücre

döngüsünün G1 / S, intra-S ve G2 / M kontrol noktalarına sırasıyla ATM / ATR ve kontrol noktası kinazları 2 ve 1 (CHK2) / (CHK1) aracılık etmektedir. Bu kinazlar, hücre döngüsü ilerlemesini önlemek, DNA tamirini veya programlanmış hücre ölümü veya hücre senesensi başlatmak için sinyalleri efektör moleküllerin en önemlisi p53'e iletirler. p53'ün etkinleştirilmesi, DNA hasarının tamiri hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozu başlatarak hücrelerin kanser gelişimine karşı korunmasına yardımcı olur (Elshamy, 2010; Le Guezennec ve Bulavin, 2010; Lowe ve ark, 2012; Zhu ve Bulavin, 2012). Böylelikle DDR esasen bir tümör baskılayıcı bariyer görevi görmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise p53'ün ATM/ATR kinazlarca başlatılan aktivasyonunu kapatmada p53'ü defosforile etmek yoluyla rol oynayan Wip1 fosfatazın öne çıktığı görülmektedir. Wip1 protein fosfotaz 2C (PP2C) ailesinin üyesi bir serin/threonin fosfatazdır. *PPM1D*/Wip1 özellikle genotoksik stresle p53'e bağlı olarak indüklenen bir genidir. Bununla birlikte Wip1 aktive olduğunda p53'ü ya direkt defosforile ederek ya da MDM2'yi defosforile etmek yoluyla inaktive etmekte ve böylece geri-bildirim inhibisyonu sağlamaktadır (Elshamy, 2010; Le Guezennec ve Bulavin, 2010; Lowe ve ark, 2012; Zhu ve Bulavin, 2012). Wip1 fosfataz, DNA hasar cevabında ve kontrol noktalarındaki görev alan diğer önemli proteinleri de defosforile ederek DNA hasar tamiri sonrasında hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu proteinler arasında ATM, ATR, Chk1, Chk2, Mdm2, Mdm4 ve p38-MAPK gibi proteinler yer almaktadır (Elshamy, 2010). Aynı zamanda DNA hasarının algılanmasını ve onarılmasını sağlayan γ -H2AX, XPA, XPC ve UNG2 gibi proteinlerde hedefleri arasındadır. Wip1 tüm bu hedeflerini defosforile ederek homolog rekombinasyon onarımı (HR), homolog olmayan uç birleştirme aracılı onarım (NHEJ) ve nükleotid eksizyon tamiri ve baz eksizyon tamirlerini (BER) doğrudan veya dolaylı olarak baskılamaktadır (Emelyanov ve Bulavin, 2015).

Wip1'in meme, akciğer, pankreatik ve kolon kanserleri gibi solid tümörler de aşırı ifade edildiği, amplifiye olduğu, mutasyona uğradığı dolayısıyla onkogen özellik kazandığı bilinmektedir. Wip1'in regülasyonu bozulmuş ve sürekli ifade edilmeye başlanmışsa ATM/ATR aracılı DNA hasarı cevabını ve p53'e bağlı tümör süpresör cevapları (apoptoz, senesens ve hücre döngüsünün tutuklanması gibi) negatif yönlü olarak regüle ederken tümörogenezi teşvik edebilmektedir (Lowe ve ark, 2012). Regülasyonu bozulmuş olan onkogenik Wip1 aynı zamanda kanserlerde kemoterapiye cevabı azaltmakta ve bu nedenle yapılan son çalışmalar Wip1'i kanserde teröpatik bir hedef haline getirmektedir. Wip1'in genetik ya da farmakolojik inhibitörlerle hedeflenmesi antikanser terapisi açısından rolünün

ortaya çıkarılması önem arz etmektedir. Bu bağlamda son yıllarda farklı insan kanser türlerinde Wip1'in hedeflenmesine yönelik olarak çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Kong ve ark, 2009; Lowe ve ark, 2012; Parssinen ve ark, 2008; Pechackova ve ark, 2016). Ancak Wip1'in hedef alındığı çalışmalarda solid tümörlerin karakteristiği olan, kemoterapi ve radyoterapiye dirençte önemli rol oynayan tümör hipoksisinin değerlendirilmediği ve göz ardı edildiği de görülmektedir.

Tümör hipoksisi, tedaviyi olumsuz etkilediği ve kötü huylu ilerlemeyi tetiklediği için kanser terapilerinde zararlı bir faktör olarak giderek daha fazla tanınmaktadır. Esasen normal dokularda oksijen seviyesi %5 ila %7.4 arasında değişmekte ve genel ortalama olarak fizyolojik oksijen seviyesi (fizoksi) %5 civarında bulunmaktadır. Dolayısıyla bir çok *in vitro* çalışma da normoksi olarak nitelenen ve %20 oksijen seviyesine sahip koşullar fizoksi ile karşılaştırılabilir düzeyde değildir. Bir çok tedavi edilmemiş tümörde ise ortalama oksijen seviyesinin normal dokulara göre önemli ölçüde çok daha düşük olduğu, yaklaşık %0,3 ile %4,2 arasında olduğu ve tümörlerin çoğunun oksijen seviyesinin ortalama seviyelerinin altında ve %2'den daha az olduğu bilinmektedir. Bu durum kısmen tümörün köken aldığı dokuya da bağlı olarak daha düşük seviyelere ve anoksiye kadar da inebilmektedir (McKeown, 2014).

Dolayısıyla oksijen seviyesinin normal dokularda yaklaşık %5 ve tümörlerdeki ise yaklaşık %1 seviyelerinde olduğu görülmektedir. Dolayısıyla normal ve tümör dokularda fizyolojik oksijen seviyelerinin dikkate alınmayan çalışmalar, tümörün tedaviye ve/veya malign ilerlemeye yanıt vermesini sağlayan gerçek koşulları tanımlayamayabilir. İnsan tümörleriyle yapılan özellikle *in vitro* antikanser terapisi çalışmalarında bu durum özellikle önemli olabilir.

Bu nedenle yapılan bu tez çalışmasında Wip1 fosfatazı aşırı ifade ettiği bilinen meme kanseri hücre dizisi MCF-7 kullanılarak şimdiye kadar yapılan *in vitro* çalışmaları temsilen normoksi (%20 O₂) koşulları ve bugüne kadar değerlendirilmeyen hipoksi koşullarının (tümör hipoksisini temsilen %1 O₂) karşılaştırılması amaçlanmıştır. Her iki koşulda da Wip1'in allosterik inhibitör GSK ile baskılanması sonucunda DNA hasarı yaratan kemoterapötik ajan doksorubisine cevaben, DNA hasarı cevabının aktivasyonu ve buna bağlı olarak ortaya çıkan hücresel yanıtların (hücre döngüsü, apoptozis ve senesens) analizi gerçekleştirilmiştir. Böylece Wip'in baskılanmasının hipoksik tümörlerde anti-kanser ilaç tedavisine etkileri ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma bu konuda yapılan kapsamlı ilk çalışma olup bu konuda literatüre yapacağı katkılar açısından da önem taşımaktadır.

Yapılan analizler sonucunda elde edilen tüm veriler ayrıntılı olarak aşağıda başlıklar altında tartışılmıştır ve buna bağlı olarak çeşitli öneriler sunulmuştur.

5.1. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında MCF-7 Hücrelerinde Wip1 Düzeyi

PPM1D genini taşıyan kromozomal lokus 17q23 genellikle meme, yumurtalık ve mide kanseri, nöroblastom ve akciğer adenokarsinomu dahil olmak üzere çeşitli insan tümörlerinde amplifiye olduğu ve mutasyonlara sahip olduğu ve böylece onkogenik karakter kazandığı bilinmektedir (Pechackova ve ark, 2016). Yapılan bu tez çalışmasında onkogenik Wip1'e sahip olduğu bilinen meme kanser hücre dizisi MCF-7 kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerinde *PPM1D* geninin yaklaşık olarak 20 kopya taşıdığı ve böylelikle Wip1 fosfataz proteinini aşırı ifade ettiği gösterilmiştir (Kong ve ark, 2009). Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalarda MCF-7'de *PPM1D* geninin aynı zamanda mutasyona sahip olup olmadığı konusunda literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle öncelikle MCF-7 hücrelerinde genomik DNA izole edilerek, *PPM1D* geni ekzonları PCR'la amplifiye edilerek Sanger sekans yöntemiyle analizi yapılmıştır. Bu analizler sonucunda *PPM1D*'de herhangi bir mutasyon olmadığı ilk defa bu çalışmayla gösterilmiştir.

Daha sonra qRT-PCR analiziyle MCF-7 hücrelerinden genomik DNA üzerinden gen kopya sayısı analizi de yapılmıştır. Bu analizde referans olarak Wip1'i normal düzeyde ifade ettiği bilinen normal diploid insan deri fibroblastı olan BJ hücre dizisinden elde edilen genomik DNA kullanılmıştır. Bu analiz sonucunda BJ hücrelerine oranla MCF-7 hücrelerinin Wip1'i gen kopya sayısı ortalama 25 kat daha fazla bulunmuştur. Aynı zamanda MCF-7 hücrelerinde FISH analizi de yapılmıştır. FISH analizi sonucunda kullanılan proba bağlı olarak teknik sebeplerden dolayı hem kontrol sentromerik prob hem de Wip1 probuyla net görüntüler elde edilememiştir. Oldukça pahalı bir analiz olması ve optimizasyonu için bile oldukça fazla materyal gerektirmesi nedeniyle FISH analizinde prob değişikliğine gidilememiştir. Ancak qRT-PCR'la elde edilen gen kopya sayısı analizi sonucu elde edilen veriler literatürde bu konuda var olan verilerle birebir örtüşmektedir ve MCF-7 hücrelerinde *PPM1D* gen kopya sayısı böylelikle doğrulanmıştır.

Hem normoksi hem de hipoksi koşullarında MCF-7 hücrelerinin Wip1'i aşırı ifade ettiğini göstermek amacıyla ise qRT-PCR analiziyle mRNA düzeyinde ve WB analiziyle protein düzeyinde seviyeleri test edilmiştir. qRT-PCR analizinde BJ hücreleri yine referans olarak kullanılmıştır. Gen kopya sayısı analizi sonucuna benzer şekilde MCF-7 hücrelerinin hem normoksi hem de hipoksi koşullarında mRNA düzeyinin BJ'den ortalama 20 kat daha

fazla olduğu doğrulanmıştır. Aynı zamanda MCF-7 hücrelerine 24 saat 1µM Doxo uygulanması sonucunda Wip1'in hem normoksi hem de hipokside mRNA ve protein düzeyinin kontrole kıyasla aşırı artmıştır. Wip1 başlangıçta ifadesi p53'e bağımlı olarak iyonize radyasyonla indüklenen bir gen olarak tanımlanmıştır (Fiscella ve ark. 1997). Ancak daha sonra Wip1'in ifadesinin çeşitli dış kaynaklı, özellikle de genotoksik stres indükleyici (iyonize radyasyon, UV, antikanser ajanları doksorubisin, etoposid veya anisomisin, hidrojen peroksit ve inflamatuvar sitokinler ve benzeri) ajanlarla artmakta olduğu ortaya çıkmıştır (Lu ve ark. 2008). Dolayısıyla bu sonuçlar literatürdeki verilerle uyumlu olup wt p53'e sahip MCF-7 hücrelerinde Wip1'in doksorubisin ile muamesi sonucunda genotoksik strese bağlı olarak indüklenebildiğini de göstermektedir.

5.2. MCF-7 Hücrelerinde Normoksi ve Hipokside Wip1'in GSK2830371 Tarafından İnhibisyonu

Spesifik bir Wip1 antagonisti olan küçük molekül GSK2830371 (GSK) allosterik bir inhibitör olarak etkisini ve spesifikliğini proteinin flap alt bölgesine bağlanarak fosfataz aktivitesini inhibe ederek göstermektedir (Gilmartin ve ark, 2014; Richter ve ark, 2015). Yapılan bu tez çalışmasında Wip1 proteininin aşırı ekspresyonuna sahip olan MCF-7 hücrelerinde GSK, onkogenik Wip1'in etkilerini hem normoksi hem de hipoksi koşullarında baskılamak amacıyla kullanılmıştır. Öncelikle çalışma da kullanılmış olan hipoksi koşullarının doğrulanması için HIF-1α'nın WB analiziyle protein olarak tespiti yapılmıştır. Hipoksi koşulları Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı gibi sağlanmıştır. HIF-1α'nın kimyasal indükleyicisi olarak bilinen CoCl₂ ile muamele edilen MCF-7 hücreleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan WB analizi sonucunda CoCl₂ ile muamele edilen ve hipoksi chamber'ında 24 saat inkübe edilen hücrelerde HIF-1α proteininin stabilize olduğu görülmektedir. Normoksida çok hızlı degradasyona uğradığı için HIF-1α protein olarak görüntülenememiştir (Şekil 40, 42). Elde edilen bu sonuçlar hipoksi koşullarının doğruluğunu teyit etmiştir.

Aynı zamanda 24 saat 2,5 ve 5 µM GSK ile inkübe edilen MCF-7 hücreleriyle yapılan WB analizi sonucunda hem normoksi hem de hipoksi koşullarında Wip1'in kontrol grubuna kıyasla protein düzeyinde azalma olduğu görülmektedir. Bu GSK konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerinde Doxo uygulamasıyla indüklenerek artan Wip1'i de hem normoksi hem de hipoksi de baskılamakta etkili oldukları gösterilmiştir. Literatürde

GSK ile yapılan çalışmalarda da çeşitli hücre dizilerinde genellikle 0,5-20 μ M aralığında Wip1'in hem protein düzeyi hem de fosfataz aktivitesi açısından baskılanarak inhibe edildiği görülmektedir. Pechakova ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışma da kontrol olarak kullanılan MCF-7 hücrelerinde 0,5 μ M 7 gün süreyle uygulanan GSK tarafından Wip1'in protein düzeyinin yüksek oranda azaldığı ve baskılandığı görülmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında ise 5 μ M GSK ile daha kısa bir süre de (24 saat) etkili sonuç alındığı görülmektedir. Bu konsantrasyonda tek başına GSK uygulamasının MCF-7 hücre proliferasyonunu durdurucu ya da hücre ölümünü indükleyici herhangi bir etkisi etkisi görülmemiştir.

Bu çalışmada ayrıca GSK'nın Wip1'i sadece protein düzeyde baskılanmadığı aynı zamanda fosfataz aktivitesinin de baskılandığı görülmektedir. Wip1'in fosfataz aktivitesinin en temel hedeflerinden birisi p53'ün Ser 15'ten fosforilasyonudur. GSK yokluğunda Doxo ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde p53 Ser15 fosforilasyonu görülmezken, GSK+Doxo uygulamasıyla bu fosforilasyonun görülmesi GSK'nın Wip1'in fosfataz aktivitesini baskıladığının kanıtlarından birisidir. Benzer durum Wip1'in diğer hedeflerinden olan H2A.X fosforilasyonunda da görülmektedir. GSK+Doxo uygulamasıyla, H2A.X fosforilasyonun en yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu tez çalışması kapsamında elde edilen verilerle MCF-7 hücrelerinde GSK'nın Wip1'i hem protein düzeyinde azaltarak hem de fosfataz aktivitesini baskılayarak hedeflediği açıkça gösterilmiştir. Elde edilen bu verilerin literatürde GSK ve MCF-7 hücre dizisi ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görünmektedir (Pechackova ve ark, 2016).

5.3. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında GSK2830371 ve Doksorubisine Uygulamasının MCF-7 Hücreleri Üzerinde Etkileri

Onkogenik Wip1 fosfataza sahip olan MCF-7 hücrelerinde Wip1 fosfatazın baskılanması sonucunda hem normoksi hem de hipoksi koşullarında DNA hasarı cevabı ve buna bağlı olarak indüklenen hücre döngüsünün durudurulması, apoptozis ve senesens gibi hücrel stres cevaplarının analizi için DNA hasarı cevabının aktivasyonunu sağlayacak bir anti-kanser ajanı olan Doksorubisin (Doxo) kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerinde DNA hasarı cevabı aktivasyonuna bağlı olarak apoptozis indüksiyonu için MCF-7 hücrelerine 1 μ M ve 1,75 μ M Doxo, 24 saat süreyle GSK varlığında ve yokluğunda hem normoksi hem de

hipoksi koşullarında uygulanarak hem hücre döngüsü analizi hem de Annexin V/7AAD ölçümü ile apoptozis analizi yapılmıştır. Senesens indüksiyonu içinse 0,5 μ M doxorubicin 72 saat süreyle GSK varlığında ve yokluğunda hem normoksi hem de hipoksi koşullarında uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda yine hücre döngüsü analizi, SA- β -gal boyaması ve WB analizleri yapılmıştır.

5.2.1. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında GSK2830371 ve Doxorubicin Uygulamasının MCF-7 Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri

Elde edilen veriler MCF-7 hücrelerinde normokside GSK'nın tek başına herhangi bir etkisi olmadığını, Doxo uygulamasıyla G2/M fazında döngünün durdurulduğunu göstermektedir. GSK+Doxo uygulamasıyla ise G2/M' de asılı kalan hücre oranının Doxo'ya göre azaldığı ancak kontrole kıyasla halen yüksek oranda bulunduğu, bunun yanında S fazında bulunan hücre oranının artmış olduğu görülmektedir. Hipoksi de benzer sonuçlar elde edilmiş olup GSK'nın tek başına herhangi bir etkisi görülmezken Doxo uygulamasıyla G2/M fazında döngünün durdurulduğu bulunmuştur. Yine GSK+Doxo uygulamasıyla ise G2/M' de asılı kalan hücre oranının Doxo'ya göre azalsa da kontrole kıyasla halen yüksek oranda bulunduğu, bunun yanında S fazında bulunan hücre oranının artmış olduğu görülmektedir. Dolayısıyla GSK ile Wip1'in inhibisyonu bu hücrelerin hem normoksi hem de hipokside DNA hasarına cevaben (Doxo uygulaması) hem S fazı hem de G2/M fazında durdurulmasını sağlamıştır.

Pechackova ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada (0,5 μ M) GSK'nın 8, 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanması sonucunda MCF-7 hücrelerinin zamana bağlı olarak hücre döngüsünün G2/M fazında biriktiğini göstermişlerdir (Pechackova ve ark, 2016). Bunun dışında yapılan bir başka çalışmada PPM1D/Wip1 (-/-) MEF popülasyonunda yabancı tip MEF'lere kıyasla daha yüksek oranda G2/M tutulumu olduğu görülmüştür (Oliva-Trastoy ve ark, 2007). Bu çalışmalar Wip1'in aşırı ekspresyonunun esasen hücre döngüsünün G2/M kontrol noktasının iptaline neden olabildiğine işaret etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında ise GSK uygulaması ile kontrole kıyasla G2/M tutulumunda anlamlı bir farklılık olmadığı görülmektedir. Bu durum GSK'nın MCF-7 hücrelerine sadece 24 saat süre uygulandıktan sonra hücre döngüsü analizi gerçekleştirildiğinden kaynaklanmış olabilir. Nitekim Pechakova ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, G2/M tutulumunun daha düşük GSK konsantrasyonunda gerçekleştirildiği ve zamana bağlı olarak bu tutulumun artış gösterdiği görülmektedir.

Bu tez kapsamında özellikle senesensin indüklenmesi için daha düşük konsantrasyonda Doxo (0,5µM) kullanılmıştır. Normoksi koşullarında 72 saat süre ile Doxo veya GSK+ Doxo uygulandığında da hücre döngüsü analizi için elde edilen veriler, 24 saat Doxo veya GSK+ Doxo verileriyle benzerlik taşımaktadır. Ancak hipoksi de kontrol hücrelerinde G1 fazında belirgin miktarda tutulum olduğu görülmektedir. Doxo uygulanan hücrelerde ise normoksiye benzer şekilde G2/M faz oranının diğer gruplara kıyasla yüksek olduğu tespit edilmiştir. GSK+ Doxo uygulanan hücrelerde ise yine G2/M faz oranının Doxo uygulanan hücrelere kıyasla yaklaşık %50 oranında azaldığı ve S fazında belirgin bir artış olduğu görülmektedir. Dolayısıyla 24 saat verilerine genel olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hücre döngüsü verileri, literatürde var olan çalışmalardan farklılık göstermektedir. Ancak bu durum kullanılan GSK konsantrasyonu veya DNA hasarı ajanı veya çalışmanın yapıldığı hücre dizilerinin de farklılık göstermesi nedeniyle olabilir.

Literatürde var olan çalışmalar Wip1'in hücre döngüsü dağılımı üzerindeki etkisinin p53/p21'e bağlı olarak gerçekleştiğine işaret etmektedir (Pechackova ve ark, 2016). Bu tez çalışmasında da elde edilen veriler bu yöndedir. Hücre döngüsü analizi yapılan hücrelerde daha sonra yapılan WB analizlerinde hem apoptotik hem de senesens sırasında p53'e bağlı p21 aktivitesinde artış olduğu tespit edilmiştir.

Wip1'in hücre döngüsü üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan birinde ise wt-NPC (sinir kökü/öncü hücresi) ile Wip1 knock-out (KO) NPC hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı karşılaştırılmış ve Wip1-KO-NPC hücrelerinin daha yüksek G2/M oranına sahip olduğunu tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında ise p53-KO-NPC ile Wip1/p53-KO-NPC (p53 ve Wip1 knock-out) hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı karşılaştırılmış ve aralarında farklılık olmadığı saptanmıştır. Böylece Wip1'in p53 pozitif NPC hücrelerinde hücre döngüsü üzerinde etkili olduğunu ancak p53 negatif NPC hücrelerinde ise Wip1'in hücre döngüsü üzerine etki etmediği belirlenmiştir (Zhu ve Bulavin, 2012).

Bu tez çalışması kapsamında hem normoksi hem de hipokside elde edilen veriler Wip1 varlığında hücrelerin G1/S kontrol noktasından kaçabildiği görülmektedir. Bu durum büyük olasılıkla p53'ün ve takiben p21'in inhibisyonunu gerçekleştirmek suretiyle olduğu, elde edilen WB analizi sonuçlarından görülmektedir. Wip1 baskılanması sonucunda ise elde edilen veriler hem p53-p21 aktivasyonunun hem de G1/S kontrol noktasının geri geldiğini göstermektedir. Bu durum hem kısa süreli (24 saat) hem de uzun süreli (72 saat) Doxo ve GSK+Doxo uygulamaları sonucunda yapılan analizlerde görülmüştür.

Fonksiyonel çalışmalar, Wip1'in G1/S, intra-S ve G2/M kontrol noktalarında regülasyonunu sağladığını doğrulamışlardır (Choi ve ark, 2002; Kleiblova ve ark, 2013; Pechackova ve ark, 2016). Wip1'i aşırı ekspresse eden hücrelerin iyonize radyasyona maruz kaldığında daha düşük G2 tutuklanmasına sahip olduğu görülmüştür (Oliva-Trastoy ve ark, 2007). Endojen Wip1'e sahip hücreler Wip1'in baskılandığı hücelere göre G2 kontrol noktasından çok daha etkili bir çıkış ve toparlanma sağlamakta ve bunu da p53'ü inhibe etmek suretiyle yapmaktadırlar (Jaiswal ve ark, 2017; Lindqvist ve ark, 2009). Bu durumda hücreler proliferasyona devam edebilmekte ve bu da Wip1'in tümörigenezi teşvik etmek için kullandığı diğer bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır.

5.2.2. Normoksi ve Hipoksi Koşullarında GSK2830371 ve Doxorubicin Uygulamasının MCF-7 Hücrelerinde Apoptotik etkileri

Elde edilen veriler normoksi koşullarında GSK ve Doxo'nun birlikte uygulamasının apoptozis oranını tek başına Doxo uygulamasına kıyasla yaklaşık % 20 oranında artırdığını göstermiştir. Elde edilen bu veriler GSK'nın Wip1'i baskılamasıyla hücrelerin apoptozise daha duyarlı hale geldiklerini GSK+Doxo 'nun birlikte sinerjistik etki göstererek MCF-7 hücrelerinde apoptozis oranını artırdığına işaret etmektedirler. Pechakova ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiş olup MCF-7 hücrelerinde GSK'nın Doxo'ya duyarlılığı %15 oranında artırdığı görülmektedir. Bunun dışında çeşitli kanser türlerinde (meme, nöroblastoma, melanoma, mantle cell lenfoma ve glioma) yapılan *in vitro* ya da *in vivo* çalışmalarda GSK'nın iyonize radyasyon, Doxo veya Etoposid gibi DNA hasarı ajanlarına kaşın bu hücreleri daha duyarlı hale getirdiği ve apoptozis oranını artırdığı görülmektedir. Genel olarak farmakolojik ya da genetik olarak Wip1'in baskılanmasının *wt* p53'e sahip tümörlerde kemoterapiye duyarlılık açısından etkili olduğu görülmektedir (Chen ve ark, 2016; Kojima ve ark, 2016; Pechackova ve ark, 2016; Sriraman ve ark, 2016; Stolte ve ark, 2018; Wu ve ark, 2018).

Bu tez çalışmasında GSK'nın etkinliği ilk defa hipoksi koşulunda test edilmiştir. Elde edilen veriler normoksiye benzer şekilde hipokside de GSK ve Doxo birlikte uygulandığında tek başına doxo uygulamasına kıyasla total apoptozis miktarını yaklaşık %20 oranında artırdığını göstermektedir. Normoksik ve hipokside 24 saat inkübasyonu takiben hesaplanan sonuçlar birbirleriyle kıyaslandığında ise kontrol, D1, D2 grupları arasındaki apoptozis oranının hipokside ortalama %5 oranında daha düşük olduğu saptanmıştır. Başka bir deyişle hipoksi MCF-7 hücrelerinin Doxo indüklü apoptozise daha

dirençli olmasına yol açmıştır. Ancak GSK hipoksida de normoksiye benzer şekilde Doxo ile indüklenen apoptozis oranını %20 oranında artırmıştır. Dolayısıyla GSK+Doxo'nun birlikte sinerjistik etki göstermesi oldukça önemli bir bulgudur. Bu veriler Wip1'i aşırı ifade eden hipoksik tümörlerde de GSK'nın oldukça iyi bir terapötik ajan olabileceğine işaret etmektedir. Literatürde bu konuda hem normoksi hem de hipoksida karşılaştırmalı olarak yapılan herhangi bir *in vitro* çalışmaya rastlamamakla birlikte GSK'nın etkinliğinin gösterildiği *in vivo* fare tümör modelleri olan az sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan birinde GSK'nın xenograft modelinde lenfoma ve nöroblastoma büyümesini baskıladığı ve böylece *in vivo* hipoksik tümörlerde etkin olabileceği gösterilmiştir (Chen ve ark, 2016; Richter ve ark, 2015). Bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler literatürde var olan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Genotoksik strese maruz kalan hücreler, DNA onarımını düzenleyen ve genomik düzensizlik ve tümör oluşumunu önleyen içsel bir bariyeri temsil eden korunmuş bir DNA hasarı yanıtının aktivasyonu ile genom bütünlüğünü korurlar (Bartek ve ark, 2007). Bu yolağın en temel bileşeni, hücrenin kader kararlarını kontrol eden tümör baskılayıcı protein p53'tür. Aktivasyonunun genliğine ve süresine bağlı olarak, p53 geçici hücre döngüsü durmasını (kontrol noktası), kalıcı senesensi (yaşlanma) veya programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) teşvik eder (Lowe ve ark, 2012). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda onkogenik Wip1'in wt p53 tümörlerde tümörögenезin bir bileşeni ve p53'e bağlı olarak aktive olan tümör süpresör cevapları baskıladığı görülmektedir (Chen ve ark, 2016; Kojima ve ark, 2016; Pechackova ve ark, 2016; Sriraman ve ark, 2016; Stolte ve ark, 2018; Wu ve ark, 2018). Bu tez çalışmasından elde edilen bulgularda bu durumu işaret etmektedir. MCF-7 hücrelerinde hem normoksi hem de hipoksida Doksorubisin ile indüklenen apoptozis oranının düşük olmasının altında yatan en temel nedenlerden birisi olarak Wip1'i aşırı ifade eden bu hücrelerde aşırı artmış fosfataz aktivitesiyle DNA hasarı cevabı ve takiben p53'e bağlı olarak gelişen hücresel cevapların tam olarak indüklenmemiş olması gösterilebilir. Nitekim MCF-7 hücrelerinde GSK veya GSK+Doxo uygulaması sonrası yapılan WB analizlerinden elde edilen veriler bu hipotezi destekler niteliktedir. Normoksida tek başına Doxo uygulamasıyla DDR'ın önemli bileşenlerinden Chk2'nin ve p53'ün fosforilasyonları görülmezken GSK+Doxo uygulaması sonucunda her ikisinin de fosforile olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak p21 ve p27 düzeyinde de artış olduğu görülmektedir (Şekil 44). Benzer durum hipoksida de doğrulanmış olup tek başına GSK veya Doxo uygulamasıyla p53 ya da Chk2 fosforilasyonu görülmezken GSK+Doxo beraber

uygulandığında her ikisinde fosforile olduğu ancak fosforilasyon düzeylerinin normoksiye göre biraz daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Hipokside de p21 ve p27 düzeylerinin artmış olduğu ve GSK+Doxo uygulamasında bu artışın daha fazla olduğu görülmektedir. Dolayısıyla elde edilen bu veriler MCF-7 hücrelerinde GSK +Doxo indüklü apoptozise hem normoksi hem de hipokside Chk2-p53-p21 aktivasyonunun aracılık edebileceğini göstermektedir.

WB Apoptozis	NORMOKSİ			HİPOKSİ		
	GSK	Doxo	GSK+Doxo	GSK	Doxo	GSK+Doxo
t-ATM	-	+	++	-	+	+
t-ATR	-	+	+	-	+	+
p-BRCA1	+	++	+++	+	+	+
HIF-1 α	-	-	-	+	+	+
Wip1	+	++++	+	+	++++	+
p-Chk2	-	-	++	-	-	+
t-Chk2	-	++	++	-	+	+
p-Chk1	-	+	+	-	+	+
p-p53	-	-	+	-	-	+
t-p53	+	++++	++++	+	++++	++++
p27 Kip	-	++	++	-	+	++
p21	+	+	++	+	++	+++
γ -H2AX	+	+++	++++++	++	+++	++++

Şekil 44. 24 saatlik Western Blot sonuçlarının karşılaştırılmalı olarak işaretli tablosu

(Kontrole göre belirgin bir fark olmayan (-), kontrole göre artmış olanlar ise artış miktarlarına oranla (+) işaretiyle ifade edilmiştir.)

Literatürde de Wip1'in aşırı ifade edilerek onkogen özelliği kazandığı tümör hücrelerinin çoğunda p53 geni yabancı tipidir. (Xia ve ark, 2017). p53'ün fonksiyonel olarak pozitif olduğu tümörlerde Wip1'in hedeflenerek baskılanması kemoterapiye olan duyarlılığı arttırmakta ve apoptozisi teşvik etmektedir (Pechackova ve ark, 2017). Bu çalışmalardan nöroblastomada Wip1'in GSK (50 μ M) ile baskılanması sonucunda Chk2 fosforilasyonuna bağlı olarak p53 aracılı olarak indüklenen p21 ve Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinden Bax ve Puma'nın artışına bağlı olarak apoptozisin arttığı bildirilmiştir (Chen ve ark, 2016). Mantle hücre lenfomasında yapılan bir çalışmada ise yine GSK ile Wip1'in baskılanması sonucunda total ve fosforile p53'ün artışına bağlı olarak p21 ve PUMA protein düzeylerinde artış gösterdiği ve bu hücrelerin apoptozise daha duyarlı hale geldikleri gösterilmiştir (Kojima ve ark, 2016). Ayrıca Kong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Wip1'in baskılanmasının doksorubisine cevap olarak daha yüksek seviyede apoptozise yol açtığını göstermiştir (Kong ve ark, 2009). Bu tez kapsamında elde edilen bulgular literatürle paralellik göstermekte ve GSK'ya bağlı olarak

ortaya çıkan apoptozis artışına Chk2-p53-p21 aktivasyonunun aracılık edebileceğini göstermektedir.

Yine bu tez çalışması kapsamında elde edilen önemli bulgulardan birisi de DNA kırıklarının onarımında, yanlış eşleşme hatalarının onarımında ve hatta NHEJ onarım sisteminde görev alan BRCA1'in, herhangi bir DNA hasarı ajanı olmadan sadece GSK uygulanması sonucunda fosforilasyon düzeyinin artış göstermesidir. BRCA1 esasen çift sarmal bir onarım proteinidir ve meme kanseri duyarlılık proteini olarak da bilinmektedir (Isobe ve ark, 2017). BRCA1 Wip1'in defosforile ettiği bilinen hedeflerinden birisi değildir. Bu çalışma kapsamında MCF-7 hücrelerinde hem normoksi hem de hipoksida kontrol gruplarında BRCA1 fosforilasyonu görülmezken, GSK ile fosforilasyonun ortaya çıktığı açıkça görülmektedir. Doxo veya GSK + Doxo uygulanan gruplarda da BRCA1 fosforilasyonunda artış olduğu görülmektedir. Chk2 ve p53'e benzer şekilde BRCA1 fosforilasyonunun hipoksida normoksiye kıyasla daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Dolayısıyla BRCA1'in Wip1'in olası bir hedefi olarak ilk defa bu çalışma kapsamında gösterilmesi ve literatüre tanıtılması da oldukça önemli bir bulgudur.

Bu tez kapsamında elde edilen veriler DNA çift zincir kırıkları için bir sensör görevi gören ve Wip1'in bilinen hedeflerinden birisi olan H2A.X'in de GSK uygulaması ile Wip1'in baskılanması sonucu fosforile olduğunu (γ H2A.X) göstermiştir. Yapılan WB analizlerinde GSK+Doxo uygulaması ile γ H2A.X seviyesinin hem normoksi hem de hipoksida en üst düzeye ulaştığı görülmektedir. γ H2AX fosforilasyonu DDR'nin önemli bir belirteçidir. DNA'da özellikle çift zincir kırıklarıyla meydana gelen hasarlar sonucu γ H2AX fosforillenerek aktive olur ve böylece DDR faktörlerinin hasarlı bölgeye gitmesini teşvik ederek DDR'yi başlatır (Clausse ve ark, 2016). Dolayısıyla elde edilen bu bulgular onkogenik Wip1'i aşırı ifade eden MCF-7 hücrelerinde GSK ile DDR'nin aktivasyonunun en yüksek düzeyde sağlandığına işaret etmektedir. Esasen bu sonuçlar DDR'nin tümör baskılayıcı bir bariyer olarak görev görürken tümörögenез sırasında onkogenik Wip1 tarafından baskılandığına ve Wip1'in inhibe edilmesiyle DDR'nin yeniden aktive edilebildiğine işaret etmektedir. Bu hipotezi destekleyecek en önemli bulgu ise hem normoksi hem de hipoksi de MCF-7 hücrelerinde herhangi bir DNA hasarı ajanı olmaksızın sadece GSK uygulanmasıyla bazal BRCA1 ve bazal H2A.X'in fosforilasyonunun indüklenmesidir. Literatürde de bu hipotezi destekler nitelikte bulgular olup yapılan bir çalışmada Wip1'in etkin inhibisyonunun bazal γ H2AX seviyesini artırdığı gösterilmiştir (Pechackova ve ark, 2016).

Senesensin hücrede, telomer erozyonu dışında, oksidatif hasar, DNA hasarı, anormal onkogen aktivasyonu (örn. Ras, Braf) veya tümör supresör gen inaktivasyonu ya da mitojenik stimülasyona karşı koruyucu bir cevap ve bir tümör supresör mekanizma olarak aktive olabildiği bilinmektedir (Kilic ve Schmitt, 2008). DNA hasarı oluşturan ajanlarla veya radyoterapi ile indüklenen senesens; kemoterapiye yanıt olarak apoptozisin yanında bir diğer önemli hücresel cevap olarak yerini almaktadır (Kilic Eren ve Tabor, 2014).

Senesensin indüklendiği hücreler canlı, metabolik olarak aktiftirler ve hücre döngüsü genellikle G1 fazında durdurulmuştur. Karakteristik olarak morfolojilerinde bir takım değişiklikler görülür. Örneğin genişleyerek daha düz ve şeffaf görünürken sitoplazmaları da vakuolce zengin hale gelir. Sitoplazmik vakuollerin artması da hücrelerin daha granüllü bir görünüm almasını sağlar. Hücresel senesensin en önemli biyokimyasal belirteci artmış SA- β galaktosidaz aktivitesidir. Diğer önemli bir biyobelirteci olarak değerlendirilen γ H2AX aktivasyonunun artışı, DDR'ye yanıt olarak hücresel senesensin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Nükleer DNA hasarının birikimi γ H2AX'in aktivasyonunu uyararak hücresel senesensin başlamasını tetikler (Schmitt, 2007). Senesensin indüklenmesinde genel olarak iki ana tümör supresör RB-P16^{INK4A} ve p53-p21 yolakları aracılık etmektedir (Takahashi ve ark, 2007). Senesensin aktivasyonu hangi yolak üzerinden olursa olsun DDR'nin de bu indüksiyonda önemli rol aldığı bilinmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında GSK ile Wip1'in baskılanması sağlandığında hem normoksi hem de hipoksida Doxo'nun senesens indükleyici etkileri de analiz edilmiştir. Senesensin aktivasyonu, SA- β -gal boyaması, γ H2AX aktivasyonu, hücre döngüsü analizi ve ayrıca senesensin aktivasyonunda görev alan γ H2AX, p53, p21 gibi DDR elemanlarının WB analizleriyle doğrulanmıştır. Normokside Wip1'in GSK ile baskılandığı hücrelerde senesens indüksiyonunun kontrole kıyasla bir miktar daha fazla olduğu yapılan SA- β -gal boyaması sonuçlarından görülmektedir. Benzer şekilde GSK+Doxo uygulamasında da hücrelerin SA- β -gal aktivitesiyle maviye boyandıkları görülmektedir. Ayrıca γ H2AX aktivasyon testide bu sonuçları doğrulamıştır. Tek başına GSK uygulaması sonucunda aktif γ H2AX miktarı kontrole kıyasla artarken GSK+ Doxo'yla en yüksek seviye ye ulaşmıştır.

Hipoksida de benzer sonuçlar elde edilmiştir ancak senesens indüksiyonunun normoksiye göre bir miktar daha düşük olduğu SA- β -gal aktivitesi sonucunda bulunmuştur. Literatürde var olan çalışmada da benzer sonuçlara rastlanmaktadır. *İn vitro* koşullarda embriyonik fare fibroblastlarında hipoksinin replikatif senesensi geciktirici bir etkiye sahip olduğu gözlenmiş ve bu etki kısmen HIF-1 α 'nın Mif'i aktive ederek p53'ün inhibisyonuna

yol açmasına bağlanmıştır (Maity ve Koumenis, 2006; Welford ve ark, 2006). Aynı çalışmada HIF-1 α 'nın inhibisyonu ile bu hücreler iyonize radyasyonla indüklenen senesense karşı duyarlılık göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada da hipoksi ve HIF-1 α 'nın normal insan fibroblastlarında onkogen indüklü senesensin bypass edilmesinde önemli rolü olduğu ortaya konmuştur (Kilic Eren ve Tabor, 2014). Sullivan ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada ise insan meme karsinoma (MDA-MB-231) ve kolon karsinoma (HCT116) hücre dizilerinde hipoksi koşullarının kemoterapi ajanları ile indüklenen apoptozisi etkilemezken senesense karşın bir dirence yol açtığı ve bu direncin HIF-1 α 'nın inhibisyonu ile kırıldığı gösterilmiştir (Sullivan ve ark, 2008). Bu tez çalışmasında da senesensin normoksiye göre hipoksida daha düşük oranda aktivasyonunun nedeni HIF-1 α kaynaklı olabilir ve ileriki çalışmalarda aydınlatılması gereken önemli konular arasındadır.

Hem normoksi hem de hipoksi de yapılan WB analizlerinde senesensin indüksiyonunun ATM ve ATR kinazların aktivasyonuna bağlı olarak Chk2-p53 ve p21 üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu hücreler de yapılan SA- β -gal boyaması ve p53 aktivasyonunu gösteren WB analizleri birbirine paralellik göstermektedir.

Senesensin önemli belirteçlerinden biri olan SA- β galaktozidaz aktivitesinin kemoterapötik ilaç muamelesi sonrası özellikle solid tümörlerde p53'ün varlığına bağlı olarak artış gösterdiği bilinmektedir. Ancak bazı çalışmalar senesensin sadece p53'e bağlı olarak gerçekleşmediğini ve p53'ten bağımsız mekanizmayla da indüklenebileceğini göstermektedir (Chang ve ark, 1999).

Literatürde Wip1 gen kaybının γ H2AX aktivasyonunu arttırarak hem prematüre senesensi hemde endojen DDR sinyallesini teşvik ettiği bilinmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, He ve ark (2016) gerçekleştirdiği bir çalışma da; orta derecede stres uygulanan Wip1-KO farelerin hipokampus hücrelerinde kontrol grubu farelere kıyasla γ H2AX aktivasyonunun ve hücrel senesensin arttığı 'Western Blot' analizi ve 'SA- β -gal boyamaları' ile gösterilmiştir. Böylece fare hipokampusunda Wip1 eksikliğinin γ H2AX fosforilasyonunun artışına sebep olduğu ve böylece hücrel senesensi tetiklendiği bildirilmiştir (He ve ark, 2016). Bu tez çalışması kapsamında γ H2AX aktivasyonuna yönelik bulgularda bu yönde olup literatürle uyum göstermektedir. GSK ile Wip'in inhibisyonu sonucunda γ H2AX fosforilasyonunun arttığı GSK+ Doxo uygulamasına cevaben de en üst seviyeye çıktığı tespit edilmiştir. Özellikle normoksida bu grupta senesensin üst seviyede olduğu görülmektedir.

Çalışmanın diğer önemli bir bulgusu da apoptozis aktivasyonunda da görülen GSK ve GSK+Doxo'ya cevaben artmış olan BRCA1 fosforilasyonunun benzer şekilde senesens sırasında da hem normoksi hem de hipokside artmış olduğudur. Bu sonuçlar BRCA1 fosforilasyonunun hem hücre döngüsünün durdurulması, hem apoptozis hemde senesens için gerekli olduğuna işaret etmektedir. Literatürde de bu yönde çalışmalar mevcut olup BRCA1'in DDR'nin majör elemanlarından birisi olarak sadece bir sinyal arttırıcı değil aynı zamanda üç önemli hücresel süreçten hangisinin seçileceğinde de rolü olduğuna işaret edilmektedir (Jang ve Lee, 2004).

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen diğer bir bulguda hipokside 72 saat GSK veya GSK+Doxo uygulamasına cevaben HIF-1 α protein seviyesinin kontrol ve sadece Doxo uygulanan hücrelere göre daha düşük bir seviyede olduğunun tespit edilmesidir. Bununla beraber özellikle bu gurplarda (GSK ve GSK+Doxo) apoptozis oranının da artmış olduğu gözlenmiştir. Literatürde bu şekilde, özellikle Wip1 inhibitörlerinin hipokside HIF-1 α üzerinde etkisi gösteren bir çalışmaya veya bulguya henüz rastlanmamaktadır. Ancak Wip1 inhibitörlerinin spesifik olarak HIF-1 α 'yı baskılayıcı bir etkisi olup olmadığı veya Wip1'in bir fosfataz olarak HIF-1 α 'nın stabilizasyonundaki rolü gelecekte araştırılması gereken diğer bir önemli sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

WB Senesens	NORMOKSİ			HİPOKSİ		
	GSK	D0	G+D0	GSK	D0	G+D0
t-ATM	+	++	++	+	++	++
p-ATM	+	++	++	+	++	++
t-ATR	+	++	++	+	++	++
p-ATR	+	+	+	+	++	++
p-BRCA1	++	++	++	+	+	+
HIF-1 α	-	-	-	+	++	+
Wip1	+	++	+	+	++	+
p-Chk2	+	+	++	-	-	+
t-Chk2	+	+	+	+	+	++
p-Chk1	-	-	+	-	-	+
t-Chk1	+	+	+	+	+	+
p-p53	-	-	++	-	-	+
t-p53	+	+++	++++	+	++	+++
p27 Kip	-	-	-	-	-	-
p21	+	++	+++	+	+	++
γ -H2AX	+	+	++	+	+	++

Şekil 45. 72 saatlik Western Blot sonuçlarının karşılaştırılmalı olarak işaretsel tablosu

(Kontrole göre belirgin bir fark olmayan (-), kontrole göre artmış olanlar ise artış miktarlarına oranla (+) işaretiyle ifade edilmiştir.)

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada, *PPM1D* amplifikasyonundan dolayı aşırı artan Wip1 ekspresyonuna sahip olan MCF-7 hücre dizinde normoksik ve hipoksik şartlar altında Wip1 varlığında ve yokluğunda kemoterapiye verdiği yanıt ve DDR elemanları üzerindeki rolü araştırılmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen en önemli sonuçlar;

- 1) Normoksi ve hipokside Wip1 varlığında DNA hasarına cevaben (Doxo uygulaması) sadece G2/M fazında tutulum gösteren MCF-7 hücrelerinde GSK ile Wip1'in inhibisyonu hücrelerin S fazı hem de G2/M fazında durdurulmasını sağlamıştır. Hücre döngüsünün durdurulması γ H2AX fosforilasyonunu takiben Chk2-p53 ve p21 aracılığıyla gerçekleşmektedir.
- 2) Wip1'in GSK ile inhibisyonu sonrasında hem normoksik hem de hipoksik koşulda MCF-7 hücrelerinin doksorobisine duyarlı hale geldiği, GSK ve Doxo kombine olarak beraber uygulandığında sinerjistik etki gösterdiği tespit edilmiştir.
- 3) MCF-7 hücrelerinde GSK +Doxo indüklü apoptozise hem normoksi hem de hipokside DDR'ın önemli elemanlarından γ H2AX fosforilasyonunu takiben Chk2-p53-p21 aktivasyonunun aracılık edebileceğini göstermektedir.
- 4) Bu çalışma kapsamında elde edilen veriler ilk defa Wip1'in BRCA1'in defosforilasyonuna aracılık edebileceğine ve hedefleri arasında bulunabileceğine işaret etmiştir.
- 5) Senesensin GSK ile Wip1'in baskılanması sağlandığında hem normoksi hem de hipokside Doxo ile indüklenen senesens miktarıyla eşit düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Hipokside de benzer sonuçlar elde edilmiştir ancak senesens indüksiyonunun normoksiye göre bir miktar daha düşük olduğu SA- β -gal aktivitesi sonucunda bulunmuştur. Normokside GSK+Doxo aracılı senesens sırasında hücre döngüsünün G1'de durdurulduğu ancak hipoksi de GSK+ Doxo uygulanan hücrelerde G2/M oranının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca genel olarak GSK etkisiyle senesens sırasında S fazında belirgin bir artış olduğu görülmektedir.

6) Hem normoksi hem de hipokside yapılan senesensin indüksiyonunun ATM ve ATR kinazların aktivasyonuna bağılı olarak γ H2AX aktivasyonu Chk2-p53 ve p21 üzerinden gerçekleştiğı gösterilmiştir.

7) Çalışmanın diğeri önemli sonucu da apoptozis aktivasyonunda görülen GSK ve GSK+Doxo'ya cevaben artmış olan BRCA1 fosforilasyonunun benzer şekilde senesens sırasında da artmış olduğudur. Bu sonuçlar BRCA1 fosforilasyonunun hem hücre döngüsünün durdurulması, hem apoptozis hemde senesens için gerekli olduğuna işaret etmektedir.

Dolayısıyla elde edilen bu bulgular onkogenik Wip1'i aşırı ifade eden MCF-7 hücrelerinde GSK ile Wip1'in inhibisyonu sonucunda DDR'nin aktivasyonunun en yüksek düzeyde sağlandığına işaret etmektedir. Esasen bu sonuçlar DDR'nin tümör baskılayıcı bir bariyer olarak görev yaparken tümörögenез sırasında onkogenik Wip1 tarafından baskılandığına ve Wip1'in inhibe edilmesiyle hipokside de DDR'nin yeniden aktive edilebildiğine, hücre döngüsü kontrol noktaları, apoptozis ve senesensin daha etkin biçimde indüklendiklerine işaret etmektedir. Bu veriler Wip1'i aşırı ifade eden hipoksik tümörlerde de GSK'nın oldukça iyi bir terapötik ajan olabileceğine işaret etmektedir. Literatürde bu konuda hem normoksi hem de hipokside karşılaştırmalı olarak yapılan herhangi bir *in vitro* çalışmaya rastlanmaması ve ilk defa bu tez kapsamında araştırılmış olması bu çalışmayı oldukça özgün kılmaktadır.

KAYNAKLAR

Abdel-Aal MAA, Abdel-Aziz SA, Shaykoon MSA, Abuo-Rahma GEA. Towards anticancer fluoroquinolones: A review article. *Arch Pharm (Weinheim)* 2019, 352 (7), e1800376.

Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* 2007, 26 (56), 7773-7779.

Bersten DC, Sullivan AE, Peet DJ, Whitelaw ML. bHLH-PAS proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013, 13 (12), 827-841.

Bindra RS, Glazer PM. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutat Res* 2005, 569 (1-2), 75-85.

Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell* 2017, 66 (6), 801-817.

Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer* 2008, 8 (3), 180-192.

Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J, Roninson IB. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 1999, 18 (34), 4808-4818.

Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 2012, 47 (4), 497-510.

Chen Z, Wang L, Yao D, Yang T, Cao WM, Dou J, Pang JC, Guan S, Zhang H, Yu Y, Zhao Y, Wang Y, Xu X, Shi Y, Patel R, Zhang H, Vasudevan SA, Liu S, Yang J, Nuchtern JG. Wip1 inhibitor GSK2830371 inhibits neuroblastoma growth by inducing Chk2/p53-mediated apoptosis. *Sci Rep* 2016, 6, 38011.

Choi DW, Na W, Kabir MH, Yi E, Kwon S, Yeom J, Ahn JW, Choi HH, Lee Y, Seo KW, Shin MK, Park SH, Yoo HY, Isono K, Koseki H, Kim ST, Lee C, Kwon YK, Choi CY. WIP1, a homeostatic regulator of the DNA damage response, is targeted by HIPK2 for phosphorylation and degradation. *Mol Cell* 2013, 51 (3), 374-385.

Choi J, Nannenga B, Demidov ON, Bulavin DV, Cooney A, Brayton C, Zhang Y, Mbawuike IN, Bradley A, Appella E, Donehower LA. Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene (Wip1) exhibit defects in reproductive organs, immune function, and cell cycle control. *Mol Cell Biol* 2002, 22 (4), 1094-1105.

Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010, 40 (2), 179-204.

Clausse V, Goloudina AR, Uyanik B, Kochetkova EY, Richaud S, Fedorova OA, Hammann A, Bardou M, Barlev NA, Garrido C, Demidov ON. Wee1 inhibition potentiates Wip1-dependent p53-negative tumor cell death during chemotherapy. *Cell Death Dis* 2016, 7, e2195.

Conde E, Alegre L, Blanco-Sanchez I, Saenz-Morales D, Aguado-Fraile E, Ponte B, Ramos E, Saiz A, Jimenez C, Ordonez A, Lopez-Cabrera M, del Peso L, de Landazuri MO, Liano F, Selgas R, Sanchez-Tomero JA, Garcia-Bermejo ML. Hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PLoS One* 2012, 7 (3), e33258.

Crescenzi E, Raia Z, Pacifico F, Mellone S, Moscato F, Palumbo G, Leonardi A. Down-regulation of wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) plays a critical role in regulating several p53-dependent functions in premature senescent tumor cells. *J Biol Chem* 2013, 288 (23), 16212-16224.

Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer* 2017, 8 (16), 3131-3141.

Demidov ON, Kek C, Shreeram S, Timofeev O, Fornace AJ, Appella E, Bulavin DV. The role of the MKK6/p38 MAPK pathway in Wip1-dependent regulation of ErbB2-driven mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* 2007, 26 (17), 2502-2506.

El-Awady RA, Semreen MH, Saber-Ayad MM, Cyprian F, Menon V, Al-Tel TH. Modulation of DNA damage response and induction of apoptosis mediates synergism between doxorubicin and a new imidazopyridine derivative in breast and lung cancer cells. *DNA Repair (Amst)* 2016, 37, 1-11.

Elshamy WM. Induction of breast cancer in wild type p53 cells by BRCA1-IRIS overexpression. *Hawaii Med J* 2010, 69 (8), 200-201.

Emelyanov A, Bulavin DV. Wip1 phosphatase in breast cancer. *Oncogene* 2015, 34 (34), 4429-4438.

Epstein AC GJ, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001, 107 (1), 43-54.

Feng Y, Liu F, Du Z, Zhao D, Cheng J, Guo W. Wip1 regulates SKOV3 cell apoptosis through the p38 MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep* 2017, 15 (6), 3651-3657.

Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, Vande Woude GF, O'Connor PM, Appella E. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94 (12), 6048-6053.

Gilmartin AG, Faitg TH, Richter M, Groy A, Seefeld MA, Darcy MG, Peng X, Federowicz K, Yang J, Zhang SY, Minthorn E, Jaworski JP, Schaber M, Martens S, McNulty DE, Sinnamon RH, Zhang H, Kirkpatrick RB, Nevins N, Cui G, Pietrak B, Diaz E, Jones A, Brandt M, Schwartz B, Heerding DA, Kumar R. Allosteric Wip1

phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction. *Nat Chem Biol* 2014, 10 (3), 181-187.

Goloudina AR, Kochetkova EY, Pospelova TV, Demidov ON. Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. *Oncotarget* 2016, 7 (21), 31563-31571.

Hammond EM, Asselin MC, Forster D, O'Connor JP, Senra JM, Williams KJ. The meaning, measurement and modification of hypoxia in the laboratory and the clinic. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2014, 26 (5), 277-288.

He ZY, Wang WY, Hu WY, Yang L, Li Y, Zhang WY, Yang YS, Liu SC, Zhang FL, Mei R, Xing D, Xiao ZC, Zhang M. Gamma-H2AX upregulation caused by Wip1 deficiency increases depression-related cellular senescence in hippocampus. *Sci Rep* 2016, 6, 34558.

Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93 (4), 266-276.

Isobe SY, Nagao K, Nozaki N, Kimura H, Obuse C. Inhibition of RIF1 by SCAI Allows BRCA1-Mediated Repair. *Cell Rep* 2017, 20 (2), 297-307.

Jaiswal H, Benada J, Mullers E, Akopyan K, Burdova K, Koolmeister T, Helleday T, Medema RH, Macurek L, Lindqvist A. ATM/Wip1 activities at chromatin control Plk1 re-activation to determine G2 checkpoint duration. *EMBO J* 2017, 36 (14), 2161-2176.

Jang ER, Lee JS. DNA damage response mediated through BRCA1. *Cancer Res Treat* 2004, 36 (4), 214-221.

Kaplan AR, Glazer PM. Impact of hypoxia on DNA repair and genome integrity. *Mutagenesis* 2019.

Kilic Eren M, Kilincli A, Eren O. Resveratrol Induced Premature Senescence Is Associated with DNA Damage Mediated SIRT1 and SIRT2 Down-Regulation. *PLoS One* 2015, 10 (4), e0124837.

Kilic Eren M, Tabor V. The role of hypoxia inducible factor-1 alpha in bypassing oncogene-induced senescence. *PLoS One* 2014, 9 (7), e101064.

Kilic M, Kasperczyk H, Fulda S, Debatin KM. Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* 2007, 26 (14), 2027-2038.

Kilic M, Schmitt CA. Tumor senescence in cancer treatment. In: Ronninson IB, Brown JM, Bredesen DE (eds.), *Beyond Apoptosis: Cellular Outcomes of Cancer Therapy*. New York: Informa Health Care USA, 2008, s 273.

Kleiblova P, Shaltiel IA, Benada J, Sevcik J, Pechackova S, Pohlreich P, Voest EE, Dundr P, Bartek J, Kleibl Z, Medema RH, Macurek L. Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *J Cell Biol* 2013, 201 (4), 511-521.

Koh MY, Powis G. "Passing the baton: the HIF switch". *Trends Biochem Sci* 2012, 37 (9), 364-372.

Kojima K, Maeda A, Yoshimura M, Nishida Y, Kimura S. The pathophysiological significance of PPM1D and therapeutic targeting of PPM1D-mediated signaling by GSK2830371 in mantle cell lymphoma. *Oncotarget* 2016, 7 (43), 69625-69637.

Kong W, Jiang X, Mercer WE. Downregulation of Wip-1 phosphatase expression in MCF-7 breast cancer cells enhances doxorubicin-induced apoptosis through p53-mediated transcriptional activation of Bax. *Cancer Biol Ther* 2009, 8 (6), 555-563.

Le Guezennec X, Bulavin DV. WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging. *Trends Biochem Sci* 2010, 35 (2), 109-114.

Lee JS, Lee MO, Moon BH, Shim SH, Fornace AJ, Jr., Cha HJ. Senescent growth arrest in mesenchymal stem cells is bypassed by Wip1-mediated downregulation of intrinsic stress signaling pathways. *Stem Cells* 2009, 27 (8), 1963-1975.

Lee YK, Thomas SN, Yang AJ, Ann DK. Doxorubicin down-regulates Kruppel-associated box domain-associated protein 1 sumoylation that relieves its transcription repression on p21WAF1/CIP1 in breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 2007, 282 (3), 1595-1606.

Leontieva OV, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Weak p53 permits senescence during cell cycle arrest. *Cell Cycle* 2010, 9 (21), 4323-4327.

Leslie PL, Zhang Y. MDM2 oligomers: antagonizers of the guardian of the genome. *Oncogene* 2016, 35 (48), 6157-6165.

Li J, Yang Y, Peng Y, Austin RJ, van Eyndhoven WG, Nguyen KC, Gabriele T, McCurrach ME, Marks JR, Hoey T, Lowe SW, Powers S. Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23. *Nat Genet* 2002, 31 (2), 133-134.

Lindqvist A, de Bruijn M, Macurek L, Bras A, Mensinga A, Bruinsma W, Voets O, Kranenburg O, Medema RH. Wip1 confers G2 checkpoint recovery competence by counteracting p53-dependent transcriptional repression. *EMBO J* 2009, 28 (20), 3196-3206.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25 (4), 402-408.

Lowe J, Cha H, Lee MO, Mazur SJ, Appella E, Fornace AJ, Jr. Regulation of the Wip1 phosphatase and its effects on the stress response. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012, 17, 1480-1498.

Lu X, Nguyen TA, Moon SH, Darlington Y, Sommer M, Donehower LA. The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer Metastasis Rev* 2008, 27 (2), 123-135.

Luis C, Castano-Guerrero Y, Soares R, Sales G, Fernandes R. Avoiding the Interference of Doxorubicin with MTT Measurements on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Methods Protoc* 2019, 2 (2).

Macurek L, Benada J, Mullers E, Halim VA, Krejcikova K, Burdova K, Pechackova S, Hodny Z, Lindqvist A, Medema RH, Bartek J. Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis. *Cell Cycle* 2013, 12 (2), 251-262.

Maity A, Koumenis C. HIF and MIF--a nifty way to delay senescence? *Genes Dev* 2006, 20 (24), 3337-3341.

Marechal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, 5 (9).

Masoud GN, Li W. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2015, 5 (5), 378-389.

McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol* 2014, 87 (1035), 20130676.

Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med* 2013, 17 (1), 30-54.

Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Wang YW, Murray D. Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int J Mol Sci* 2013, 14 (11), 22409-22435.

Olcina M, Lecane PS, Hammond EM. Targeting hypoxic cells through the DNA damage response. *Clin Cancer Res* 2010, 16 (23), 5624-5629.

Olcina MM, Foskolou IP, Anbalagan S, Senra JM, Pires IM, Jiang Y, Ryan AJ, Hammond EM. Replication stress and chromatin context link ATM activation to a role in DNA replication. *Mol Cell* 2013, 52 (5), 758-766.

Olcina MM, Hammond EM. Hypoxia and the DNA Damage Response. In: Melillo G (ed.), *Hypoxia and Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities*. Springer New York, New York, NY, 2014, s 21-41.

Oliva-Trastoy M, Berthouaud V, Chevalier A, Ducrot C, Marsolier-Kergoat MC, Mann C, Leteurtre F. The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene* 2007, 26 (10), 1449-1458.

Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2003, 5 (8), 741-747.

Parssinen J, Alarmo EL, Karhu R, Kallioniemi A. PPM1D silencing by RNA interference inhibits proliferation and induces apoptosis in breast cancer cell lines with wild-type p53. *Cancer Genet Cytogenet* 2008, 182 (1), 33-39.

Pechackova S, Burdova K, Benada J, Kleiblova P, Jenikova G, Macurek L. Inhibition of WIP1 phosphatase sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to MDM2 antagonist nutlin-3. *Oncotarget* 2016, 7 (12), 14458-14475.

Pechackova S, Burdova K, Macurek L. WIP1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy. *J Mol Med (Berl)* 2017, 95 (6), 589-599.

Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 2010, 17 (5), 421-433.

Richter M, Dayaram T, Gilmartin AG, Ganji G, Pemmasani SK, Van Der Key H, Shohet JM, Donehower LA, Kumar R. WIP1 phosphatase as a potential therapeutic target in neuroblastoma. *PLoS One* 2015, 10 (2), e0115635.

Schmitt CA. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1775 (1), 5-20.

Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5 (5), 343-354.

Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 2000, 14 (16), 1983-1991.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003, 3 (10), 721-732.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2012, 33 (4), 207-214.

Semenza GL. AJP-Cell Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015, 309 (6), C349.

Semenza GL. A compendium of proteins that interact with HIF-1alpha. *Exp Cell Res* 2017, 356 (2), 128-135.

Semenza GL. Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2019, 59, 379-403.

Sermeus A, Genin M, Maincent A, Fransolet M, Notte A, Leclere L, Riquier H, Arnould T, Michiels C. Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. *PLoS One* 2012, 7 (11), e47519.

Shaltiel IA, Krenning L, Bruinsma W, Medema RH. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J Cell Sci* 2015, 128 (4), 607-620.

Shimada M, Nakanishi M. Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases? *Front Oncol* 2013, 3, 8.

Shreeram S, Demidov ON, Hee WK, Yamaguchi H, Onishi N, Kek C, Timofeev ON, Dudgeon C, Fornace AJ, Anderson CW, Minami Y, Appella E, Bulavin DV. Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Mol Cell* 2006, 23 (5), 757-764.

Silva E, Ideker T. Transcriptional responses to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2019, 79, 40-49.

Soni S, Padwad YS. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncol* 2017, 56 (4), 503-515.

Spike BT, Wahl GM. p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. *Genes Cancer* 2011, 2 (4), 404-419.

Sriraman A, Radovanovic M, Wienken M, Najafova Z, Li Y, Dobbstein M. Cooperation of Nutlin-3a and a Wip1 inhibitor to induce p53 activity. *Oncotarget* 2016, 7 (22), 31623-31638.

Stolte B, Iniguez AB, Dharia NV, Robichaud AL, Conway AS, Morgan AM, Alexe G, Schauer NJ, Liu X, Bird GH, Tsherniak A, Vazquez F, Buhrlage SJ, Walensky LD, Stegmaier K. Genome-scale CRISPR-Cas9 screen identifies druggable dependencies in TP53 wild-type Ewing sarcoma. *J Exp Med* 2018, 215 (8), 2137-2155.

Sullivan R, Pare GC, Frederiksen LJ, Semenza GL, Graham CH. Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther* 2008, 7 (7), 1961-1973.

Takahashi A, Ohtani N, Hara E. Irreversibility of cellular senescence: dual roles of p16INK4a/Rb-pathway in cell cycle control. *Cell Div* 2007, 2, 10.

Terry S, Faouzi Zaarour R, Hassan Venkatesh G, Francis A, El-Sayed W, Buart S, Bravo P, Thiery J, Chouaib S. Role of Hypoxic Stress in Regulating Tumor Immunogenicity, Resistance and Plasticity. *Int J Mol Sci* 2018, 19 (10).

Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S. Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. *EMBO Rep* 2016, 17 (11), 1552-1564.

Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 2003, 22 (21), 3213-3220.

Wang B, Li D, Kovalchuk O. p53 Ser15 phosphorylation and histone modifications contribute to IR-induced miR-34a transcription in mammary epithelial cells. *Cell Cycle* 2013, 12 (13), 2073-2083.

Wang ZP, Tian Y, Lin J. Role of wild-type p53-induced phosphatase 1 in cancer. *Oncol Lett* 2017, 14 (4), 3893-3898.

Weil PA. DNA Organization, Replication, & Repair. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA (eds.), Harper's illustrated biochemistry. (13th Edition ed., Vol. 35). McGraw Hill Education, New York, 2015, s xii, 817 pages.

Welford SM, Bedogni B, Gradin K, Poellinger L, Broome Powell M, Giaccia AJ. HIF1alpha delays premature senescence through the activation of MIF. *Genes Dev* 2006, 20 (24), 3366-3371.

Wigerup C, Pahlman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther* 2016, 164, 152-169.

Wu CE, Esfandiari A, Ho YH, Wang N, Mahdi AK, Aptullahoglu E, Lovat P, Lunec J. Targeting negative regulation of p53 by MDM2 and WIP1 as a therapeutic strategy in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 2018, 118 (4), 495-508.

Xia Y, Ongusaha P, Lee SW, Liou YC. Loss of Wip1 sensitizes cells to stress- and DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2009, 284 (26), 17428-17437.

Xia ZS, Wu D, Zhong W, Lu XJ, Yu T, Chen QK. Wip1 gene silencing enhances the chemosensitivity of human colon cancer cells. *Oncol Lett* 2017, 14 (2), 1875-1883.

Yu E, Ahn YS, Jang SJ, Kim MJ, Yoon HS, Gong G, Choi J. Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2007, 101 (3), 269-278.

Zhang X, Wan G, Mlotshwa S, Vance V, Berger FG, Chen H, Lu X. Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway. *Cancer Res* 2010, 70 (18), 7176-7186.

Zhu YH, Bulavin DV. Wip1-dependent signaling pathways in health and diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012, 106, 307-325.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hatice PİLEVNELİ
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Aydın 11.10.1992
Telefon : 0 (554) 207 28 67
E-mail : haticepilevneli@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	2016- Devam ediyor
Lisans	Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2014

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

1. **FEBS** (*The Federation of European Biochemical Societies*) **2018:** 43. FEBS Kongresi Genç Araştırmacı Bursu
2. **Pilevneli H, Kartal NB, Kozacı LD, Doger F, Kılıc Eren M.** Wip1 Fosfatazın İnsan Non –Hodgkin Lenfomada Onkogen Potansiyeli, XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 26-29 Ekim 2017, Fethiye, Poster Bildirisinde İkincilik Ödülü
3. 214S200 no’lu "Protein fosfataz *PPM1D*/WIP-1’in İnsan Hodgkin Dışı (Non-Hodgkin) Lenfomada Onkogen Potansiyelinin Araştırılması" konulu 1001 Tübitak Öğrenci Bursu

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Pilevneli H, Kılıc Eren M. Effects of Salinomycin and Everolimus on Breast Cancer Stem Cells in Hypoxia. *International Journal of Innovative Approaches in Science Research* 2018, 2(1), 25-40.

2. PROJELER

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Yılı	Görev	Proje Türü
Hipoksinin meme kanseri hücre dizilerinde Wip1 fosfataz ve DNA hasarı cevabının regülasyonu üzerine etkilerinin araştırılması	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	10.000 ₺	2018-2019	Araştırmacı	Kurumsal

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. **Pilevneli H, Kartal NB, Kozacı LD, Doger F, Kılıc Eren M.** The Oncogenic Potential Of *PPM1D*/Wip-1 Phosphatase and It's Role in Modulation Of Cellular Stress Responses In Human Non-Hodgkin Lymphoma. FEBS 2018: 43th FEBS Congress, 7-12 Temmuz 2018, Prag, Çekya.
2. **Kılıc Eren M, Pilevneli H, Kartal NB, Kozacı LD, Doger F.** Wip-1 Phosphatase Is Overexpressed, Amplified and Mutated In Human Non- Hodgkin Lymphoma. Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fate and decisions, 23 - 28 Haziran 2017, Paris, Fransa.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. **Kartal NB, Pilevneli H, Kozacı LD, Doger F, Kılıc Eren M.** Wip1 Fosfatazın İnsan Non-Hodgkin Lenfomada DNA Hasarı Cevabının Modülasyonu ve Hücrel Stres Cevaplarının Aktivasyonuna Dirençte Rolü, XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 26-29 Ekim 2017, Fethiye.
2. **Pilevneli H, Kartal NB, Kozacı LD, Doger F, Kılıc Eren M.** Wip1 Fosfatazın İnsan Non- Hodgkin Lenfomada Onkogen Potansiyeli, XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 26-29 Ekim 2017, Fethiye.