



T.C.
ACIBADEM
MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TELOMERAZ GENİ PROMOTÖRÜNDE MUTASYON
İÇEREN TİROİD KANSER HÜCRELERİNİN
EPIGENETİK İLAÇLARLA HEDEFLENMESİ**

SEVİM DALVA AYDEMİR
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI







DANIŞMAN
Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer

İkinci Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Cemaliye Akyerli Boylu

İSTANBUL-2019

Anabilim Dalı: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Program: Doktora
Tez Başlığı: Telomeraz Geni Promotöründe Mutasyon İçeren Tirold Kanser Hücrelerinin Epigenetik İlaçlarla Hedeflenmesi
Öğrencinin Adı-Soyadı: Sevim DALVA AYDEMİR
Savunma Sınavı Tarihi: 03/09/2019

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Burçak VURAL İstanbul Üniversitesi	
Tez Danışmanı	Prof. Dr. M. Cengiz YAKICIER Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	
İkinci Tez Danışmanı	Dr. Öğr. Üyesi Cemaliye AKYERLİ BOYLU Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	
Üye	Doç. Dr. Emel BALOĞLU Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Yavuz OKTAY Dokuz Eylül Üniversitesi	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

03. 09. 2019

Sevim DALVA AYDEMİR



TEŞEKKÜR

Bu tez, 114C029 numaralı proje ile TÜBİTAK ve AB 7. Çerçeve Programı, Marie Curie Aksiyon CO-FUND tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, gen ifade analiz çalışmaları ABAPKO-2018-64 karar nolu projeden desteklenmiştir. Tüm deneyler ACIBADEM Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesinde 5. katta bulunan araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak, danışmanlarım Prof. Dr. Cengiz YAKICIER ve Dr. Öğr. Üyesi Cemaliye AKYERLİ BOYLU'ya doktora çalışmalarım boyunca gösterdikleri destek için çok teşekkür ederim. Danışman hocalarımla desteği, anlayışı ve yardımı olmadan bu çalışma gerçekleşmezdi. Hocalarımla çok yoğun oldukları zamanlarda dahi sorularımı cevaplayarak ve deneylerde yol göstererek bu çalışmanın gerçekleşmesine büyük katkı sağlamışlardır. Yaptığım hatalarda kızmamış, çözüm bulmam konusunda yardımcı olmuşlardır. Sonuçlar beklendiği gibi çıkmadığında ya da motivasyonum azaldığında her zaman destek olmuşlardır. Ayrıca, iki yıl boyunca Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğrencilerine “Medikal Biyoloji” derslerini vermeme olanak sağladığı ve öğretim görevliliği konusunda deneyim kazanmama olanak sağladığı için sayın Prof. Dr. Cengiz YAKICIER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez izleme komitemde bulunan değerli hocalarımla, Doç. Dr. Emel BALOĞLU ve Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR çalışmanın yönlendirilmesinde değerli yorumlarıyla önemli katkılar sağlamışlardır.

ACIBADEM Genetik Tanı Merkezi (LABGEN)'de çalışmalarım sırasında bana destek olan, aynı zamanda Biyokimya ve Moleküler Biyoloji (BMB) Doktora Programı öğrencileri Şirin YÜKSEL KILIÇTURGAY ve Hilal KESKİN'e teşekkürü bir borç bilirim. Hem Şirin hem de Hilal, verdiğim genomik DNA'ların sekanslanmasında ellerinden geleni yapmışlar ve çalışmama destek olmuşlardır. Ayrıca, tez çalışmalarım sırasında, deneylerim sırasında danıştığım, önerilerini değerlendirdiğim ve sekans analizleri ile ilgili sorularımı rahatça sorabildiğim yegâne kişi Şirin arkadaşım olmuştur. Tüm yardımları ve önerileri için de Şirin'e ayrıca çok

teşekkür ederim. Azra AKIN arkadaşımıza da tez çalışmam için gerçekleştirdiği *BRAF* ve *KRAS* mutasyon çalışması için teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında, bire-bir eğitim verdiğim ve deneylerimin yapılması veya analizi konusunda bana destek olan sevgili lisans öğrencilerim Alara ERENEL ve Doğan BAŞOĞLU'na teşekkür ederim. Alara, saat 18.00'den sonra hücre kültürü eğitimi vermeme razı olmuş ve yazın, yokluğumda, hücrelerimin kültürde kalmasını sağlayan, desteği ve yaptıkları benim için paha biçilemez olan öğrencimdir. Doğan ise, başka bir üniversiteden gelmesine rağmen hem laboratuvarında hem de bilgisayar üzerinde yaptığım analizlerde, özellikle son proje dönemimde, çalışmalarına çok büyük destek vermiştir. Öğrencilerimin destek ve yardımları olmadan bu çalışma gerçekleşmezdi.

BMB Programı'yla ve derslerle ilgili her türlü soruma cevap veren, yardımlarını ve desteğini hiç eksik etmeyen sevgili Dr. Öğr. Üyesi Yasemin FURTUN UÇAL'a da ayrıca çok teşekkür ederim. İki yıl önce mezun olarak hepimize bir örnek teşkil ettiğin için teşekkürler Yasemin.

Son olarak en derin saygı ve sevgilerimi annem Klara DALVA, babam İzak DALVA ve kardeşim Yusuf DALVA'ya sunarım. Hepsi, ihtiyacım olan her an, ayrı ayrı destek ve motivasyon sağlamışlardır. Annem işler kötü gidip motivasyonumu kaybettiğim her zaman beni pozitif düşünmeye davet etmiş ve problemlerin çözümüne destek olmuştur. Babam şakalarıyla zor zamanlarda destek olmuştur. Kardeşim beni idolü olarak görmüş ve ihtiyacım olduğunda yazdığı yaratıcı notlarıyla ve sözleriyle beni hep desteklemiştir. Son olarak, sevgili eşim Kadir AYDEMİR olmadan, stresle baş edemez, bu çalışmayı tamamlayamazdım. Her zaman beni dinleyen, destekleyen, sakinleştiren ve takdir eden eşime çok çok teşekkür ederim. Senin anlayışın, güler yüzün ve desteğin olmadan kendimi bu kadar güçlü ve motive hissedemezdim. Tüm yaptıkların için çok teşekkürler. İyi ki varsın.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiv
TABLO LİSTESİ	xvi
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
1.1. Çalışmanın Amacı	4
1.2. Çalışmanın Özgünlüğü ve Bilime Katkısı	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Telomerler, Telomeraz ve Kanser	6
2.2. Telomeraz Aktivitesini Kontrol Eden Mekanizmalar	8
2.3. Transkripsiyonel Regülasyon	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.4. Epigenetik Modifikasyonlar	9
2.5. Telomeraz Aktivitesini Arttıran <i>TERTp</i> Mutasyonları	11
2.6. <i>TERTp</i> 'unda Tespit Edilen Mutasyonlar	12
2.6.1. C228T ve C250T	12
2.6.1.1. C228T	12
2.6.1.2. C250T	14
2.6.1.3. <i>TERTp</i> 'da tespit edilen diğer somatik mutasyonlar	14
2.7. Yüksek Sıklıkla <i>TERTp</i> Mutasyonu Varlığı Tespit Edilen Kanserler	15
2.7.1. Hepatosellüler karsinom (HK)	15
2.7.1.1. Genel bilgiler	15
2.7.1.2. <i>TERTp</i> mutasyonlarının HK gelişimindeki rolü	16
2.7.2. Tiroid kanseri (TK)	17
2.7.2.1. Genel bilgiler	17
2.7.2.2. Tiroid kanserinde genetik değişimler	18
2.7.2.3. <i>TERTp</i> mutasyonları	18
2.7.3. Glioblastom (GBM)	19
2.7.3.1. Genel bilgiler	19

2.7.3.2.	<i>IDH</i> ve <i>TERTp</i> mutasyonları	20
2.7.4.	Melanom	21
2.7.4.1.	Genel bilgiler	21
2.7.4.2.	<i>TERTp</i> mutasyonlarının kanser gelişimindeki rolü	21
2.7.5.	Mesane kanseri (MK)	22
2.7.5.1.	Genel bilgiler	22
2.7.5.2.	<i>TERTp</i> mutasyonlarının MK gelişimindeki rolü	23
2.8.	Telomeraz Ekspresyonunu Hedefleyen Tedaviler	23
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1.	GEREÇ	25
3.1.1.	Farklı orijinli hücre hatları	25
3.1.2.	Hücre kültürü solüsyonları	28
3.1.2.1.	FBS'nin ısıyla inaktive edilmesi	28
3.1.2.2.	Besiyerlerinin hazırlanması	29
3.1.3.	Polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kullanılan çözeltiler	30
3.1.3.1.	Steril distile su hazırlanması	30
3.1.3.2.	dNTP kokteyli hazırlanması	30
3.1.3.3.	Primerlerin hazırlanması	31
3.1.4.	Agaroz jel elektorforez çözeltileri ve kimyasalları	33
3.1.4.1.	Etidyum bromür (EtBr)	33
3.1.4.2.	10X TBE (Tris-borik asit-EDTA)	33
3.1.4.3.	Agaroz jelinin hazırlanması	34
3.1.5.	Kullanılan diğer kimyasallar ve kitler	34
3.1.5.1.	Sulforodamin B (SRB) testi için hazırlanan çözeltiler	35
3.1.6.	Cam malzemeler	35
3.1.7.	Plastik malzemeler	36
3.1.8.	Kullanılan cihazlar	36
3.2.	YÖNTEM	36
3.2.1.	Hücre kültürü yöntemleri	36
3.2.1.1.	Donmuş hücrelerin çözdürülmesi	36
3.2.1.2.	Hücrelerin pasajlanması (sub-culture)	37
3.2.1.3.	Hücrelerin dondurulması	38

3.2.1.4.	Hücre peletlerinin dondurulması	39
3.2.2.	Genomik DNA izolasyonu	39
3.2.3.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	39
3.2.4.	Agaroz jel elektroforezi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.5.	Dizi analizi	42
3.2.5.1.	Tam boy <i>TERT</i> dizilenmesi	42
3.2.5.2.	<i>BRAF</i> ve <i>KRAS</i> mutasyon analizi	42
3.2.6.	<i>M.spp</i> testi	43
3.2.6.1.	PZR ile <i>M.spp</i> testi	43
3.2.6.2.	<i>M.Spp</i> pozitif hücrelerin antibiyotik ile tedavisi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.7.	Epigenetik ilaç kütüphanesi	44
3.2.8.	Plakaya ekilen hücre sayısının belirlenmesi	45
3.2.8.1.	<i>M.spp</i> testinden önce plakaya ekilen hücre sayısının belirlenmesi	45
3.2.8.2.	<i>M.spp</i> testi sonrası plakaya ekilen hücre sayısının belirlenmesi	45
3.2.8.3.	RPMI ve DMEM bazlı besiyerinde plakaya ekilen hücre sayısının karşılaştırılması	45
3.2.8.4.	DMSO varlığında hücre ekim yoğunluğunun karşılaştırılması	47
3.2.9.	İlaç inkübasyonları	48
3.2.9.1.	Hücrelerin epigenetik ilaç kütüphanesi ile inkübasyonu	48
3.2.9.2.	KTC2 hücrelerine özgül olan ilaçlar ile “canlanma” testinin gerçekleştirilmesi	49
3.2.9.3.	Zamana bağlı hücre canlılığı analizi	50
3.2.9.4.	Doza bağlı hücre canlılığı analizi	50
3.2.9.5.	PF-03814735’in tüm tiroid hücre hatlarında, hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması	52
3.2.10.	PF-03814735 ile tedavi sonrasında telomeraz geni (<i>TERT</i>) gen ifade seviyelerinin araştırılması	52
3.2.10.1.	Hücre peletlerinin hazırlanması	52
3.2.10.2.	RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	54
3.2.10.3.	RT-qPZR çalışması	55
3.2.10.4.	<i>TERT</i> geni kat sayısal değişim seviyelerinin belirlenmesi	55

3.2.11. SRB testi ile hücre canlılığı analizi	56
3.2.11.1. Gerçek abzorbars değęerlerinin hesaplanması	57
3.2.11.2. SRB protokolünün optimizasyonu	57
3.2.11.3. SRB boyası dilusyon testi	57
3.2.11.4. Kitte kullanılan solüsyonların yerine laboratuvarıda oluşturulan çözeltilerin kullanılması	58
3.2.11.5. Hücre büyümesinin engellenmesi (%GI) için yapılan hesaplamalar	59
3.2.11.6. Doza bağlı hesaplamalar	60
4. BULGULAR	61
4.1. Hücrelerin <i>TERTp</i> Mutasyon Profilinin Belirlenmesi	61
4.1.1. Hücrelerin büyütülmesi, donmuş hücre stoklarının ve peletlerinin hazırlanması	61
4.1.2. Supernatanların <i>M.spp</i> testi için kullanılması	63
4.1.3. Hücre peletlerinin DNA izolasyonu için kullanılması	65
4.1.4. Farklı hücre hatlarında <i>TERTp</i> mutasyon profilinin belirlenmesi	65
4.1.5. Hücrelerin tam boy <i>TERTp</i> dizi analizi	68
4.2. Tiroid Kanseri Hücrelerinin Epigenetik Kütüphane ile Taranması	70
4.2.1. SRB protokolünün optimizasyonu	70
4.2.1.1. Farklı SRB boya dilusyonları ile SRB testinin tekrar edilmesi	70
4.2.1.2. Kitte kullanılan çözeltiler yerine laboratuvarıda oluşturulan çözeltilerin kullanılması	72
4.2.2. Ekilen hücre sayısının belirlenmesi	73
4.2.2.1. <i>M.spp</i> enfeksiyonu tedavisinden sonra hücre ekim yoğunluğunun araştırılması	73
4.2.2.2. Hücre büyüme eğrilerinin RPMI ve DMEM bazlı besiyerinde karşılaştırılması	75
4.2.2.3. Hücre ekim yoğunluğunun DMSO varlığında karşılaştırılması	75
4.2.3. Hücre hatlarında <i>TERTp</i> mutasyonu dışında tespit edilen ikincil mutasyonlar	77
4.2.4. İlaç tedavileri	78
4.2.4.1. Hücrelerin epigenetik ilaç kütüphanesi ile inkübasyonu	78
4.2.4.2. KTC2 hücrelerine özgül olan ilaçların değęerlendirilmesi	82

4.2.4.3.	KTC2 hücrelerine özgül olan ilaçlar ile “canlanma” testinin gerçekleştirilmesi	83
4.2.4.4.	Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi	83
4.2.4.5.	PF-03814735 için optimum inkübasyon dozunun belirlenmesi	87
4.2.4.6.	Tüm tiroid hücre hatlarının PF-03814735 ile tedavi edilmesi	87
4.2.4.7.	PF-03814735 ile tedavi sonrasında <i>hTERT</i> ifade (mRNA) seviyelerinin belirlenmesi	89
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	92
5.1.	Tiroid, HK, GBM ve Melanom Orijinli Hücrelerde <i>TERTp</i> Mutasyon Profilinin Araştırılması	92
5.1.1.	Tiroid orijinli hücre hatları	92
5.1.2.	HK orijinli hücre hatları	93
5.1.3.	GBM orijinli hücre hatları	94
5.1.4.	Melanom hücrelerinin <i>TERTp</i> mutasyon profilinin araştırılması	94
5.2.	Tam Boy <i>TERTp</i> Sekansı Elde Edilen Hücrelerde Tek Nükleotit Polimorfizmlerinin (SNP) Araştırılması	95
5.3.	Tiroid Hücrelerinde İkincil <i>BRAF</i> Mutasyonlarının Araştırılması	96
5.4.	Tiroid Hücrelerinin Epigenetik İlaç Kütüphanesi ile Taranması	97
5.5.	Optimum İlaç Doz ve Zamanın Belirlenmesi	98
5.6.	Tüm Folliküler Orijinli Tiroid Hücre Hatlarının PF-03514735 ile İnkübasyonu	98
5.7.	PF-03814735 ile Tedavi Sonrasında <i>hTERT</i> Gen İfadesindeki Değişimin Araştırılması	100
5.8.	Çalışma Sırasında Karşılaşılan Problemler	101
5.8.1.	PZR sırasında karşılaşılan problemler	101
5.8.2.	Hücrelerin <i>M.spp</i> ile enfekte olması	101
5.8.3.	Hücrelerin ilaç inkübasyonlarının uzun sürmesi	102
5.9.	Çalışmanın Gelecek Planları	102
5.10.	Sonuç	104
6.	KAYNAKLAR	105
7.	EK – MAKALE	122
	ÖZGEÇMİŞ	131

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

% GC	Guanin ve sitozin nükleotit yüzdeleri
% GI	Hücre büyümesinin engellenmesinin yüzdesi
AFTK	Az farklılaşmış tiroid kanseri
ATK	Anaplastik tiroid kanseri
BÇ	Baz çifti
BMB	Biyokimya ve moleküler biyoloji
CTL	Sitotoksik T lenfosit hücreleri
DMEM	Glutamin ve piruvat içermeyen Eagle'ın modifiye edilmiş ortamı
DMSO	Dimetil sulfoksit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EKH	Embriyonik kök hücre
FBS	Fötal bovin serumu
FGFR3	Fibroblast büyüme faktör reseptörü 3
FTK	Foliküler tiroid kanseri
GABP	GA-bağlanan protein
GBM	Glioblastom
gDNA	Genomik DNA
HK	Hepatosellüler karsinom
<i>hTERC</i>	İnsan telomeraz RNAsını sentezleyen gen
<i>hTERT</i>	İnsan telomeraz revers transkriptaz geni
IC-50	%50 azalmaya neden olan ilaç konsantrasyonu
IDH	İzositrat dehidrogenaz
Ln	Bir sayının doğal logaritması
LOH	Heterozigosite kaybı
MEM	Eagle'ın minimum esansiyel ortamı

MGMT	O6-Metilguanin DNA metiltransferaz
MK	Mesane kanseri
<i>M.spp</i>	<i>Mikoplazma spp</i>
EOAA	Esansiyel olmayan amino asit solüsyonu
PBMC	Hasta kanından elde edilen periferik mononükleer hücreler
PBS	Kalsiyum ve magnezyum içermeyen Dulbecco'nun fosfat tamponlu salin çözeltisi
PI3K	Fosfoinositol 3 kinaz
PS	Penisilin streptomisin
PTC	Papiller tiroid kanseri
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RA	Retinoik asit
Sa	Saat
SNP	Tek nükleotit polimorfizminin
SRB	Sulforodamin B
TBB	Transkripsiyon başlangıç bölgesi
TK	Tiroid kanseri
<i>TERTp</i>	Telomeraz gen promotörü
TF	Transkripsiyon faktörü
Tm	Primer Erime sıcaklığı
TMD	Temozolomid
TKA	Trikloroasetik asit
TSA	Trikostatin A
TT	Tekrarlayan tedavi
UV	Ultraviyole ışın
WT	Belirli bir gende mutasyon taşımadığı gösterilen hücre hattı

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1: Telomerlerin kısalması sonucunda hücrelerin senesense/krize girmesi	7
Şekil 2.2: Telomeraz ölümsüzleşmiş hücrelerde aktif hale gelir	8
Şekil 2.3: Telomeraz aktivitesini kontrol eden farklı mekanizmalar	9
Şekil 2.4: <i>hTERT</i> gen promotör bölgesinin hücre içi sinyal yolları ile moleküler regülasyonu	10
Şekil 2.5: <i>TERTp</i> mutasyonları yeni (de novo) ETS TF bağlanma bölgeleri oluşturur	12
Şekil 3.1: Hücrelerin epigenetik ilaç kütüphanesi ile inkübasyonu	48
Şekil 3.2: Hücrelerin seçilen sekiz ilaç ile inkübasyonu sonrasında yapılan canlanma testi	49
Şekil 3.3: CUDC-101 ve PF-03514735 ile yapılan zamana bağlı hücre canlılığı analizi	51
Şekil 3.4: PF-03514735 ile doza bağlı hücre canlılığı analizi	51
Şekil 3.5: PF-03814735'in tüm tiroid hücre hatlarında, hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması	53
Şekil 3.6: PF-03514735 ile tedavi sonrası hücre pelletlerinin hazırlanması	55
Şekil 3.7: Gerçek absorbans değerlerinin hesaplanması	57
Şekil 3.8: SRB protokolünün optimizasyon çalışmaları	58
Şekil 3.9: Hücre büyümesinin engellenmesi hesaplamaları	60
Şekil 4.1: <i>M.spp</i> enfeksiyonunun değişimli kullanılan iki antibiotik ile tedavi edilmesi	64
Şekil 4.2: Tam boy telomeraz promotör bölgesinin PZR optimizasyonu	66
Şekil 4.3: HK, TK ve melanom hücre hatlarında proksimal <i>TERTp</i> amplifikasyonu	68
Şekil 4.4: GBM hücreleri için PCR optimizasyon çalışmaları ve GBM hücre hatlarında proksimal <i>TERT</i> promotorunun amplifikasyonu	69
Şekil 4.5: HK, TK ve GBM hücre hatlarında distal <i>TERTp</i> 'unun amplifikasyonu	69
Şekil 4.6: Plaka okuyucuda alınan abzorban değerlerinin karşılaştırılması	71

Şekil 4.7: Farklı SRB boya dilüsyonları kullanarak elde edilen abzorban değerlerinin karşılaştırılması	72
Şekil 4.8: Kite kullanılan çözeltiler ile laboratuvarda hazırlanan kimyasalların karşılaştırılması	73
Şekil 4.9: M.spp enfeksiyonunun tedavisi öncesi ve sonrasında hücre büyüme eğrilerinin karşılaştırılması	75
Şekil 4.10: Dört farklı yoğunlukta ekilen TPC1 ve KTC1 hücrelerinin büyüme eğrilerinin karşılaştırılması	76
Şekil 4.11: Tiroid hücre hatları için DMEM veya RPMI besiyerinde elde edilen optimum büyüme eğrileri	77
Şekil 4.12: DMSO varlığında hücre büyüme eğrilerinin karşılaştırılması	
Şekil 4.13: FRO ve WRO hücrelerinde BRAF V600E mutasyon varlığının minidizileme ile araştırılması	78
Şekil 4.14: FRO ve WRO hücrelerinde KRAS ekzon 2 (kodon 12/13) mutasyon varlığının minidizileme ile araştırılması	81
Şekil 4.15: Epigenetik ilaçların hücre büyümesi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi	83
Şekil 4.16: Seçilen sekiz ilacın hücre büyümesi üzerindeki etkisi	86
Şekil 4.17: Seçilen sekiz ilaç ile yapılan canlanma deneyi sonrası hücre büyümesinin karşılaştırılması	86
Şekil 4.18: CUDC-101 ve PF-03814735 ile inkübe edilen hücrelerde zamana bağlı %GI'ın araştırılması	87
Şekil 4.19: Artan dozlarda PF-03814735 ile doza bağlı %GI'ın araştırılması	89
Şekil 4.20: Tüm tiroid hücrelerinin 50 nM PF-03814735 ile 72 sa ve TT (72sa+72sa) ile inkübasyonu	90
Şekil 4.21: PF-03814735 ile tedavi sonrasında <i>hTERT</i> gen ifadesindeki kat sayısal değişim değerleri	92

TABLO LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo 2.1: Beş farklı solid tümörlerde, <i>TERTp</i> mutasyonları dışında görülen genetik/epigenetik değişimler ve çevresel risk faktörleri	16
Tablo 3.1: Farklı kaynaklardan elde edilen hücre hatları	26
Tablo 3.2: Hücre kültüründe kullanılan reaktifler	29
Tablo 3.3: Farklı orijinli hücre hatlarının büyütüldüğü besiyerleri	29
Tablo 3.4: PZR için kullanılan solüsyonlar	31
Tablo 3.5: <i>TERT</i> promotorunun çoğaltılması için yapılan optimizasyon çalışmalarında kullanılan primerler	32
Tablo 3.6: <i>TERT</i> promotorunun tam boy sekanslanması için kullanılan primerler	32
Tablo 3.7: RT-qPZR reaksiyonu için kullanılan primerler	32
Tablo 3.8: Tam boy <i>TERTp</i> sekansının elde edilmesi için kullanılan ek primerler	33
Tablo 3.9: Agaroz jel elektroforezi için kullanılan solüsyonlar	33
Tablo 3.10: Çalışmada kullanılan kimyasallar	34
Tablo 3.11: Çalışmada kullanılan kitler	35
Tablo 3.12: Çalışmada kullanılan plastik malzemeler	36
Tablo 3.13: Çalışmada kullanılan cihazlar	37
Tablo 3.14: Optimizasyon için kullanılan PZR koşulları	41
Tablo 3.15: <i>TERTp</i> amplifikasyonu için kullanılan PZR koşulları	41
Tablo 3.16: <i>M.spp</i> testi için kullanılan PZR koşulları	44
Tablo 3.17: Satın alınan epigenetik ilaç kütüphanesinin içinde bulunan ilaçların sınıflandırılması	46
Tablo 3.18: Epigenetik ilaç kütüphanesinde bulunan ilaçların, IC-50 değerlerine göre sınıflandırılması	47
Tablo 3.19: cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon koşulları	55
Tablo 3.20: RT-qPZR çalışmasında kullanılan bileşenler	56
Tablo 3.21: RT-qPZR çalışması için kullanılan reaksiyon koşulları	56

Tablo 4.1: Açılan hücre hatlarının <i>M.spp</i> test sonucu, dondurulan vialle ve peletler	62
Tablo 4.2: <i>M.spp</i> pozitif olan hücre hatlarının son durumu	64
Tablo 4.3: Açılan hücre hatlarının <i>TERTp</i> mutasyon profili	67
Tablo 4.4: Farklı kaynaklardan elde edilen hücre hatlarının <i>TERTp</i> mutasyon profilinin incelenmesi	70
Tablo 4.5: TK hücrelerinin <i>BRAF</i> ve <i>KRAS</i> mutasyon profili	79
Tablo 4.6: Özgül etkisi olan ilaçların %GI ve doza/zaman bağımlılık açısından değerlendirilmesi	82
Tablo 4.7: KTC2 hücrelerinde etkili olan 8 ilacın tüm hücrelerde %GI ve doza/zaman bağımlılık bilgileri	85
Tablo 4.8: KTC2 hücrelerine özgül etkisi olan sekiz ilaç ile elde edilen canlanma yüzdeleri	87
Tablo 4.9: PF-03814735 ile tedavi sonucunda <i>TERT</i> gen ifadesindeki kat sayısal değişim değerleri	92

ÖZET

Tiroid kanseri (TK) dünya çapında yaygın bir hastalık olup yeni terapötik hedeflerin tanımlanması önemlidir. Somatik hücrelerde, telomeraz (*hTERT*) ekspresyonunun aktivasyonu, hücrelerin replikatif senesensden çıkmasını ve apoptoz mekanizmalarından kaçmasını sağlayarak, tümör gelişimi için kritik olmaktadır. Birçok kanser tipinde, *hTERT* promotöründe (*TERTp*) tekrarlayan mutasyonlar (C228T veya C250T) tespit edilmiş, mutasyon sonucunda artan telomeraz aktivitesi, telomerazı, epigenetik anti-kanser ilaç inovasyonu için yeni bir hedef haline getirmiştir. Bu tez çalışmasının amacı, farklı orijinli kanser hücre hatlarının *TERTp* mutasyon profilini belirleyerek, epigenetik ilaç kütüphanesi (EİK) ile taramak ve bu ilaçların hücre büyümesi üzerindeki etkisini araştırmaktır. İlk aşamada, üç farklı TK hücre hattı (*TERTp* mutant (TPC1), *BRAF/TERTp* mutant (KTC2) ve *TERTp*'da mutasyon içermeyen (WRO)) EİK ile taranmış ve KTC2 hücrelerine özgü sekiz ilaç belirlenmiştir. CUDC-101 ve PF-03814735 ilaçlarının hücre büyümesi üzerindeki etkisi, ilaç tedavisinden sonra taze besiyeri eklenmesine rağmen azalmamıştır. Tekrarlayan tedavi sonucunda, PF-03814735, WRO hücrelerine kıyasla, KTC2 hücrelerinde daha etkili olmuş, CUDC-101 ise her iki hücre tipinde de benzer etki göstermiştir. *TERTp*'da mutasyonu taşıyan ve taşımayan sekiz tiroid orijinli hücre hattı, PF-03414735 ile muamele edilmiş ve ilacın maksimum etkisi, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde görülmüştür. Bu çalışmada, PF-03814735 adlı Aurora kinaz inhibitörünün, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan TK hücrelerinde maksimum etki gösterdiği koşullar belirlenmiştir. Bu tedavinin ileride C228T mutasyonu taşıyan TK hücrelerinde ve tüm tümörlerde etkili olabileceği söz konusudur. Bulgularımız, TK için epigenetik ilaç tasarımı ve geliştirilmesine yönelik yeni tedavi rejimlerinin belirlenmesindeki çabayı temsil etmektedir.

Anahtar sözcükler: Epigenetik, Farmasötik ürünler, PF-03814735, Telomeraz, Tiroid kanseri

SUMMARY

Targeting Thyroid Cancer Cells Harboring Telomerase Gene Promoter Mutations with Epigenetic Drugs

Thyroid cancer (TC) is widespread worldwide and defining new therapeutic targets is important. By activating telomerase (*hTERT*) expression, somatic cells can overcome replicative senescence and induce apoptotic pathways, both necessary for tumor growth. Multiple cancer types harbor recurrent *hTERT* promoter (*TERTp*) mutations (C228T or C250T), which increase telomerase activity and make telomerase a novel target for epigenetic anti-cancer drug innovation. The objective of this thesis is to determine *TERTp* mutation profile of cell lines with different cellular origin, screen cells with an epigenetic drug library (EDL) and investigate the effects of these drugs on cellular growth. At the first stage, three TC cell lines (*TERTp* mutant (TPC1); *BRAF/TERTp* mutant (KTC2) and wildtype *TERTp* (WRO)) were screened with EDL and eight drugs specific for KTC2 were determined. Effects of CUDC-101 and PF-03814735 on cell growth were not diminished after adding fresh media post-treatment. Following repeated treatment, PF-03814735 was more effective on KTC2 than WRO whereas CUDC-101 showed similar effects on both cell types. Eight thyroid originated cell lines carrying wildtype or mutant *TERTp* were treated with PF-03814735 and the maximum effect was observed in cells carrying C228T mutation. In this study, conditions at which maximum effect of PF-03814735, an Aurora kinase inhibitor, was determined on TC cells with C228T mutation. In the future, this therapy is expected to be effective for treating TC cells and all tumors with C228T *TERTp* mutation. Our results represent the effort for determining new optimal therapy regimens towards epigenetic drug design and development for TC.

Key words: Epigenetics, Pharmaceutical products, PF-03814735, Telomerase, Thyroid cancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ökaryotik kromozomların uç kısımlarında, telomer adı verilen "TTAGGG" tekrarlarından oluşan ve bu sekansa özgü proteinlerin bağlandığı özel yapılar bulunmaktadır (1). Kromozomların uç kısımları her hücre bölünmesi ile kısalır ve bu durum uç replikasyon problemine yol açar (2). Somatik hücrelerde, her hücre bölünmesinde 25-100 baz arası kayıp olduğu tahmin edilmektedir (3, 4). Telomer uzunluğu, ciddi anlamda azaldığında, kromozomların birleşmesini önlemek amacıyla, hücreler hücre döngüsünü durdururlar ve gerekirse apoptoz veya senesens (yaşlanma) evresine girerler (5, 6).

Eşey hücreleri, bölünme potansiyeli yüksek olan hücreler ve kanser hücreleri ise, sitokin ve büyüme faktörleri varlığında, telomerlerin kısalmasını önlemek için 5'inci kromozomda yer alan (5p) insan telomeraz genini (*hTERT*) aktifleştirir (7-9). Revers transkriptaz aktivitesi olan telomeraz enzimi, *hTERC* geni tarafından kodlanan telomer RNA'sını kullanarak, kromozomların sonlarındaki telomer sekanslarının uzamasını sağlar ve uç replikasyon probleminin yaşanmasına engel olur (10). Farklılaşma sinyalleri varlığında ise *hTERT* transkripsiyonunun aktivasyonu durdurulur (11-13).

Kanser hücrelerinde telomeraz geni hep aktif durumdadır (8). Horn ve ark., 2013 yılında, melanoma hastalarında, telomeraz gen promotöründe (*TERTp*), C228T tek nokta mutasyonunun enzim aktivitesini arttırdığını göstermiştir (14). Aynı yıl Huang ve ekibi, melanoma dışındaki birçok solid tümör kanserinde (ör: tiroid kanseri [TK], glioblastom (GBM), hepatosellüler karsinom [HK] ve mesane kanserlerinde [MK]) yüksek sıklıkta *TERTp* C228T (-124C>T) veya C250T (-146C>T) mutasyonu olduğunu tespit etmiştir (14-26). Her iki nokta mutasyonu sonucunda da yeni ETS transkripsiyon faktör bağlanma noktaları oluştuğu ve transkripsiyon aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (14, 17, 27, 28). Pek çok çalışmada, C228T *TERTp* mutasyonunun C250T'den daha sık görüldüğü ortaya konmuştur (16, 17, 19-26, 29-36).

Promotör mutasyonların dışında, telomeraz aktivitesinin epigenetik modifikasyonlarla değişime uğradığı birçok çalışmada gösterilmiştir (37-40). Örneğin, farklılaşma sinyali varlığında bile, trikostatın A (TSA) tedavisi ile histon deasetilasyon aktivitesi durdurulmuş, telomeraz enzim aktivitesinin artabildiği tespit edilmiştir (13).

1.1. Çalışmanın Amacı

TERTp mutasyonlarının, melanomalarla birlikte HK, TK, GBM ve MK'da yüksek sıklıkta görülmesi ve telomeraz geninde epigenetik modifikasyonların kritik öneme sahip olması nedeniyle, bu çalışmanın amacı **farklı tip kanser hücre hatlarının** *TERTp* mutasyon profilini belirleyerek, epigenetik ilaç kütüphanesi ile taramak ve bu ilaçların hücre büyümesi üzerindeki etkisini araştırmaktır. Tiroid orijinli hücrelerin epigenetik ilaçlarla hedeflenmesi amacıyla, öncelikle epigenetik ilaç kütüphanesi tarama metodunun optimize edilmesi planlanmıştır. Seçilen ilaçların doz ve zamana bağımlılık testlerinin yapılması ve bu ilaçların, tüm tiroid orijinli hücrelerde tedavide kullanılabilmesi için model bir çalışmanın yapılması amaçlanmıştır. Ek olarak, etkisi gösterilen ilaçların diğer kanser hücrelerinde de test edilmesi hedeflenmiştir.

1.2. Çalışmanın Özgünlüğü ve Bilime Katkısı

Pek çok tümörde telomeraz enzim aktivitesi yüksektir ancak şu ana kadar telomeraz enzim veya RNA aktivitesini azaltmak veya engellemek için yapılan çalışmalarda istenilen başarıya ulaşılamamıştır (41, 42). 2013 yılı sonrasında yapılan çalışmalarda ise, telomeraz promotöründe görülen iki nokta mutasyonunun birçok kanserde şu ana kadar en yüksek sıklıkta tespit edildiği gösterilmiştir (17, 19). Literatürde bulunan pek çok çalışmada telomeraz promotör mutasyon sıklığı araştırılmış ancak hiçbir çalışma, bu kanserlerin tedavisi üzerine yoğunlaşmamıştır. Bu nedenle, *TERTp* mutasyonlarını taşıyan kanserlerin ilaçlarla hedeflenerek tedavi edilmesi kritik önem ve aciliyet teşkil etmektedir.

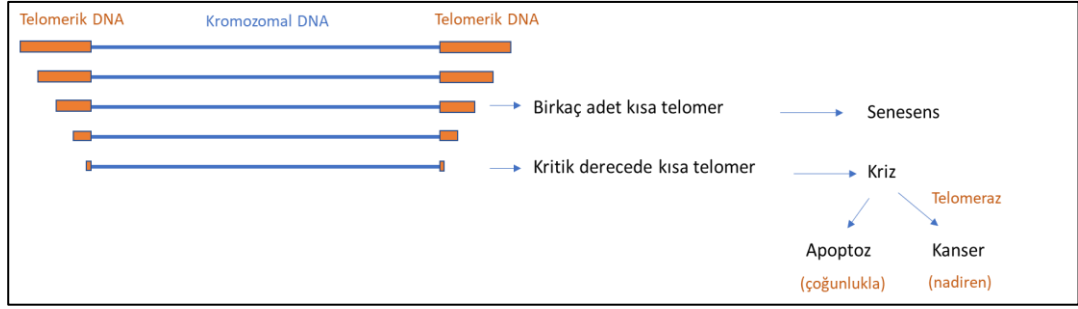
Bu çalışmada, ilk aşamada, farklı kanser türlerine ait hücre hatlarında *TERTp* mutasyon profillerinin belirlenmesi hedeflenmiştir (43). Bu hücrelerden bazılarının *TERTp* mutasyonları ilk defa bizim araştırmamızda belirlenecektir. Daha sonra, farklı tiroid hücrelerinin epigenetik ilaç kütüphanesi ile taranması ve mutasyon taşıyan hücrelere özgül ilaç(lar) belirlenmesi amaçlanmıştır. İlk defa bu çalışmada, *TERTp* mutasyonu taşıyan tiroid kanserlerinde etkili olup, taşımayanlarda etkisiz ya da daha az etkili olan epigenetik ilaçların tespit edilmesi hedeflenmektedir. Farklı çalışmalarda C250T mutasyonuna kıyasla, C228T mutasyonun daha sık görülmesinden dolayı ilk ilaç taramasında C228T mutasyonu taşıyan ve hiç mutasyon taşımayan hücreler karşılaştırılacaktır. Daha sonra yapılacak uygulamalarda seçilen ilaçların etkisi C228T veya C250T taşıyan hücrelerde araştırılacaktır. Dolayısıyla, çalışmamızda, *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde seçilen epigenetik ilaçların etkisi karşılaştırılacak ve ilaçların C228T mutasyonu taşıyan hücrelere özgü olup olmayacağı belirlenecektir. Son olarak, epigenetik ilaç taraması sonunda seçilen ve C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan tiroid hücrelerine özgün ilaç(lar)ın diğer dört kanser modelinde (HK, GBM, MK ve melanom) de etkili olup olmayacağı araştırılacaktır. Sonuç olarak, epigenetik ilaç(lar)ın C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan kanser hücrelerinde kullanılıp kullanılmayacağı ilk defa bu çalışmada belirlenecektir. Epigenetik değişiklikler, genetik mutasyonlardan farklı olarak tersinir özelliğe sahiptir ve uygulanan tedavilerle bu modifikasyonları ters çevirmek mümkündür. Bu çalışmada tespit edilecek epigenetik ilaç(lar)ın kanser hücrelerinde mevcut olan modifikasyonları ters çevirmesi ve ileride C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan farklı orijinli kanserlerin tedavisinde kullanılabilmesi söz konusu olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Telomerler, Telomeraz ve Kanser

Ökaryotik hücrelerde DNA replikasyonu, mitoz ve mayoz bölünme öncesinde gerçekleşir. Prokaryotik DNA'nın aksine, daha büyük olan ökaryotik DNA, kromozomlar halinde paketlenmiştir. DNA replikasyonu sırasında, kromozom sonları tamamen çoğaltılamamakta ve replikasyon uç problemi ortaya çıkmaktadır (2, 9). İnsan somatik hücrelerinde, her hücre bölünmesi ve DNA replikasyon döngüsünde, kromozomların 3' ucundan 25-100 bazın kaybolduğu tahmin edilmektedir (3, 4, 44-46). Tüm ökaryotlarda, kromozomların 3' uçlarında, "TTAGGG" tekrarlarından oluşan ve telomer adı verilen özel yapılar bulunmaktadır. Telomere bağlanan proteinler, telomerlerde bulunan tekrarlılara bağlanarak kararlı t-loop yapılarını oluştururlar (1). DNA replikasyonu sırasında, telomerler uygun bir şekilde çoğalamaz ve kromozomlar birbirleriyle birleşmeye ve kırılmaya başlarlar. Bu durum da genomik kararsızlığa (instability) yol açar (47). Yetersiz telomer uzaması sonucunda, DNA'da oluşan çift sarmal kırıkları, DNA hasar algılayıcı mekanizmaları aktive eder. Örneğin DNA hasar sensörü olan p53 proteini aktive ederek hücrelerin hücre büyümesini durdurmasına, apoptoz mekanizmasını indüklemesine veya replikatif senesens mekanizmasını başlatmasına neden olur (Şekil 2.1) (5, 6, 48).

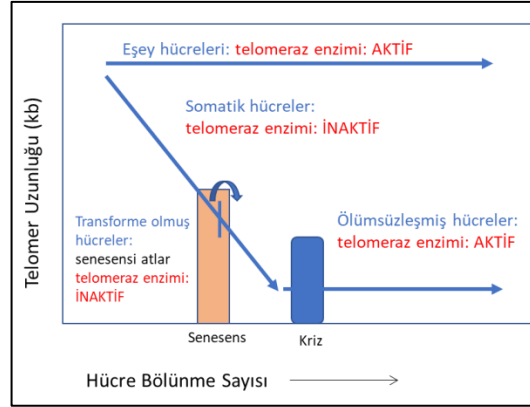
Telomerlerde yetersiz replikasyon sonucunda oluşan kromozom kararsızlığına engel olmak için, telomerlerdeki t-loop yapısı ve telomerlerin uygun bir şekilde uzatılması, telomerlerin 3' ucuna TTAGGG bazları ekleyen ve "telomeraz" adı verilen özel revers transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi ile sağlanır (1, 49, 50). İnsan telomeraz holoenzim kompleksi, sırasıyla *hTERT* ve *hTERC* genleri tarafından kodlanan, revers transkriptaz enzimi ve telomeraz RNA'sından oluşur (10, 51-53). Ribonükleoprotein yapısında olan dyskerin de bu holoenzim kompleksinin parçasıdır ve telomeraz RNA'sının doğru kıvrılarak kararlı bir yapıya sahip olması için gereklidir (54, 55).



Şekil 2.1: Telomerlerin kısalması sonucunda hücrelerin senesense/krize girmesi. Her hücre bölünmesinde, yetersiz DNA replikasyonu nedeniyle telomerler kısalır. Kısa telomerler, hücrelerde senesens veya kriz mekanizmalarını başlatır. Krizde olan hücrelerin çoğu planlı hücre ölümü (apoptoz) mekanizmalarını başlatırken, nadiren, hücreler krizden çıkıp ölümsüzleşebilirler. Weinberg R, The Biology of Cancer (Garland Science) kitabından uyarlanmıştır (56).

Yüksek seviyede telomeraz aktivitesi, fetüsler ve yeni doğanlarla birlikte erişkin testis ve yumurtalıkta da tespit edilmektedir (Şekil 2.1) (8). Aynı zamanda, kendine yenilenebilme kapasitesi olan, sitokin veya büyüme hormonu aracılığıyla büyümesi indüklenen hematopoietik ve epitel orijinli kök hücrelerde de telomeraz aktivitesi saptanmaktadır (7, 9). Sitokin ve/veya büyüme hormonu ile uyarılma sonrasında, hücrelerin proliferatif potansiyeline bağlı olarak hücrelerde telomeraz aktivitesinin arttığı gözlenmektedir (1, 8). Farklılaşma sinyalleri ise *hTERT* ekspresyonunu etkileyerek telomeraz aktivitesini hızlıca azaltmaktadır (8, 11-13).

Tümör biyopsileri ve tümörlerden elde edilmiş immortalize hücre hatlarında da yüksek telomeraz aktivitesine rastlanmaktadır (Şekil 2.2) (1, 8). Bu bulgular, somatik hücrelerin, bazı koşullarda telomeraz aktivitesini yeniden arttırabildiğini göstermektedir. Kanser hücrelerini normal somatik hücrelerden ayıran on temel özellik belirlenmiştir (57). Yüksek telomeraz ekspresyonu ve azalmış/yok olmuş p53 aktivitesi aslında kanser hücrelerini normal somatik hücrelerden ayıran bu on temel özellikten biridir ve kanserlerin çoğunda (>%85) tespit edilmektedir (5, 8, 57, 58).



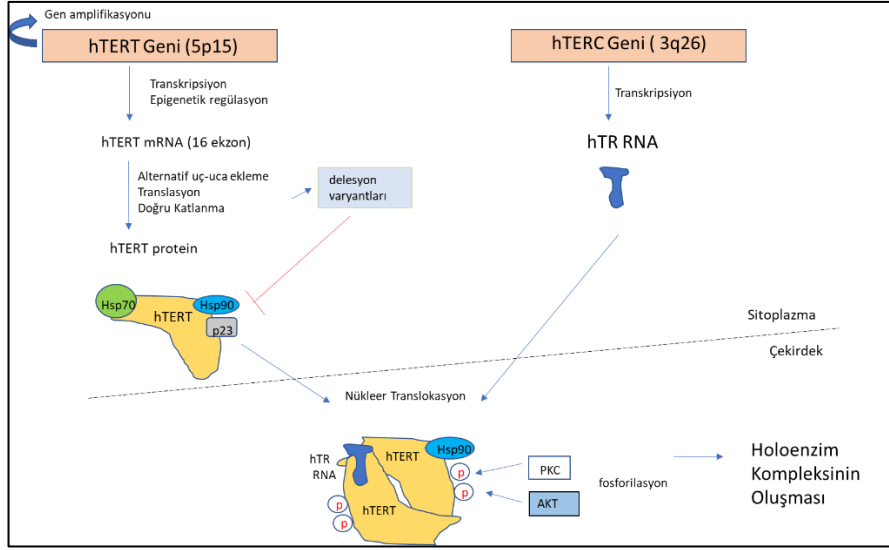
Şekil 2.2: Telomerez ölümsüzleşmiş hücrelerde aktif hale gelir. Eşey hücrelerinde telomerez aktiftir. Somatik ve transforme hücrelerde ise inaktiftir ve telomer boyutu her hücre bölünmesiyle kısalır. Kanser (ölümsüzleşmiş) hücrelerinin, somatik ve eşey hücrelerinden daha kısa telomerleri olmasına rağmen bu hücrelerde telomerez enzimi aracılığıyla telomer boyutu sabit kalır. “Meyerson M, Journal of Clinical Oncology, 2000” makalesinden uyarlanmıştır (59).

2.2. Telomerez Aktivitesini Kontrol Eden Mekanizmalar

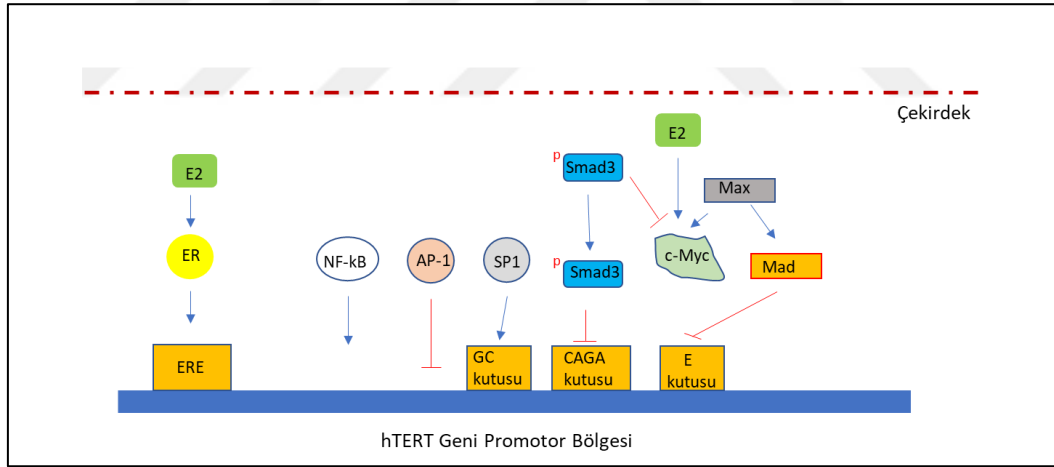
Telomerez aktivitesi, farklı seviyelerde özellikle *hTERT* gen ekspresyon kontrolü aracılığıyla sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu kontrol mekanizmaları, gen amplifikasyonu, transkripsiyonel regülasyon, epigenetik modifikasyonlar, alternatif uç birleştirme (splicing), translasyon sonrasında olan değişiklikler, holoenzim kompleksi üyelerinin hücre içi lokalizasyonu ve holoenzim kompleksinin oluşması olarak sıralanabilir (Şekil 2.3) (1, 41). Bu mekanizmalardan en kritik olanlar transkripsiyonel regülasyon ve epigenetik modifikasyonlardır.

2.3. Transkripsiyonel Regülasyon

Birçok çalışmada, c-Myc ve Sp1 transkripsiyon faktörlerinin (TF) *hTERT* promotörüne iş birliği yaparak bağlandığı ve *hTERT* ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Şekil 2.4) (13, 60, 61). Çift zincir kırıkları varlığında ise, p53 proteininin *hTERT* promotörüne bağlanması, c-Myc ve Sp1 proteinleri arasındaki etkileşime engel olarak transkripsiyonel represyona neden olmaktadır (62, 63). c-Myc ve Sp1 dışında pek çok TF'ünün *TERTp*'una bağlanarak transkripsiyonel regülasyonda rol aldığı bilinmektedir (41).



Şekil 2.3: Telomeraz aktivitesini kontrol eden farklı mekanizmalar. Telomeraz aktivitesinin kontrolü hem hTERT hem de hTRC gen ekspresyonunun farklı aşamalarda kontrolü ile sağlanır. hTERT proteininin ve hTR RNA'sının çekirdeğe translokasyonundan sonra, hTERT dimeri fosforilasyona uğrar. hTERT proteini ve hTR RNA'sı, telomerler üzerinde Reptinin, Pontin, GAR1, Dyskerin, NHP2, NOP10 ve TCAB1 gibi başka proteinlerle birleşerek holoenzim kompleksini oluşturur (64). Çizim "Mergny JL, Nucleic Acid Research, 2002" makalesinden uyarlanmıştır (41).



Şekil 2.4: hTERT gen promotör bölgesinin hücre içi sinyal yolları ile moleküler regülasyonu. hTERT ekspresyonu, promotöre, c-Myc/Max, NF-kB, SP-1 ve östrojen bağlı (E2) östrojen reseptörünün (ER), bağlanması ile kontrol edilir. Proto-onkogen olan c-Myc'in aktivitesi, ERK aktivitesi (sitoplazma), E2 ve Mad/Max ile regüle edilir. Ayrıca ERK ile aktive olan AP-1, TGF- β sinyal iletim yolağı ile aktive olan Smad3 ve Max tarafından aktifleşen Mad, hTERT ekspresyonuna engel olur. Mavi oklar ve kırmızı çizgiler, sırasıyla promoturun aktivasyon ve inhibisyonunu göstermektedir. ERE: östrojen cevap elemanı; "Liu JP, Cell Research 2006" makalesinden uyarlanmıştır (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016469) (65).

Bir sentetik glukokortikoid olan deksametazonun (Dex), kanser hücrelerinde c-Myc ve NF-KB proteinlerinin *hTERT p* promotörüne bağlanmasına engel olduğu ve bu şekilde transkripsiyonel baskılanmaya neden olduğu gösterilmiştir (66). Ancak, kanser ve normal somatik hücrelerde telomeraz aktivitesinin kontrol mekanizmalarındaki farklılıklar tam olarak net bir şekilde ortaya koyulmamıştır.

2.4. Epigenetik Modifikasyonlar

Telomerlerin uzatılmasının epigenetik mekanizmalarla kontrol edildiği pek çok çalışmada ortaya konmuştur (Şekil 2.3) (13, 37-40). Örneğin, histon deasetilasyonunun TSA ile engellenmesi telomeraz negatif hücrelerde telomeraz aktivitesinin artmasına neden olmuştur (40). Ayrıca, embriyonik kök hücrelerin (EKH), hücrelerin farklılaşmasını sağlayan Retinoik asitle (RA) inkübasyonu sonucunda telomeraz aktivitesinin azaldığı, buna karşın RA ve TSA inkübasyonu sonucunda telomeraz aktivitesinin değişmediği gösterilmiştir (13). c-Myc TF'ünün bağlandığı E-kutularını içermeyen rekombinant *TERTp* kullanıldığında bile TSA inkübasyonu sonucunda *hTERT* transkripsiyonunun arttığı ortaya konmuştur (37). Bu bulgulara göre, transkripsiyonel kontrolden çok, epigenetik modifikasyonların telomeraz aktivitesinin kontrolünde önemli rolü olduğu düşünülmektedir.

Histon deasetilasyonuna ek olarak, *hTERT* ekspresyonu başka bir epigenetik mekanizma olan DNA metilasyonu ile de kontrol edilmektedir. Tamamen farklılaşmış hücrelerde, özellikle CpG adalarını içeren sekanslarda *TERTp*'unun normalden fazla metilasyona uğradığı (hypermethylation) gösterilmiştir (39). EKH'nin RA ile birlikte DNA metilasyon inhibitörü olan 5-azasitidin ile inkübasyonu sonucunda telomeraz ekspresyonunun yeniden aktive olduğu gözlemlenmiştir (13). Ayrıca, somatik hücrelerde, DNA metilasyonu engellendiği zaman telomerlerin uzamaya başladığı ve genomik kararlılığın arttığı bildirilmiştir (39). İlginç olarak, bazı somatik ve telomeraz negatif hücrelerde, *hTERT* geninde metile olmamış pek çok CpG adasına rastlanmıştır (38). Bu bulgu, *TERTp*'unda gerçekleşen DNA metilasyonunun transkripsiyonel baskılanma için yeterli olmadığı anlamına gelmektedir.

2.5. Telomeraz Aktivitesini Arttıran *TERTp* Mutasyonları

Telomerlerin uzaması ve telomeraz negatif hücrelerin immortalize olabilmesi için *hTERT* ve/veya *hTERC* ekspresyonunun artması gerektiği ortaya konmuştur (67, 68). *hTERT*, *hTERC* ve *dyskerin* genlerinde, gen ekspresyonunu azaltan ancak nadir görülen mutasyonlar tespit edilmiştir (5).

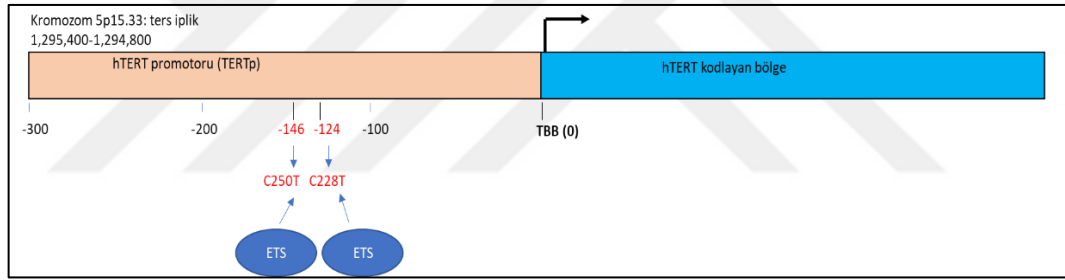
Horn ve ark. [14], 2013 yılında, cilt kanseri (melanom) hikâyesi bulunan bir ailedeki ailesel mutasyonları araştırmış ve sadece tümör biyopsilerinde tek bir noktada görülen *TERTp* mutasyonu tespit etmişlerdir. Yazarlar, hasta kanından elde edilen mononükleer hücrelerde (PBMC) bu mutasyona rastlamamışlardır.

Benzer zamanda yayınlanan başka bir çalışmada ise, Huang ve ark., yeni nesil sekanslama yöntemi kullanarak kanser hastalarından elde ettikleri sekans verilerindeki protein kodlamayan mutasyonları araştırmış ve *TERTp*'unda fonksiyonel olarak birbirini yerine geçebilen iki mutasyon tespit etmişlerdir (17). Bu mutasyonlar, *TERTp*'unda transkripsiyon başlangıç bölgesinin (TBB) 124 ve 146 baz yukarısında bulunan ve sırasıyla C228T(chr5:1,295,228 C>T) ve C250T (chr5:1,295,250 C>T) olarak tanımlanan mutasyonlardır. Her iki mutasyonun da *TERTp*'unda yeni ETS TF bağlanma bölgeleri oluşturduğu ve telomeraz aktivitesini bu şekilde arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 2.5) (14, 27, 69). Ayrıca, epitel ve hematopoietik orijinli olanlar dışında pek çok tümör biyopsisi ve kanser hücre hattında bu iki mutasyondan birinin bulunduğu gösterilmiştir (17, 19). *TERTp* mutasyonlarının, çok az replikatif potansiyele sahip melanom, HK, liposarkom, medullablastom, üretelial karsinom, ağız içi boşluğu karsinomu ve farklı glioma alttiplerinde görüldüğü tespit edilmiştir (17, 19, 70, 71). Ayrıca, *hTERT*'in HK (%47), GBM (%83), MK (%66) ve melanomlarda (%71) en çok mutasyona uğrayan gen olduğu ortaya konmuştur (14, 17, 19, 72, 73).

2.6. *TERTp*'unda Tespit Edilen Mutasyonlar

2.6.1. C228T ve C250T

Farklı kanser türlerinde, en sık görülen *TERTp* mutasyonlarının C228T ve C250T olduğu bildirilmiştir (16, 17, 19-29). Her iki mutasyon tipik olarak heterozigot formda görülmekte, birbiri yerine geçebilmekte ve onbir bazlık “CCCGGAAGGGG” sekansı yaratmaktadır. Bu sekans ETS TF bağlanma bölgesi ile yüksek benzerlik gösterdiği için, Horn ve ark. tarafından *TERTp*'unda yeni ETS TF bağlanma bölgesi oluşturduğu hipotez edilmiştir (Şekil 2.5) (14). Her iki mutasyonun da *TERTp* aktivitesini ve *hTERT* gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ek olarak, MK'de *TERTp* mutasyonlarının telomeraz aktivitesi ve kararlı telomer uzunluğuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (74).



Şekil 2.5: *TERTp* mutasyonları yeni (de novo) ETS TF bağlanma bölgeleri oluşturur. C228T ve C250T mutasyonları yeni ETS TF bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. Şekilde *hTERT* promotörünün ve kodlayan bölgesinin sadece 600 bazlık kısmı gösterilmiştir. Reitman ZJ, Acta Neuropathologica (2013) makalesinden uyarlanmıştır (75).

2.6.1.1. C228T

Pek çok çalışmada, C228T *TERTp* mutasyonunun C250T'den daha sık görüldüğü ortaya konmuştur (16, 17, 19-26, 29-36). Chiba ve ark., EKH'leri C228T veya C250T mutasyonu taşıyacak şekilde modifiye etmiş ve sadece C228T mutasyonu taşıyan pluripotent hücrelerde *hTERT* ekspresyonunun arttığını göstermiştir (76). Ayrıca, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan GBM hücrelerinde, C250T taşıyanlara göre daha yüksek *hTERT* ekspresyonu olduğu ortaya konmuştur (77). C228T ve C250T

mutasyonlarının farklı mekanizmalarla *hTERT* ekspresyonunu arttırdığı düşünülmektedir.

C228T mutasyonu taşıyan GBM hücrelerinde, oluşan yeni ETS bağlanma bölgesine tetramer yapıda olan GA bağlanan protein (GABP) izoformu olan GABPA ETS faktörlerinin bağlandığı ve telomeraz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (27). Ayrıca, C228T noktası konum bazlı mutagenез (site-directed mutagenesis) ile değişime uğratılmış, bu ETS motifinin *TERTp*'unun aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. GBM'de eksprese edilen tek ETS faktörü olan GABPA'nın C228T noktasına bağlanarak *TERTp* aktivitesini kontrol ettiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla ortaya konmuştur. GBM'e ek olarak, melanom, HK, MK ve nöroblastom hücre hatlarında da GABPA'nın *TERTp*'una bağlandığı gösterilmiştir (27, 78).

Diğer ETS faktörleri monomer olarak DNA'ya bağlanabilirken GABPA sadece heterodimer veya GABPB ile heterotetramer oluşturarak fonksiyonunu gerçekleştirebilir (79-81). Genom bazlı GABPA CHIP-seq verileri analiz edildiğinde, GABPA'nın bağlanması için ard arda gelen iki ETS bağlanma bölgesine ihtiyaç olduğu ve C228T mutasyonu aracılığıyla bu gereksinimin sağlandığı gösterilmiştir (27). Mancini ve ark. ise, GBM tümörlerinin büyümesi için heterotetramer oluşturan GABPB isoformunun (GABPβ1L), C228T bölgesine bağlanmasının gerekli olduğunu ortaya koymuştur (28).

GABPA'nın aktivitesi, çoğunlukla, MAPK ve Hippo sinyal iletim yolları aracılığıyla transkripsiyon sonrası modifikasyon ve nükleer lokalizasyon ile kontrol edilmektedir (82, 83). MAPK yolağını aktive eden *EGFR* amplifikasyonu ve *BRAF* V600E mutasyonlarının sırasıyla GBM ve melanomlarda C228T mutasyonu ile eşgüdümlü görüldüğü ortaya konmuştur (14, 19). Tüm bu bulgular, en azından GBM hücrelerinde, C228T mutasyonuna sahip hücrelerde GABPA ve GABPβ1L'in aktif olarak çekirdekte bulunduğunu ve heterotetramer olarak *TERTp*'una bağlanarak telomeraz aktivitesini arttırdığını ima etmektedir.

2.6.1.2. C250T

C250T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde ise, ETS faktörlerinin ortamda olmasının *hTERT* ekspresyonu için yeterli olmadığı, ETS TF'lerine ek olarak kuralsız (non-canonical) NF-kB sinyal iletim yolağının da aktif olması gerektiği gösterilmiştir (69). Li ve ark., oluşturdukları hücre kültürü sisteminde C250T mutasyonu olan bölgeye p52 proteinin bağlandığını, C228T olan bölgede ise bu bağlanmanın gerçekleşmediğini ortaya koymuşlardır. Ek olarak, p52 proteininin C250T bölgesinde ETS1/2 proteinleri ile iş birliğine girerek *hTERT* ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir.

2.6.1.3. *TERTp*'da tespit edilen diğer somatik mutasyonlar

C228T ve C250T mutasyonlarına ek olarak, Horn ve ark., ailesel melanoma geçmişi olan ailede TBB'inden 57 baz uzakta A>C (-57A>C) değişimini gözlemiştir (14). Daha sonra melanom ve MK hastalarının az bir kısmında da bu mutasyona rastlanmıştır (16, 84).

C228T ve C250T, C nükleotidinden T nükleotidine transisyon içermektedir. Melanom hücrelerinde C228A transversiyonuna rastlanmaktadır (16). Melanomlarda, dört ayrı bölgede (-124/125 ve -138/139) ardışık CC>TT transisyonları tespit edilmiş ve bu değişimlerin *hTERT* aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (16, 29, 85). Ek olarak, Heidenreich ve ark., melanomlarda TBB'den 156 baz uzakta C>T (-156C>T) değişimini gözlemiştir (16). -57A>C, -124/125 CC>TT, -138/139 CC>TT ve -156C>T mutasyonları, tıpkı C228T ve C250T gibi ETS TF bağlanma bölgeleri oluşturmaktadır.

ETS bağlanma bölgelerine ek olarak, *TERTp*'unda yeni BRCA1, ELK1, PLAG1, E2F1 ve SP1 bağlanma bölgeleri oluşturan mutasyonlar tespit edilmiş ve CHIP analizi ile Pol2, TAF1, EGR-1, Myc, Max, Sin3A ve CTCF gibi TF'lerin bu bölgelere bağlandığı gösterilmiştir (16, 86). Ayrıca, bazı raporlar, *TERTp*'da nadir görülen genetik yeniden düzenlemeler (rearanjman) (87, 88), duplikasyonlar (27) veya amplifikasyonlar (89, 90) olduğunu da göstermektedir.

2.7. Yüksek Sıklıkla *TERTp* Mutasyonu Varlığı Tespit Edilen Kanseler

Son alışmalar, HK (26), TK (91), melanom (16), GBM (25) ve MK'da (73), *TERTp* mutasyonlarının, tümör gelişiminde rol oynayan en erken değişimlerden biri olduğunu göstermektedir. Ek olarak, *TERTp* mutasyonlarının, melanomlarda MAP kinaz (16), HK'larda Wnt (26) sinyal iletim yolağının aktivasyonunun ardından gerçekleşen ikinci bir olay olduğu düşünülmektedir. *TERTp* mutasyonunun, tmregenezin sadece erken aşamalarında ve sürdürebilir neoplastik büyüme için de gerekli olup olmadığı kesinlik kazanmamıştır (74).

2.7.1. Hepatosellüler karsinom (HK)

2.7.1.1. Genel bilgiler

Hepatosellüler karsinom (HK), primer karaciğer kanserinin en sık görülen (%80) formudur (92). Erkeklerde ve kadınlarda en çok görülen sırasıyla beşinci ve yedinci kanser tipidir ve her yıl dünya genelinde toplam yarım milyon kişiye HK tanısı konmaktadır (93). HK, oğunlukla, Hepatit B (HBV) ve Hepatit C (HCV) enfeksiyonunu takiben görülen karaciğer sirozu sonucunda gelişmektedir (94-96). Ayrıca, fazla alkol tüketimi, aflatoksin maruziyeti veya alkolik olmayan karaciğer hastalığı sonucunda da gelişebilmektedir (Tablo 2.1) (93, 97, 98).

Karaciğer karsinogenezi için çok aşamalı kompleks bir süreç gereklidir. Bu süreçte, enflamasyon, hepatik hasar, siroz ve nedbe dokusu (fibrosis) nemli rol oynar (99-101). Hepatositlerin, malign transformasyonu oldukça karışıktır ve bu süreçte genetik değişimlere ek olarak epigenetik modifikasyonlar da gözlemlenmektedir (Tablo 2.1) (102, 103). Kronik viral hepatit ile ilişkilendirilmiş %80'e yakın HK vakasında, kromozom kazanımları (1q, 5, 6p, 7, 8q, 17q ve 20) ve kayıpları (1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16, 17p and 21) tespit edilmiştir (104, 105). Somatik mutasyonlar, coğrafi bölgeye göre değişim göstermektedir ve çevresel faktörlerle yakından ilişkilidir (106-108). Örneğin, Afrika'da Sahra l'nn güneyinde ve Güney Doğu Asya'da TP53 protein mutasyonlarına sıkça rastlanmaktadır. Bu bölgelerde, diyet ile alınan

aflatoksin B1 (AFB1) maruziyeti ve HBV enfeksiyonunun mutagenizi hızlandırdığı ortaya konmuştur (109). Güncel çalışmalarda, yeni nesil sekanslama teknolojisi ile hücre döngüsü regülasyonunu ve hücrel kromatin değişimlerini etkileyen birçok bilinmeyen genin, HK'da mutasyona uğradığı gösterilmiştir (110-112).

2.7.1.2. *TERTp* mutasyonlarının HK gelişimindeki rolü

Birçok güncel çalışmada, telomeraz aktivitesini arttıran *TERTp* mutasyonlarının, HK'larda en sık görülen (60%) genetik değişim olduğu ve bu mutasyonların hepatik karsinogenezde erken ortaya çıktığı gösterilmiştir (113-115). Ayrıca, *TERTp*'da TBB'nin 245 baz gerisinde tespit edilen rs2853669 polimorfizminin, HK riskini arttırdığı ve prognozu kötüleştirdiği gösterilmiştir (116-118).

Tablo 2.1: Beş farklı tümör için *TERTp* mutasyonları dışında görülen genetik/epigenetik değişimler ve çevresel risk faktörleri.

HK	Genetik/Epigenetik Değişimler	Kromozom kazanımları (1q, 5, 6p, 7, 8q,17q ve 20) ve kayıpları (1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16, 17p and 21), <i>TP53</i> mutasyonları ve epigenetik modifikasyonlar
	Çevresel Risk Faktörleri	HBV ve HCV enfeksiyonu, fazla alkol tüketimi, alkolik olmayan karaciğer hastalığı ve aflatoksin (AFB1) maruziyeti
TK	Genetik/Epigenetik Değişimler	<i>BRAF</i> V600E, <i>RET/PTC</i> translokasyonu, <i>PAX8/PPARγ</i> translokasyonu, <i>K/N/HRAS</i> mutasyonları, PI3K-AKT sinyal iletim yolağındaki proto-onkogenlerde kopya sayısı kazanımları ve tümör supresör promotörlerinin epigenetik değişimleri
GBM	Genetik/Epigenetik Değişimler	<i>IDH1</i> , <i>TP53</i> , <i>BRAF</i> V600E, <i>ATRX</i> , <i>CIC</i> , <i>FUBP1</i> mutasyonları, <i>PTEN</i> gen delesyonun, 1p/19q kodelesyonun, <i>EGFR</i> gen amplifikasyonu, proto-onkogenleri aktive eden translokasyonlar ve <i>MGMT</i> promotör metilasyonu (koruyucu etki)
Melanom	Genetik/Epigenetik Değişimler	<i>BRAF/NRAS</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>NF1</i> , <i>PTEN</i> , <i>GRIN2A</i> , <i>RAC1</i> , <i>BCL2L12</i> , <i>STK19</i> , <i>FBXW7</i> ve <i>RPS27</i> mutasyonları
	Çevresel Risk Faktörleri	UV ışınlarına maruziyet
MK	Genetik/Epigenetik Değişimler	<i>FGFR3</i> , <i>NRAS/KRAS/HRAS</i> , <i>TP53</i> ve <i>RB</i> mutasyonları
	Çevresel Risk Faktörleri	Sigara ve maruz kalınan kimyasallar

2.7.2. Tiroid kanseri (TK)

2.7.2.1. Genel bilgiler

Trake borusunun üstünde yer alan tiroid bezinin, hücre metabolizması, büyüme ve gelişme aşamalarında önemli görevi vardır. Bu görevler, tiroid hormonunun çekirdekte bulunan tiroid reseptörüne bağlanması ve gen ekspresyonunu kontrol etmesiyle sağlanır. Tiroid bezinin hücresel bileşiminde, foliküler (tirosit) hücreler, parafoliküler hücreler, endotel hücreler, fibroblastlar ve lenfositler yer alır (119). Foliküler hücrelerin temel görevi tiroid hormonlarını (T3 ve T4) sentezlemek iken parafoliküler hücreler, kalsiyum metabolizmasını kontrol eden kalsitonin üretiminden sorumludur.

Tiroid tümörleri iki sınıfta incelenir: adenomalar ve karsinomalar (120). Folliküler adenom (FTA), tiroid bezinde görülen tek iyi huylu tümör çeşididir. Folliküler adenomlara, Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya başta olmak üzere dünyanın her yerinde rastlanabilir. Karsinomlar ise, hücresel orijin, farklılaşma derecesi ve histopatolojik özelliklerine göre sınıflara ayrılırlar. Karsinomlar adenomlara göre çok daha nadir görülürler (%1), ancak bu tümörler en sık görülen kötü huylu endokrin tümör çeşididir.

Foliküler hücrelerden gelişen tiroid kanserleri histolojik olarak dört sınıfa ayrılabilir: papiller tiroid kanseri (PTK), foliküler tiroid kanseri (FTK), az farklılaşmış tiroid kanseri (AFTK) ve anaplastik tiroid kanseri (ATK). Parafoliküler C-hücrelerinden gelişen tümörler ise medüller tiroid kanseri (MTK) olarak sınıflanır (120). PTK, FTK, AFTK, ATK ve MTK'lerin görülme sıklığı sırasıyla %80, %10, %5, %2 ve %3 civarındadır (121). PTK'lerin görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır (122). PTK ve FTK'ler farklılaşmış tiroid kanseri çeşididir ve tiroid kanserleri arasında en iyi seyirli olanlardır (120). ATK'ler, farklılaşmamış tiroid kanseri çeşididir ve hızlıca agresifleşen kötü seyirli bir yapıya sahiptir. AFTK'ler ise PTK/FTK ve ATK arasında agresiflik gösterir.

2.7.2.2. Tiroid kanserinde genetik değişimler

PTK'lerde en sık görülen genetik değişim *BRAF* (v-Raf murin sarkoma viral onkogen homolog B1) mutasyonları ve kromozomal rearanjmanlardır (Tablo 2.1) (123). *BRAF* geni, 7q34'de yer alır ve kanser gelişiminde önemli rolü olan serin/threonine kinaz ailesine ait bir proteini kodlar. PTK'lerde, 1799'uncu pozisyondaki V600E değişimine sık rastlanmakta ve bu değişim PTK vakaları için prognostik belirteç olarak kullanılmaktadır. Daha agresif formlar olan ATK ve AFTK'lerin de sırasıyla %25 ve %20-40'ında bu mutasyon bulunmaktadır.

PTK'lerde *RET* genini içeren pek çok kromozomal rearanjman tespit edilmiş ve bunların hepsi *RET/PTC* olarak adlandırılmıştır (Tablo 2.1). Kromozom 10'da görülen parasentrik inversiyonun *RET* geninin diğer genlerle birleşip *RET* sinyal iletim yolağını aktifleştirdiği bilinmektedir (124). *RET/PTC* rearanjmanları, PTK gelişiminde bilinen önemli genetik değişimlerden biridir.

RAS mutasyonu, FTK ve ATK'lerde sıklıkla görülen bir diğer genetik değişiklik (Tablo 2.1) (125). RAS mutasyonunun, FTA, FTK ve ATK'lerde görülmesi, bu genin foliküler tümör gelişimi için kritik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (126). Kromozom 2q13 ve 3p25 arasında gerçekleşen translokasyon sonucunda, *PAX8* (Paired box 8) ve *PPAR γ* (peroxisome proliferator activated receptor γ) arasında genetik rearanjman oluşur. Bu değişiklik, özellikle FTK'lerde sıklıkla görülür (%60) ve FTK teşhisi için biyobelirteç olarak kullanılır (127). Ayrıca, PI3K-AKT sinyal iletim yolağındaki proto-onkogenlerde kopya sayısı kazanımları ve tümör supresörlerin promotörlerinin epigenetik değişimlerinin de tiroid kanseri gelişiminde etkisi olduğu gösterilmiştir (125).

2.7.2.3. *TERTp* mutasyonları

TERTp mutasyonları farklı tip tiroid kanserlerinde tespit edilmiş, normal tiroid hücrelerinde ise görülmediği farklı çalışmalarda ortaya konmuştur (17, 19, 70). *TERTp* mutasyonları en çok farklılaşmamış hücrelerden oluşan ATK'lerde (%33-50)

görülmektedir. AFTK'lerde (%29) ise, FTK (%14-36) ve PTK'lerden (%8-25) daha sık görüldüğü ortaya konmuştur (21, 24, 70, 128). Dolayısıyla, *TERTp* mutasyonları, PTK'lerde, *BRAF* V600E mutasyonundan sonra en çok görülen genetik değişimdir. ATK'lerde ise, *TERTp* mutasyonuna, *BRAF* mutasyonundan daha sık rastlanmaktadır. *TERTp* mutasyonlarının varlığı, agresif tümör karakteriyle ilişkilendirilmiş, metastaz ve nüks olasılığını arttırarak hastanın sağ kalımıyla ilgili bilgi verebileceği ortaya konmuştur (94, 128-133).

2.7.3. Glioblastom (GBM)

2.7.3.1. Genel bilgiler

GBM beyin tümörleri arasında en sık rastlanan, en yüksek evrede (Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Derece IV) olan astrositomları kapsayan primer kötü huylu beyin tümörüdür. Agresif tedavilere rağmen, GBM hastalarının ortalama sağkalım süresi onbeş aydan kısadır (134, 135). GBM DSÖ Derece IV tanısı için, nöroepitel dokuda bulunan astrositik hücrelerinin ileri derecede mitotik aktivite göstermesine ek olarak, nekroz ve/veya mikrovasküler proliferasyon olması da gereklidir (136).

GBM'deki moleküler değişikliklerin tespiti için, genellikle yüksek konkordansa sahip florasan in situ hibridizasyon (FISH), heterozigosite kaybı (LOH) teknikleri kullanılmaktadır (137, 138). Bu şekilde, hastalarda izositrat dehidrogenaz (*IDH*) 1/*TP53/BRAF* V600E mutasyonlarının, *PTEN* gen delesyonunun, 1p/19q kodelesyonunun, epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*) gen amplifikasyonunun ve proto-onkogenleri aktive eden rearanjmanların varlığı araştırılmaktadır (Tablo 2.1) (136). Ek olarak, *ATRX*, *CIC*, *FUBP1* ve *TERTp* mutasyonları da son zamanlarda GBM tanı panelinin bir parçası haline gelmiştir (139, 140). Bu testlerin sonuçları, histolojik olarak belirsiz olan türleri belirlemede, hastalığın prognozu ve hastanın tedaviye vereceği cevap ile ilgili önemli bilgiler içermektedir.

Ayrıca, GBM tedavisinde en sık kullanılan kemoterapi ajanı Temozolomid (TMD)'dir. TMD, alkil ekleyen bir ajandır ve hücreleri radyoterapiye hassas hale

getirir (141). Bazı hastalarda, TMD'e karşı oluşan direnç, DNA tamir proteini olan *MGMT* (O6-Metilguanin DNA metiltransferaz) protein seviyesi ile ilişkilendirilmektedir (142). Genetik değişimlere ek olarak, epigenetik bir değişim olan *MGMT* promotörünün metilasyonu da GBM hastalarının tedaviye daha iyi yanıt vermesi ve daha iyi sağ kalımla ilişkilendirilmiştir (Tablo 2.1) (143).

2.7.3.2. *IDH* ve *TERTp* mutasyonları

GBM'ler moleküler alt gruplara ayrılarak sınıflandığında, %80'den fazla GBM hastasının tanısında, en çok, *IDH1* ve *TERTp* mutasyon varlığını araştırmanın yararlı olduğu gösterilmiştir (19, 144-147). Her GBM moleküler alt grubunda telomerlerin farklı şekilde korunduğu ve telomerlerin korunmasını sağlayan genetik değişikliklerin gliomagenез için önemli olduğu ortaya konmuştur (148).

IDH mutasyonları taşıyan hücrelerde ise, *ATRX* geninde görülen fonksiyon kaybı mutasyonları sonucunda, telomer boyutunun, alternatif telomer uzatılması (*ALT*) mekanizması ile korunduğu gösterilmiştir (139, 140, 149-151). Derece II-II diffuz astrositom, oligodendrogliom, oligoastrocitom ve ikincil GBM'lerin %70-80'inde *IDH1* mutasyonu tespit edilmiştir (144, 145, 152, 153). Bu mutasyonların çoğunluğu (%90), kodon 132'de (R132H) görülmektedir (144, 153-155). Diffuz gliomlarda, *IDH2* mutasyonu da nadir olarak görülmektedir (144). *IDH* mutasyonlarının tümör gelişiminde erken bir evrede görüldüğü, tümör özgül farklılaşma ve davranış modellerinin daha sonra ortaya çıktığı öngörülmektedir (144, 153, 154).

TERTp mutasyonu taşıyan hücrelerde, oluşan mutasyon ile yeni ETS TF bağlanma bölgesi oluşturularak telomeraz aktivitesini ve *hTERT* ekspresyonunu arttığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (16, 17, 19, 156, 157). *TERTp* C228T mutasyonlarının en çok görüldüğü kanserden biri, birincil GBM'lerdir (17, 19). Ek olarak, *IDH1* mutasyonları taşımayan tümörde, *TERTp* mutasyonunun varlığının daha kötü prognoza yol açtığı gösterilmiştir (77).

2.7.4. Melanom

2.7.4.1. Genel bilgiler

Kutanöz (cutaneous) melanomlar, deride bulunan melanin pigmenti oluşturan melanosit hücrelerinin malin hale gelmesiyle oluşur. Diğer dermatolojik kanserler ile karşılaştırıldığında az sıklıkla (%2) görülmesine rağmen, kutanöz melanomlar, en agresif deri kanseri türüdür ve deri kanseri ile ilişkili ölümlerin %75'ine neden olurlar (158). Kutanöz melanomların çoğu lokalize olmasına rağmen, olguların bir kısmında tümörler metastaz yaparak, hastanın ölümüyle sonuçlanır (159). Kutanöz melanomlar, son otuz yılda, sıklığında en çok artış gözlenen kanser türüdür ve bu artış artan ultraviyole (UV) ışını maruziyeti ile ilişkilendirilmektedir (Tablo 2.1) (160).

Melanom genomu, en çok somatik mutasyona uğrayan kanser türlerinden biridir ve pirimidin dimerlerinden oluşan mutasyon paterni, karakteristik UV maruziyeti ile ilişkilendirilir (161). *TERTp* ve *BRAF/NRAS*, *CDKN2A*, *NF1*, *PTEN* genlerinin protein kodlayan bölgelerinde tekrarlayan mutasyonlar tespit edilmiştir (Tablo 2.1). Ek olarak, birçok yeni nesil sekanslama çalışması sonucunda, pek çok olguda, *GRIN2A*, *RAC1*, *BCL2L12*, *STK19*, *FBXW7* ve *RPS27* gibi genlerde de mutasyon olduğu ortaya konmuştur (162, 163).

2.7.4.2. *TERTp* mutasyonlarının kanser gelişimindeki rolü

C228T *TERTp* mutasyonlarının, ailesel kutanöz melanom görülen bir ailede yüksek sıklıkta tespit edilmesinin ardından, melanomlar başta olmak üzere C228T ve C250T *TERTp* mutasyonlarının düşük replikatif potansiyele sahip pek çok kanserde yüksek sıklıkla görüldüğü ortaya konmuştur (14, 17, 19). *TERTp* mutasyonları melanomlarda en sık görülen somatik değişimdir (16, 164). Makowski ve ark., C228T veya C250T *TERTp* mutasyonu taşıyan melanomlarda, *TERTp*'una ELF-1 ETS faktörü yerine tetramer yapıda olan GABP ETS faktörünün yüksek afinite ile bağlandığını (*in vitro*) ve *hTERT* ekspresyonunu arttırdığını ortaya koymuştur (165).

TERTp mutasyonunun varlığı, melanomun agresif davranışı (tümörde ülserleşme, hızlı büyüme, artan tümör boyutu ve azalan sağkalım) ile ilişkilendirilmiştir (16, 166, 167). Ek olarak, *TERTp* mutasyonlarının *BRAF/NRAS* mutasyonları ile birlikte var olduğu gösterilmiş, bu olgularda hastalığın daha kötü bir prognoza sahip olduğu ve sağkalımın azaldığı gösterilmiştir (168). Vallarelli ve ark., *BRAF/NRAS* mutasyonları sonucunda aktive eden ETS1 faktörünün, melanom hücre hatlarında *TERTp*'una bağlandığını ve *hTERT* ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (169).

2.7.5. Mesane kanseri (MK)

2.7.5.1. Genel bilgiler

MK, dünya çapında görülen tüm kanserlerin %3'ünü oluşturur ve erkeklerde en çok görülen kanserler arasında 7'inci sıradadır (170). Bu kanserin erkeklerde görülme sıklığı, kadınların üç katıdır. Ülkemizin endüstriyel bölgelerinden Edirne'de ise kanser istatistikleri, MK'nin erkeklerde en sık görülen 2'inci kanser olduğunu ve yedi kat daha fazla görüldüğünü göstermektedir (171).

MK'nin en önemli risk faktörü sigaradır ve olguların %50'sinin sigara ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Tablo 2.1) (172). Sigara içenlerde MK görülme riski dört kat fazladır (173). Sigara yakıldığında ortaya çıkan altmışdokuz adet kanserojen vardır. Bu bileşikler DNA'ya bağlanarak tamir edilemeyen DNA hasarları meydana getirerek kontrolsüz büyümeyi tetiklerler (174). Sigaraya ek olarak, çalışma hayatında maruz kalınan kimyasalların da MK insidansının %20'sini kapsadığı gösterilmiştir (173, 175, 176). Özellikle boya endüstrisinde çalışan işçilerde, Aromatik aminlere ve polisiklik hidrokarbonlara maruziyet artmakta ve MK görülme sıklığı otuz katına çıkmaktadır (177, 178).

MK hastalarının %75-80'inde hematuri (sık ve ağrılı idrara çıkma) görülür ve noninvazif olan MK erken safhada opere edilir (170). Hastaların %60'ında tümör tam olarak çıkarılmadığı için hastalık nüksetmekte, ilerleyen yıllarda hastaların %10-15'inde invazif hale gelerek sağkalım süresini düşürmektedir (175). Dolayısıyla MK

hastalarının, ilk operasyondan sonra 3 ayda bir kontrole gitmesi gerekmektedir (179). Dünya çapında tedavisi en pahalı olan ve devlete en çok yük getiren kanser tipidir (180, 181).

Bugüne kadar, pek çok çalışmada, MK'de biyolojik önem taşıyan genetik değişimler araştırılmıştır. İnvazif olan ve olmayan MK'ler farklı progenitörlerden oluşur ve farklı genetik değişimler içerir (182). İnvazif olmayanlarda, *FGFR3* (fibroblast büyüme faktör reseptörü 3) veya *NRAS/KRAS/HRAS* genlerinde görülen tekrarlayan mutasyonlar tespit edilmiştir (Tablo 2.1) (183, 184). MK'lerin büyük çoğunluğunda, hücre büyümesi, sağkalım ve proliferasyonu kontrol eden PI3K (Fosfoinositol 3 kinaz) sinyal iletim yolağında, değişikliklere rastlanmaktadır (185, 186). İnvazif özelliği olanlar ise, lokal ve uzak metastaz yapma eğilimindedirler ve genel olarak *TP53* ve *RB* gibi tümör baskılayıcı genlerde mutasyon içerirler (187).

2.7.5.2. *TERTp* mutasyonlarının MK gelişimindeki rolü

C228T ve C250T *TERTp* mutasyonları, tüm MK'lerinde tespit edilmiştir (19, 23). *TERTp* mutasyonlarının, en çok görülen somatik değişim olduğu (~%80) ortaya konmuştur (74, 188). *TERTp* mutasyonu taşıyan tümörlerde, daha yüksek *hTERT* ekspresyonu, telomeraz aktivitesi ve telomer uzunluğu tespit edilmiştir (69, 74, 189). *TERTp* mutasyonlarının varlığı ayrıca, sağkalım oranlarının düşüklüğü ve nüks riski ile ilişkilendirilmiştir (74, 189, 190).

2.8. Telomeraz Ekspresyonunu Hedefleyen Tedaviler

Artan telomeraz aktivitesi ve telomeraz holoenzim kompleksi üyelerinin kanser hücrelerinde normal hücrelerden farklı bir şekilde ifade edilmesi, telomeraz enzimini kanser tedavileri için önemli bir hedef haline getirmektedir. Birçok çalışmada, klinikte kullanılacak telomeraz inhibitörleri üzerinde durulmuştur. Telomeraz aktivitesini ilaç aracılığıyla azaltabilmek için farklı stratejiler kullanılmıştır (41). Protein seviyesinde katalitik altünite ve holoenzim kompleksiyle iletişim kuran diğer proteinlerin fonksiyonlarını gerçekleştirilmesine engel olan kimyasallar kullanılmıştır

(191-194). RNA ve DNA seviyesinde, sırasıyla telomeraz RNA'sının aktivitesini engelleyen ve *hTERT* ekspresyonunu engelleyen inhibitörlerden yararlanılmıştır (195-197). Bu ilaçların birçoğu, hücresel alımda, özgül olmayan bağlanma, metabolizma, toksisite ve ilacın yarı-ömrü gibi sorunlardan dolayı klinik denemelere dahil edilememiştir (41).

Bazı çalışmalarda, ilaç tedavisi yerine, hastanın T lenfositleri izole edilmiş, bu hücrelerden sitotoksik T lenfosit hücreleri (CTL) oluşturulmuş ve hastaya geri verilmiştir (42, 198, 199). Hastaya verilen rekombinant CTL'lerin, hastanın kanser hücrelerinin membranlarında bulunan *hTERT* peptidlerini algılayıp bağışıklık yanıtı oluşturacağı hipotez edilmiştir. Ancak, rekombinant CTL'lerin, hastaya verildiğinde, melanoma hücrelerini algılayıp öldürmediği ortaya konmuştur (42).

Faz 2 çalışmalarına geçebilen ve telomeraz özgül etkisi olan tek ilaç "*Imetelstat sodium* (GRN163L)" olmuştur. GRN163L, telomeraz RNA'sına bağlanarak aktivitesine engel olmakta ve böylece telomeraz holoenzim kompleksinin fonksiyonunu kısıtlamaktadır. Klinik öncesi çalışmalarda, GRN163L'nin, GBM (200), meme (201), pankreatik (202) ve karaciğer (203) kanser modellerinde tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir. Ancak, GRN163L kanser hastalarına uygulandığı ilk klinik denemelerde, meme, akciğer ve pediatrik sinir sistemi kanserlerinde yeterince başarıya ulaşamamış ve uygulama sona erdirilmiştir (204, 205). Her klinik denemede, telomeraz enziminin hematopoetik kök hücreler için kritik öneme sahip olması nedeniyle üçüncü/dördüncü derece hematopoetik toksisiteler ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, GRN163L uygulaması, sadece miyeloproliferatif bozukluklarda devam etmekte ve **Myelofibrozis** hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Farklı orijinli hücre hatları

Yüksek sıklıkta *TERTp* mutasyonu taşıyan, farklı orijinli kanser hücre hatlarını elde etmek amacıyla, öncelikle tez danışmanı Prof. Dr. Cengiz YAKICIER’de bulunan oniki adet hepatosellüler karsinom (HK) hücrelerinden birer vial elde edilmiş ve Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi 5. kat ARGE laboratuvarındaki sıvı nitrojende depolanmıştır. Ayrıca, daha önce Prof. Dr. YAKICIER’in çalışmalarında yer alan “Hep3B” hücreleri (206) elde edilen hücre stoklarında bulunamamış, bu hücreler Gebze Teknik Üniversitesi’nde (Kocaeli) görev yapan Prof. Dr. Tamer YAĞCI’dan elde edilmiştir (Tablo 3.1). Ek olarak, Prof. Dr. Tamer YAĞCI’dan üç adet MK hücre hattı (HT1379, J82 ve RT112) da temin edilmiştir. Georgetown Üniversitesi’nde (Atlanta, A.B.D) görev yapan Prof. Dr. Üren’den onüç farklı orijinli (7 GBM, 5 melanom ve 1 MK) hücre hattı elde edilmiştir (Tablo 3.1).

Beş farklı orijinli kanserde geniş bir hücre yelpazesi oluşturabilmek için, öncelikle, yurt içinde çalışan farklı araştırmacıların yayınlarına bakılarak kanser hücre hatları araştırılmıştır. Bu hücre hatları, literatürde *TERTp* mutasyon profili bilinen hücre hatları ile karşılaştırılmış ve mutasyon taşıyan ve/veya mutasyon durumu bilinmeyen hücre hatları ile çalışmış olan araştırmacılar tespit edilerek hücreleri paylaşımları istenmiştir. Sonuç olarak, Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde (İstanbul) görev yapan Dr. Nesrin Özeren ve Dr. Tolga Emre’den sırasıyla altı ve dört melanom hücre hattı elde edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Farklı kaynaklardan elde edilen hücre hatları: Yurtiçi ve yurt dışı kaynaklardan elde edilen HK, GBM, melanom, MK ve TK hücre hatlarının isimleri, literatüre göre *TERTp* mutasyon profilleri ve hücrelerin teslim alındığı kaynak bilgisi belirtilmiştir. TK hücre hatlarının tümör tipi de ayrıca belirtilmiştir. Nthyori3.1 immortalize olmuş tiroid hücre hattıdır. WT: literatüre göre *TERTp* mutasyonu taşımadığı gösterilen hücre hattı; GTÜ: Gebze Teknik Üniversitesi; KÜ: Koç Üniversitesi; A.B.D: Amerika Birleşik Devletleri; BÜ: Boğaziçi Üniversitesi

Sayı	Hücre Hattı	İlgili Kanser Tipi	Araştırmacının Adı	Lokasyon	<i>TERTp</i> Mutasyonu
1	HepG2	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	C228T
2	Huh7	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	C228T
3	SNU 387	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	C228T
4	SNU475	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	C228T
5	SNU423	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	C228T
6	SNU 398	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	C228T
7	Mahlavu	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	C250T
8	SNU182	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	WT
9	SNU449	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	WT
10	PLC	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	WT
11	SKHep1	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	WT
12	Focus	HK	Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer	ACU	bilinmiyor
13	Hep3B	HK	Prof. Dr. Tamer Yağcı	GTÜ	WT
14	A172	GBM	Dr. Tuğba Bağcı Önder Prof. Dr. Aykut Üren	KÜ A.B.D.	C228T veya C250T
15	T98G	GBM	Dr. Tuğba Bağcı Önder	KÜ	C228T veya C250T
16	U-373MG	GBM	Dr. Tuğba Bağcı Önder Prof. Dr. Aykut Üren	KÜ A.B.D.	C228T
17	U87MG	GBM	Dr. Tuğba Bağcı Önder	KÜ	C228T
18	H4	GBM	Prof. Dr. Aykut Üren	A.B.D.	C228T
19	U-118MG	GBM	Prof. Dr. Aykut Üren	A.B.D.	C228T
20	Hs 683	GBM	Prof. Dr. Aykut Üren	A.B.D.	bilinmiyor
21	LN18	GBM	Dr. Tuğba Bağcı Önder	KÜ	bilinmiyor
22	LN229	GBM	Dr. Tuğba Bağcı Önder	KÜ	bilinmiyor
23	M059J	GBM	Prof. Dr. Aykut Üren	A.B.D.	bilinmiyor
24	U-138MG	GBM	Prof. Dr. Aykut Üren	A.B.D.	bilinmiyor
25	G361	Melanom	Prof. Dr. Nesrin Özören Doç. Dr. Tolga Emre Prof. Dr. Aykut Üren	BÜ BÜ A.B.D.	WT
26	A2058	Melanom	Prof. Dr. Nesrin Özören Doç. Dr. Tolga Emre	BÜ	bilinmiyor
27	MALME-3M	Melanom	Doç. Dr. Tolga Emre	BÜ	bilinmiyor
28	MEWO	Melanom	Prof. Dr. Nesrin Özören	BÜ	bilinmiyor
29	SK-MEL-2	Melanom	Prof. Dr. Aykut Üren	A.B.D.	bilinmiyor
30	SK-MEL-5	Melanom	Prof. Dr. Nesrin Özören Prof. Dr. Aykut Üren	BÜ A.B.D.	bilinmiyor
31	SK-MEL-19	Melanom	Prof. Dr. Nesrin Özören,	BÜ	bilinmiyor
32	SK-MEL-24	Melanom	Prof. Dr. Aykut Üren	A.B.D.	bilinmiyor
33	SK-MEL-28	Melanom	Prof. Dr. Nesrin Özören Doç. Dr. Tolga Emre Prof. Dr. Aykut Üren	BÜ BÜ A.B.D.	bilinmiyor
34	HT1376	MK	Prof. Dr. Tamer Yağcı Dr. Michèle Hoffmann	GTÜ Almanya	C228T
35	RT112	MK	Prof. Dr. Tamer Yağcı Dr. Michèle Hoffmann	GTÜ Almanya	C228T
36	SCaBer	MK	Prof. Dr. Aykut Üren	A.B.D.	C228T

Tablo 3.1 (devam): Farklı kaynaklardan elde edilen hücre hatları: Yurtiçi ve yurt dışı kaynaklardan elde edilen HK, GBM, melanom, MK ve TK hücre hatlarının isimleri, literatüre göre *TERT* mutasyon profilleri ve hücrelerin teslim alındığı kaynak bilgisi belirtilmiştir. TK hücre hatlarının tümör tipi de ayrıca belirtilmiştir. Nthyori3.1 immortalize olmuş tiroid hücre hattıdır. WT: literatüre göre *TERT* mutasyonu taşımadığı gösterilen hücre hattı; GTÜ: Gebze Teknik Üniversitesi; KÜ: Koç Üniversitesi; A.B.D: Amerika Birleşik Devletleri; BÜ: Boğaziçi Üniversitesi

Sayı	Hücre Hattı	İlgili Kanser Tipi	Araştırmacının Adı	Lokasyon	<i>TERT</i> Mutasyonu
37	5637	MK (erkek)	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	C228T
38	T24	MK (kadın)	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	C228T
39	VM-CUB-1	MK (erkek)	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	C228T
40	UMUC-3	MK (erkek)	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	C228T
41	SW1710	MK (female)	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	C228T
42	SD	MK	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	C250T
43	UMUC-6	MK (erkek)	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	bilinmiyor
43	J82	MK	Prof. Dr. Tamer Yağcı Dr. Michèle Hoffmann	GTÜ Almanya	bilinmiyor
44	635Y	MK	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	bilinmiyor
45	153Y	MK	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	bilinmiyor
46	BFTK-905	MK	Dr. Michèle Hoffmann	Almanya	bilinmiyor
47	BCPAP	PTK	Prof. Dr. Paul Hofman	Fransa	C228T
48	TPC1	PTK	Prof. Dr. Paul Hofman Prof. Dr. Mitsutake	Fransa Japonya	C228T
49	KTC2	ATK	Prof. Dr. Norisato Mitsutake	Japonya	C228T
50	KTC1	PTK	Prof. Dr. Norisato Mitsutake	Japonya	C250T
51	8505C	ATK	Prof. Dr. Paul Hofman	Fransa	C250T
52	Nthyori3.1	Immortalize olmuş	Prof. Dr. Paul Hofman	Fransa	bilinmiyor
54	FRO	ATK	Prof. Dr. Norisato Mitsutake	Japonya	bilinmiyor
55	WRO	FTK	Prof. Dr. Norisato Mitsutake	Japan	wildtype
56	KTC3	ATK	Prof. Dr. Norisato Mitsutake	Japan	bilinmiyor
57	TT	MTK	Prof. Dr. Paul Hofman	France	WT

Koç Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde görev yapan Dr. Tuğba Bağcı Önder'den ise altı GBM hücre hattı temin edilmiştir. Benzer şekilde, yurtdışında çalışan farklı araştırmacıların yayınlarına bakılarak TK, melanom, GBM ve MK hücre hatları araştırılmış ve hücreleri paylaşımları istenmiştir. Sonuç olarak, on dört MK hücre hattı Heinrich-Heine Üniversitesi'nden (Düsseldorf, ALMANYA) Dr. Michèle J. Hoffmann'dan elde edilmiştir (Tablo 3.1). TK hücre hatları ise, Fransa'da IRCAN'dan (Nice, FRANSA) Prof. Dr. Paul Hofman ve Japonya'da Nagasaki Üniversite'sinden (Nagasaki, JAPONYA) Prof. Dr. Norisato Mitsutake'den elde edilmiştir. Japonya'daki uluslararası gönderi kuralları nedeniyle, hücreler canlı olarak

T25 flaskları içinde teslim alınmış ve hücre kültürü laboratuvarında büyütülmeye başlanmıştır. Teslim alındığında, KTC3 hücrelerinin çoğu cansız olduğundan, bu hücreler çalışmalarda kullanılamamıştır. Yurt içi ve dışından kuru buzda teslim alınan diğer tüm hücreler, hücre kültüründe büyütüleceği zamana kadar sıvı nitrojen tankında saklanmıştır.

3.1.2. Hücre kültürü solüsyonları

Bu çalışmada kullanılan hücre kültürü reaktifleri Tablo 3.2'de belirtilen firmalardan elde edilmiştir. HK hücre hatları için düşük glikoz içeren DMEM, GBM ve melanom hücreleri için yüksek glikoz içeren DMEM ve tiroid hücreleri için yüksek glikoz içeren DMEM veya RPMI çözeltisi kullanılmıştır (Tablo 3.3).

3.1.2.1. FBS'nin ısıyla inaktive edilmesi

Donmuş 500 mL FBS öncelikle 37°C su banyosunda oda ısısına getirilmiş ve erimesi sağlanmıştır. Eridiği anda, su banyosundan alınmış, su banyosu 56°C'ye ayarlanmıştır. Su banyosunun tam 56°C'yi gösterdiğinden termometre ile emin olunduktan sonra, FBS şişesi su banyosuna yerleştirilmiş yarım saat boyunca 5 dakikada bir çalkalanarak serumun inaktive olması sağlanmıştır. Yarım saatin sonunda, FBS şişesi su banyosundan alınmış ve hemen buz üzerine yerleştirilmiş, en az 5 dakika burada bekletilmiştir. Besiyerlerini hazırlamak için kullanılacak FBS stoklarını hazırlamak için, buzda bulunan FBS şişesi, 50 mL falkonlara paylaştırılmış ve falkonlar en az 5 dakika daha buz üzerinde bekletilmiştir. Hazırlanan stoklar en son ARGE laboratuvarındaki eksi 20 odasında saklanmıştır.

Tablo 3.2: Hücre kültüründe kullanılan reaktifler

Hücre Kültüründe Kullanılan Reaktifler	Üretici firma
Glutamin ve piruvat içermeyen Eagle'ın modifiye edilmiş ortamı (Modified Eagle's Medium [DMEM]), düşük glikoz, 500 mL	Gibco (Birleşik Krallık)
DMEM, yüksek glikoz, piruvat, 500 mL	Gibco (Birleşik Krallık)
RPMI 1640, 500 mL	Gibco (Birleşik Krallık)
Fötal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum [FBS]), A.B. Onaylı, Güney Amerika orijinli, 500 mL	Gibco (Birleşik Krallık)
Eagle'ın minimum esansiyel ortamı (minimum essential medium [MEM]) esansiyel olmayan amino asit çözeltisi (EOAA), 100X, 100 mL	Gibco (Birleşik Krallık)
Penisilin- Streptomisin (10.000 U/mL)	Gibco (Birleşik Krallık)
Tripan Mavi Boyası, %0,4, 100 mL	Gibco (Birleşik Krallık)
Tripsin-EDTA %0.05, 1X, 100 mL	Gibco (Birleşik Krallık)
200 mM Glutamin, 100 mL	Gibco (Birleşik Krallık)
Kalsiyum ve Magnezyum İçermeyen Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi (1X PBS)	Gibco (Birleşik Krallık)

Tablo 3.3: Farklı orijinli hücre hatlarının büyütüldüğü besiyerleri

Kanser Tipi	Hücre hatları	Besiyeri
HK	SNU 182/SNU449/SNU398/Huh7/SNU475/SNU387	DMEM, düşük glikoz
GBM	LN229/U87MG/A172/M059J/Hs683/LN18	DMEM, yüksek glikoz
Melanom	A2058/MeWo/SK-MEL-28/G361	DMEM, yüksek glikoz
Tiroid	BCPAP/FRO	DMEM, yüksek glikoz
	TPC1/KTC2/KTC1/8505C/WRO/Nthyori3.1	RPMI 1640

3.1.2.2. Besiyerlerinin hazırlanması

3.1.2.2.A. Düşük glikoz içeren DMEM besiyeri

500 mL düşük glikoz içeren DMEM ortamı içerisine, 50 mL ısıyla inaktive edilmiş fötal sığır serumu, 5 mL penisilin-streptomisin çözeltisi (50 mg/mL), 5 mL glutamin ve 5 mL EOAA eklenmiştir.

3.1.2.2.B. Yüksek glikoz içeren DMEM besiyeri

500 mL yüksek glikoz içeren DMEM ortamı içerisine, 50 mL ısıyla inaktive edilmiş f3tal sığır serumu ve 5 mL penisilin-streptomisin 3zeltisi (50 mg/mL) eklenmiştir.

3.1.2.2.C. RPMI besiyeri

500 mL RPMI 1640 içerisine, 50 mL ısıyla inaktive edilmiş f3tal sığır serumu, 5mL penisilin-streptomisin 3zeltisi (50 mg/mL) ve 5 mL EOAA eklenmiştir.

T3m besiyerleri, hazırlandıktan sonra 4°C’de saklanmış, kullanılmadan 3nce yarım saat su banyosunda (37°C) bekletilmiştir.

3.1.3. Polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kullanılan 3zeltiler

PZR için kullanılan 3zeltiler ve enzim Tablo 3.4’te belirtilmiştir. PZR’de kullanılan steril distile su, dNTP’ler ve primerlerin hazırlanışı aşağıda açıklanmıştır.

3.1.3.1. Steril distile su hazırlanması

PZR’de kullanılacak distile suyu steril etmek için, distile sular, 1,5 mL eppendorflara 1000 µL içecek şekilde porsiyonlanmıştır. Bu t3pler, 85°C’de 15 dakika otoklavlanarak soğumaya bırakılmış ve ardından 4°C’de kullanıma kadar saklanmıştır.

3.1.3.2. dNTP kokteyli hazırlanması

PZR’de kullanılacak dNTP kokteyli elde etmek için, 100 mM deoksisitozin trifosfat (dCTP), deoksitimin trifosfat (dTTP) deoksiadenozin trifosfat (dATP) ve deoksiguanin trifosfat (dGTP) stok sol3syonlarından 100’er µL alınarak toplam hacim

1000 µL olacak şekilde steril distile su eklenmiştir. Hazırlanan dNTP kokteyli, her biri 50 µL olacak şekilde porsiyonlanarak, -20°C’de saklanmıştır.

Tablo 3.4: PZR için kullanılan çözeltiler ve enzim

PZR İçin Kullanılan Çözeltiler	Üretici firma
Deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP)	Promega, ABD
Dimetil Sülfoksit (DMSO) Hybri-Max, 100 mL	Isolab, Almanya
GoTaq Flexi DNA polimeraz	Promega, ABD
Pfussion Hot Start II High Fidelity DNA Polimeraz	Thermo Scientific, ABD
Steril distile su	Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye

3.1.3.3. Primerlerin hazırlanması

PZR1, PZR2 ve PZR3’te kullanılan primerler IONTEK (İstanbul, TÜRKİYE) firması tarafından sentezlenmiştir. *TERTp* mutasyon profilinin belirlenmesi için yapılan PZR optimizasyon çalışmaları sırasında kullanılan on farklı primerin dizileri, guanin ve sitozin nükleotit yüzdeleri (% GC) ve erime sıcaklıkları (T_m), Tablo 3.5’te gösterilmiştir. Optimizasyon sonunda, tüm hücrelerin *TERTp* mutasyon profilini belirlemek için kullanılan PZR primerlerinin nükleotit dizileri, guanin ve sitozin nükleotit yüzdeleri (% GC) ve erime sıcaklıkları (T_m) ve ürün boyutu Tablo 3.6’da verilmiştir. RT-qPZR çalışması için kullanılan primerlerin sekansları Tablo 3.7’de listelenmiştir.

Liyofilize primer içeren tüpler, 13,000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş, 100 pmol’lük stok solüsyon elde etmek amacıyla, firma tarafından belirtilen miktarlarda steril distile su eklenerek liyofilize primerler çözülmüştür. PZR’de kullanılmak üzere hazırlanan 100 pmol’lük primer çözeltileri steril distile su ile 1:10 seyreltilerek, 10 pmol primer çözeltileri hazırlanmış ve 100 µL’lik hacimlerde -20°C’de depolanmıştır.

Sanger dizi analizi için, PZR1, PZR2 ve PZR3’te kullanılan primerler ve oluşan ampikonlar ACIBADEM Genetik Tanı Merkezine (LABGEN) iletilmiştir. Tablo 3.6’daki primerlere ek olarak, tam boy *TERTp* sekansının elde edilmesi için, ayrıca ACIBADEM LABGEN’de rutin olarak kullanılan dört primer (Tablo 3.8) de kullanılmıştır.

Tablo 3.5: *TERTp*'nin çoğaltılması için kullanılan optimizasyon primerleri.

Primer Adı	PZR Ürünü	Primer Sekansı	% GC	Erime Sıcaklığı (Tm)
2F	PZR1	CTACTGCTGGGCTGGAAGTC	60,00	60,00
3F	PZR1	AAGTCGGGCCTCCTAGCTCT	60,00	61,80
4F	PZR1	AGCTGTCCTGCGGTTGTG	61,11	61,10
5R	PZR1	GAAGGCCAGCACGTTCTTC	57,89	60,90
5R'	PZR1	CACCGTGTTGGGCAGGTA	61,11	61,60
1F	PZR2	GCCCTAGTGGCAGAGACAAT	55,00	59,30
1F'	PZR2	TAGGGATCACTAAGGGGATTTC	45,45	58,50
1R	PZR2	CCCGTCATTTCTCTTTGCAG	50,00	60,80
2R	PZR2	CAAACCACCCAAATCTGTT	45,00	59,70
3R	PZR2	CTGGGCTCCTTGACACAG	57,89	59,40

Tablo 3.6: *TERTp*'nin tam boy sekanslanması için kullanılan primerler. PZR1, HK, TK ve melanom hücreleri için, PZR3 ise GBM hücreleri için kullanılmıştır. PZR2, Proksimal promotöründe mutasyon bulunmayan beş hücre hattı (SNU1820 SNU449, WRO, Nthyori3.1 ve LN18) için kullanılmıştır.

Primer Adı	PZR Ürünü	Primer Sekansı	% GC	Erime Sıcaklığı (Tm)	Ürün Boyu (baz çifti)
4F	PZR1	AGCTGTCCTGCGGTTGTG	61,10	60,28	1503
5R	PZR1	GAAGGCCAGCACGTTCTTC	57,89	59,13	
2F	PZR3	CTACTGCTGGGCTGGAAGTC	60,00	60,11	1577
5R'	PZR3	CACCGTGTTGGGCAGGTA	61,11	59,57	
1F	PZR2	GCCCTAGTGGCAGAGACAAT	55,00	59,46	767
3R	PZR2	CTGGGCTCCTTGACACAG	57,89	58,06	

Tablo 3.7: RT-qPZR reaksiyonu için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Sekansı
<i>hTERT</i> -ileri primer	GCATTGGAATCAGACAGCAC
<i>hTERT</i> -geri primer	CCACGACGTAGTCCATGTTC
<i>GAPDH</i> -ileri primer	ATGGGTGTGAACCATGAGAA
<i>GAPDH</i> -geri primer	GTGCTAAGCAGTTGGGTGGTG

Tablo 3.8: Tam boy *TERTp* sekansının elde edilmesi için kullanılan ek primerler

Primer Adı	PZR Ürünü	Primer Sekansı	% GC	Erime Sıcaklığı (Tm)
iç 2bF	PZR1/PZR3	GATTCGCGGGCACAGAC	64,71	58,49
dış 1F	PZR1/PZR3	CTGTGTCAAGGAGCCCAAGT	55,00	59,89
iç 2aR	PZR1/PZR3	GAGGCGGAGCTGGAAGGT	66,67	61,39
iç 3R	PZR1/PZR3	CACGCACACCAGGCACT	64,71	60,26

3.1.4. Agaroz jel elektorforez çözeltileri ve kimyasalları

PZR amplifikasyonunu kontrol etmek için Tablo 3.9'daki çözelti ve kimyasallar kullanılmıştır.

Tablo 3.9: Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözelti ve kimyasallar

Agaroz Jel Elektroforezi için Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar	Üretici firma
Agaroz	Appllichem, Almanya
Generuler 100 bç DNA ladder	Thermo Scientific, A.B.D
Generuler 1kb DNA ladder	Thermo Scientific, A.B.D
6x DNA yükleme boyası	Thermo Scientific, A.B.D
Tris-Bazı	Sigma-Aldrich, A.B.D
Borik Asit	Sigma-Aldrich, A.B.D
Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich, A.B.D
Etidyum bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich, A.B.D

3.1.4.1. Etidyum bromür (EtBr)

Maske ve eldiven kullanılarak, ddH₂O'da 10 mg/mL EtBr çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti, 4 °C'de, alüminyum folyo ile kaplı şişede saklanmıştır.

3.1.4.2. 10X TBE (Tris-borik asit-EDTA)

54 g Tris bazı, 27,5 g Borik asit ve 7,44 g Na₂EDTA küçük bir cam şişeye eklendikten sonra üzerine 100 mL distile su eklenmiş ve manyetik karıştırıcı kullanılarak tüm katıların çözülmesi sağlanmıştır. pH metre ile, çözeltinin pH'sı 8,3'e

ayarlandıktan sonra, çözelti 1 litrelik cam şişeye aktarılmış ve toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

3.1.4.3. Agaroz jelinin hazırlanması

PZR1 ve PZR3 amplifikasyonun kontrolü için, %1'lik, PZR2 için ise %2'lik agaroz jeli hazırlanmıştır. %1'lik agaroz jeli için, 1 g, %2'lik jel için ise 2 g agaroz hassas terazide tartılarak, Erlenmayere aktarılmış ve üzerine 100 mL 1xTBE tampon çözeltisi eklenmiştir. Çözelti soğuyunca, içine son derişim 1 µg/mL olacak şekilde EtBr eklenmiş, dairesel hareketle karıştırılmış ve tepsiye dökülmüştür.

3.1.5. Kullanılan diğer kimyasallar ve kitler

Çalışmada kullanılan diğer kimyasalların bilgileri Tablo 3.10'da verilmiştir. İsoopropanol ve etanol genomik DNA izolasyonunda, TKA ve asetik asit Sulforodamin B (SRB) testinde, Bio-Myc1 ve BioMyc-2 ise Mikoplazma enfeksiyonu (*M.spp*) tedavisinde kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kitlerin bilgileri Tablo 3.11'de gösterilmiştir.

Tablo 3.10: Kimyasallar

Kimyasallar	Üretici firma
51 Epigenetik İlaçlık Kütüphane	Selleck Chemicals, Almanya
Etanol	Merck, Almanya
İsoopropanol	Merck, Almanya
Trikloroasetik asit (TKA), ACS	VWR, Almanya
Asetik asit	Merck, Almanya
Bio-Myc 1 (Tiamutin bazlı antibiyotik)	Biological Industries, A.B.D.
Bio-Myc 2 (Minosiklin bazlı antibiyotik)	Biological Industries, A.B.D.

Tablo 3.11: Kitler

Kitler	Üretici firma
LookOut EZ-PZR <i>M.spp</i> Tespit Kiti	Sigma Aldrich, Almanya
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Almanya
Cytoscan Sitotoksosite Kiti	G-biosciences, A. B. D.
Nucleospin RNA İzolasyon Kiti	Macherey-Nagel, Almanya
iScript cDNA Sentez Kiti	BioRad, Almanya
iTaq Evrensel SYBR Yeşili Karışımı	BioRad, Almanya

3.1.5.1. Sulforodamin B (SRB) testi için hazırlanan çözeltiler

3.1.5.1.A. %10 Trikloroasetik asit (TKA)

26,4 g TKA hassas terazide tartılmış, 250 mL'lik cam şişeye aktarılmış üzerine 120 mL distile su eklenmiş ve dairesel hareketlerle karıştırılmıştır.

3.1.5.1.B. SRB yıkama çözeltisi (%1 asetik asit)

1 litrelik cam şişeye, 8 mL asetik asit eklenmiş, üzerine 792 mL distile su yavaş yavaş dikkatlice eklenmiştir. Şişeyi alt üst ederek homojen bir karışım olması sağlanmıştır.

3.1.5.1.C. SRB çözünme çözeltisi (10 mM Tris pH:10)

242,2 mg Tris bazı 250 mL hacimli cam şişeye konmuş, üzerine 100 mL distile su eklenmiştir. pH metre kullanılarak, çözeltinin pH'sı 10'a ayarlanmış ve toplam hacim distile su ile 200 mL yapılmıştır.

3.1.6. Cam malzemeler

SRB Çözeltilerini hazırlamak için kullanılan 250 mL ve 1 litrelik cam şişeler İsolab firmasından (Almanya) temin edilmiştir.

3.1.7. Plastik malzemeler

Plastik malzemelerin listesi ve üretici firma bilgileri Tablo 3.12’de belirtilmiştir.

3.1.8. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 3.13’de belirtilmiştir.

Tablo 3.12: Plastik malzemeler

Plastik Malzemeler	Üretici firma
50 mL santrifuj tüpü	Corning, Almanya
15 mL santrifuj tüpü	Corning, Almanya
96 kuyulu hücre kültürü plakası	Corning, Almanya
25 cm ² hücre kültürü kabı	Corning, Almanya
75 cm ² hücre kültürü kabı	Corning, Almanya
ThermoWell™ Gold 0,5 mL PZR tüpleri, kapak	Corning, Almanya
Filtreli (20/100/200/1000 µL) pipet ucu (Maxymum recovery)	Corning, Almanya
Filtresiz Pipet ucu (Maxymum Recovery) 200 µL	Corning, Almanya
Serolojik Pipetler (stripettes) 2/5/10/25 mL	Corning, Almanya
Reaktif Haznesi	Corning, Almanya
1,5 mL mikrosantrifuj tüp	Isolab, Almanya
Hücre dondurmak için cryovial (cryogenic) (2 mL)	Corning, Almanya

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre kültürü yöntemleri

3.2.1.1. Donmuş hücrelerin çözündürülmesi

On üç HK hücre hattı, düşük glikoz içeren DMEM besiyerinde, tek katman olarak büyütülmüştür. On bir GBM ve dokuz melanom hücre hattı yüksek şeker içeren DMEM’de büyütülmüştür. Tiroid hücreleri ise yüksek glikoz içeren DMEM veya

RPMI bazlı besiyerinde büyütülmüştür. Donmuş stokların çözündürüleceği gün, kullanılacak besiyeri 37°C’de ısıtılmış, yarım saat sonra donmuş hücre stokları (1 mL), sıvı nitrojen tankından çıkartılıp, 37°C’de bulunan su banyosuna konmuş ve eridiği anda alınmıştır. Bu sırada 15 mL falkon tüpüne, 9 mL besiyeri konmuştur. Hücre dondurma ortamında bulunan dimetil sulfoksitten (DMSO) iyice kurtulmak için, hücreler eridiği anda mikropipet yardımıyla 1 mL hücre 15 mL falkona eklenmiştir.

Tablo 3.13: Cihazlar

Cihazlar	Üretici firma
Çalkalayıcı: Maxi-Mix III, type 65800 –	Barnstead / Thermolyne, A.B.D
Elektroforez güç kaynağı: 250 EX electrophoresis power supply	Gibco, A.B.D
Elektroforez tankı: Horizon 11.14	Whatman-Biometra, Almanya
Isıtıcı blok: Thermo Block TDB-120	Biosan, Letonya
Jel görüntüleme sistemi: Molview (GELDOC)	Molargen, Türkiye
Mikrosantrifüj: Biofuge pic	Heraeus, Almanya
Santrifüj: Eppendorf 5804 R	Fisher Scientific, A.B.D.
Vorteks	Velp Scientifica, İtalya
Soğutucu Kabı (Mr. Frosty)	Nalgene, Almanya
PIPETBOY acu 2, pipet kontrollörü	Corning, Almanya
Mikropipet seti: Pipetman (P10, P20, P200, P1000)	Gilson, A.B.D.
Sekiz kanallı (multichannel) FinnpiPET (FP-FOCUS MCP8 30-300 µl)	Thermo Scientific, A.B.D
Termal döngü cihazı: DNA Engine, -200	Biorad MJ Research, A.B.D
Hücre Sayma Aparatı (Neubauer haznesi/ Hemocytometer)	Isolab, Almanya
Dört Basamaklı Hücre Sayma Cihazı	Isolab, Almanya
Plaka Okuyucu: BioTek ELx50	BioTek, A.B.D.
iQ5 Gerçek zamanlı (real time) qPZR Cihazı	BioRad, Almanya
Nanodrop 1000 Spektrofotometre	Thermo Scientific, A.B.D.

Toplamda 10 mL içeren falkon, 1300 rpm’de 5 dakika santrifuj edilmiş, üstte kalan sıvı aspiratör yardımıyla çekilmiştir. Hücre peletinin üzerine 5 mL besiyeri eklenerek, hücreler 25 cm² flaska ekilmiştir. DMSO’dan tamamen kurtulmak için, ertesi gün hücrelerin flaska yapışıp yapışmadığı kontrol edilerek, aspiratörle ortam sıvısı çekilmiş ve yerine yeni besiyeri eklenmiştir.

3.2.1.2. Hücrelerin pasajlanması (sub-culture)

25 cm² flasklar içinde gelen 6 TK hücre hattı ve sıvı nitrojen stoklarından 25 cm² flasklar içine ekilen hücreler, %80 yüzey kaplamasına ulaştıkları anda, ölmelerine ve

yeni metabolik özellikler kazanmalarına engel olmak amacıyla, genellikle 1:4 oranında pasajlanmışlardır. 37°C inkübatöründen alınan flaskdaki eskimiş besiyeri aspiratörle çekilmiş, yerine 5 mL PBS eklenmiştir. Hücreler yıkandıktan sonra PBS de tamamen flaskdan uzaklaştırılmıştır. Flaska 1 mL Trypsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve flask 5 dakika 37°C inkubatöründe bekletilmiştir. Bu sırada yeni kullanılacak 75 cm²'lik flaska 15 mL besiyeri eklenmiştir. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı ışık mikroskobuna bakılarak belirlenmiş, özellikle tiroid hücreleri için mekanik vurma hareketleriyle hücre kümelerinin parçalanması sağlanmıştır. Kalkan hücreleri içeren flaska, 4 mL besiyeri eklenerek, hücre süspansiyonu homojen hale getirilmiş ve 15 mL besiyeri içeren flaska aktarılmıştır. 75 cm² flaskındaki hücreler, %80 yoğunluğa ulaştıklarında ise, tekrar 1:4 oranında yeni 75 cm² flasklarına pasajlanmışlardır. 75 cm² flasklarda büyüyen hücreleri yıkamak için 10 mL PBS, kaldırmak için 2,5 mL Trypsin/EDTA ve pasajlama öncesi hücre süspansiyonu oluşturmak için 7,5 mL besiyeri kullanılmıştır. Pasajlanan hücreler tekrar 37°C inkubatörüne kaldırılmış, bu işlemler haftada 2 kere tekrar edilmiştir.

3.2.1.3. Hücrelerin dondurulması

Hücreler 37°C inkübatöründen çıkarılmadan önce, 10 mL hücre dondurma besiyeri (9 mL FBS/1 mL DMSO) hazırlanmıştır. 75 cm² flask içinde bulunan dondurulacak hücreler 37°C inkübatöründen alınıp, eskimiş besiyeri aspiratörle çekilmiş, yerine 10 mL PBS eklenmiştir. PBS tamamen aspire edildikten sonra, flaska 2,5 mL Trypsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve flask 5 dakika 37°C inkubatöründe bekletilmiştir. Tripsini inaktive etmek için 2,5 mL taze besiyeri eklenmiş ve 5 mL hücre süspansiyonu 15 mL falkona aktarılmıştır. Hücre yoğunluğunu belirlemek için, hücreler önce plastik pipetler yardımıyla karıştırılıp homojen karışım elde edilmiştir. Daha sonra 50 µL hücre süspansiyonu, 20 µL tripan boyası ile karıştırılıp, hücre sayma aparatı ve dört basamaklı sayma cihazı kullanılarak sayılmıştır.

Hücre hesaplamaları yapıldıktan sonra, falkon 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücrelerin çöktüğünden emin olunduktan sonra, yukarıda kalan sıvı aspire edilmiş, 5 mL PBS eklenerek, hücreler tekrar 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj

edilmiştir. Üstte kalan PBS de tamamen aspire edilip, hücre peleti üzerine hücre dondurma besiyeri eklenmiş ve hücre süspansiyonu soğuğa dayanıklı 1 mL'lik (~5 milyon hücre/mL) cryo tüplere (cryovial) aktarılmıştır. Hazırlanan tüpler, hücrelerin az zarar görerek yavaş donması için, isopropanol içeren soğutucu kabı Mr. Frosty'ye konmuş ve -80°C dolabında bekletilmiştir. 24 sa sonra, örnekler sıvı nitrojen tankına aktarılmıştır.

3.2.1.4. Hücre peletlerinin dondurulması

Genomik DNA izolasyonu için donmuş pelet elde edilecek 75 cm² flask içinde bulunan hücreler, 37°C inkubatöründen alınmış ve hücre dondurma (bkz Bölüm: 3.13.1.C) işlemindeki adımlar (hücre dondurma besiyeri hazırlanması dışında) takip edilmiştir. Hücrelerin ilk santrifüjünden sonra, besiyeri aspire edilmiş, yerine PBS (5 milyon hücre/mL) konup, her tüp 1 mL hücre süspansiyonu içerecek şekilde, eppendorflara (1mL) aktarılmıştır. Eppendorflar, 13,000 rpmde 5 dakika çevrilmiştir. Üstte kalan PBS aspire edilmiş ve hücre peletleri -80°C'de dondurulmuş, genomik DNA izolasyonuna kadar burada saklanmıştır.

3.2.2. Genomik DNA izolasyonu

Eksi 80°C'den çıkartılan hücre hatları, oda sıcaklığında bekletilerek çözüldükten sonra "QIAamp DNA Mini Kit" kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar temiz eppendorf tüplere aktarılmış ve +4°C'de saklanmıştır. Uzun süreli depolama için -20°C kullanılmıştır. Elde edilen DNA'ların derişimini ve saflığını belirlemek için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Sadece A260/A280 oranı 1.8-2.0 olan örnekler, polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmıştır.

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Tam boy *hTERT* promotörünün amplifikasyonu için, UCSC Genom Tarayıcı (207) kullanılarak transkripsiyon başlangıç noktasına (TBB) göre 1375 baz geride ve

360 baz ileride olan tam boy *hTERT* promotör sekansı elde edilmiştir. NCBI primer dizayn (208) ve Primer3 (209, 210) araçları kullanılarak, PZR ve dizi analizi için kullanılabilir olan on farklı primer dizayn edilmiştir (Tablo 3.5).

Tam boy *TERT* promotör bölgesinin (1735 baz çifti) iki farklı PZR ürünü ile kapsanacağı düşünülerek, iki PZR ürünü için de altışar primer seti oluşturulmuştur. İlk optimizasyon çalışmaları için, 5 milyon SNU-398 hücresinden genomik DNA (gDNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gDNA'nın saflığı ve derişimi belirlenmiştir. PZR reaksiyonları toplam hacimde 50 µL olmak üzere, 400 ng gDNA ve altı farklı primer seti kullanılmıştır. Son konsantrasyonlar 1X colorless GoTaq Flexi Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 nM dNTP, 20 pmol ileri/geri primerler ve 1,25U GoTaq Flexi DNA Polimeraz olacak şekilde, en az iki farklı primer uzatma (extension) sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. PZR optimizasyon koşulları Tablo 3.14'de belirtilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri %1 agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

Optimizasyon çalışmasının ardından, seçilen primerler kullanılarak PZR1 ve PZR2, Tablo 3.15'teki PZR koşullarına göre gerçekleştirilmiştir. GBM hücreleri için PZR2 çalışmadığında, PZR başka bir polimeraz olan Pfusion Hot Start II High Fidelity DNA Polimeraz ile tekrar edilmiş, ancak PZR reaksiyonu içinde bulunan yeşil boya dizi analizine engel olduğu için bu enzim çalışmalarda kullanılmamıştır. Daha önce kullanılan GoTaq Flexi DNA polimeraz kitinin içinde bulunan alternatif çözeltiler tek tek denenerek hangisinde problem olduğu araştırılmış ve başka bir primer setiyle (2F ve 5R') PZR (PZR3) tekrarlanmıştır. PZR3 için kullanılan PZR Koşulları Tablo 3.14'de belirtilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri %1 agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

*TERT*_p PZR ürünlerini görüntülemek için, %1 veya %2'lik agaroz jel 0,5X TBE kullanılarak hazırlanmıştır. Elde edilen ampikonlardan 2 µL alınarak, 3 µL steril distile su ve 1 µL 6X DNA yükleme boyası parafilm üzerinde karıştırılmış ve karışım jele yüklenmiştir.

Tablo 3.14: Optimizasyon için kullanılan PZR koşulları. Dereceli PZR programı kullanılarak, PZR1 ve PZR2 için altı set primer içeren tüpler, ısı bloğunun farklı yerlerine yerleştirilerek, tüplerde farklı primer bağlanma sıcaklıkları olması sağlanmıştır.

Basamak	Derece (°C)	Süre	Döngü
İlk denaturasyon	96	2 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Primerin bağlanması	58-62	35 sn	35
Uzatma	72	45sn	
Uzatmanın bitirilmesi	72	10 dk	1
Saklama	4	sonsuz	1

Tablo 3.15: *TERTp* amplifikasyonu için kullanılan PZR koşulları. PZR 1 ve PZR3 için aynı PZR koşulları kullanılmış, primer bağlanma sıcaklığı 62°C olarak ayarlanmıştır. PZR1 için ise sadece primer bağlanma sıcaklığı (60°C) değiştirilmiş diğer tüm koşullar sabit tutulmuştur. dk: dakika; sn: saniye

Basamak	Derece (°C)	Süre	Döngü
İlk denaturasyon	96	2 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Primerin bağlanması	60 veya 62	35 sn	35
Uzatma	72	45sn	
Uzatmanın bitirilmesi	72	10 dk	1
Saklama	4	sonsuz	1

Ürün boylarının belirlenebilmesi için, örneklerle birlikte 5'er mikrolitre DNA moleküler ağırlık standartı da yürütülmüştür. %1'lik ve %2'lik jeller için, sırasıyla Generuler 100 bç DNA ladder ve Generuler 1kb DNA ladder yüklenmiştir. Jeller, 0,5X TBE standart tampon çözelti kullanılarak elektroforez cihazında 120V'da 60 dakika yürütülmüştür.

3.2.5. Dizi analizi

3.2.5.1. Tam boy *TERTp* dizilenmesi

Jel görüntüsü onaylanan ampliconlar, dizi analizi için ACIBADEM Genetik Tanı Merkezi'ne (LABGEN) kullanılacak primerlerle gönderilmiştir.

PZR1 ampliconlarında proksimal promotör mutasyon analizi yapmak amacıyla ACIBADEM LABGEN'de rutin olarak kullanılan *TERTp_ıç2bF* primeri kullanılmıştır. Proksimal bölgede mutasyon bulunmayan hücrelerde (SNU449, SNU182, WRO, Nthy3.1), PZR'de kullanılan ileri (4F veya 2F) ve geri (5R veya 5R') primerlere ek olarak, ACIBADEM LABGEN'de kullanılan *TERTp_dış1F*, *ıç2bF_ıç2aR*, *ıç3R* primerleri de kullanılmış ve PZR1'in tam dizisinin elde edilmesi sağlanmıştır. Ayrıca, PZR1 ampliconun dizi analizi için sadece PZR'de kullanılan primerler (1F,3R) kullanılmıştır. Burada, saflaştırmanın ardından, Beckman Coulter Genetik Analizör Cihaz Yönetim Talimatı'na uygun olarak ampliconların dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

PZR ürün saflaştırma, dizi analizi reaksiyonu (Beckman Coulter Genetik Analizör Cihazı), otomatik DNA dizi analizinin yürütülmesi LABGEN tarafından rutin standart protokoller kullanılarak yapılmış, elde edilen dizi sonuçları BioEdit programı ve nükleotit BLAST (BLASTn) web aracı (211), UCSC Genom Tarayıcı (207) web sitesinde bulunan referans *TERTp* sekansı ile karşılaştırılmıştır.

3.2.5.2. *BRAF* ve *KRAS* mutasyon analizi

FRO ve WRO TK hücrelerinin *BRAF* V600E ve *KRAS* ekzon 2 kodon 12/13 mutasyon profilini araştırmak için, bu hücrelerden elde edilen genomik DNA, PZR, minisekans ve fragman analizi için ACIBADEM LABGEN'e gönderilmiştir. *BRAF* V600E çalışması için hem pozitif hem de negatif kontrol kullanılmış, *KRAS* çalışması içinse sadece negatif kontrolden faydalanılmıştır. Negatif ve pozitif kontroller için sırasıyla steril distile su ve daha önce mutasyon taşıdığı gösterilmiş kontrol hasta

örneği kullanılmıştır. PZR ürün saflaştırma, minisekans (ABI 3130XL Genetik Analizör Cihazı), otomatik fragman dizi analizinin yürütülmesi ve elde edilen dizilerin incelenmesi LABGEN tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. *M.spp* testi

Hücre kültüründe çalışılan hücre hatlarında sık rastlanılan *M.spp* enfeksiyonunun varlığını araştırmak amacıyla, bir miktar supernatan ACIBADEM LABMED Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Pozitif hücre sayısı beklenenden fazla olunca, test kendi araştırma laboratuvarımızda PZR yöntemi (Sigma Aldrich, A.B.D) kullanılarak tekrar edilmiştir.

3.2.6.1. PZR ile *M.spp* testi

Hücre supernatanları "EZ_PZR Mycoplasma Test Kit" kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde, her eppendorfta yaklaşık 1mL supernatan olacak şekilde ayrılmıştır. Supernatanlar, *M.spp*'yi çöktürmek için, 15,000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı aspirasyon ile uzaklaştırıldıktan sonra, altta kalan pelet, 50 µL tampon çözeltisinde çözölmüş, oluşan homojen karışım 95°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. Karışımdan 5 µL bir PZR tüpüne transfer edilmiş, üzerine 10 µL reaksiyon karışımı eklenmiş, toplam hacim 50 µL olacak şekilde su eklenmiştir. PZR amplifikasyonu, Tablo 3.16'daki PZR koşullarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri, 100 b moleküler ağrılık standartı kullanılarak, %2'lik agaroz jelde yürütölmüştür.

3.2.6.2. *M.Spp* pozitif hücrelerin antibiyotik ile tedavisi

M.spp pozitif çıkan hücreler, üç hafta boyunca değişimli kullanılan iki antibiyotik BioMyc-1 ve BioMyc-2 (sırasıyla Tiamutin ve Minosiklin bazlı) ile tedavi edilmiş ve hücre süpernatanı tekrar PZR ile test edilmiştir. *M.spp* ile kontamine hücreler çalışmada kullanılmamıştır.

Tablo 3.16: *M.spp* testi için kullanılan PZR koşulları. Üretici firmanın yönergelerine göre, önce 35 döngü gerçekleştirilmiş, son uzatmadan önce bir döngü daha yapılmıştır. dk: dakika; sn: saniye

Basamak	Derece (°C)	Süre	Döngü
İlk denaturasyon	94	30 sn	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Primerin bağlanması	60	2 dk	35
Uzatma	72	1 dk	
Denatürasyon	94	30 sn	
Primerin bağlanması	60	2 dk	1
Uzatmanın bitirilmesi	72	5 dk	
Saklama	4	sonsuz	1

3.2.7. Epigenetik ilaç kütüphanesi

Çalışmada kullanılan epigenetik ilaç kütüphanesinde, aktivator veya inhibitör etki gösteren elli bir adet epigenetik modülatör bulunmaktadır (Tablo 3.17). İnhibitörler, histone deasetilaz (HDAC), Aurora kinaz, sirtuin (SIRT), hipokside indüklenen faktör (HIF), DNA metil-transferaz (DNMT), histon metiltransferaz (HMT), histone demetilaz ve bromo-bölge içeren enzimleri hedeflerken, aktivatörlerin üretici firma tarafından SIRT enzimleri üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir. Kütüphanede en çok HDAC (%45) ve Aurora kinazları (%27) hedefleyen moleküller bulunmaktadır.

Kütüphanede bulunan her ilaç için ayrı literatür taraması yapılmış ve bu ilaçlar için farklı çalışmalarda kullanılan hücre tiplerinde belirlenen, hücre büyümesi üzerinde %50 azalmaya neden olan konsantrasyon (IC-50) değerleri derlenmiş, ilaçlar IC-50 değerlerine göre sınıflandırılmıştır (Tablo 3.18). Kütüphanede bulunan ilaçlar, bu sınıflandırmaya göre, iki farklı dozda hücrelerle inkübe edilmiştir. Çok düşük (1), düşük/belirsiz (2) ve yüksek (3) IC-50 değerine sahip ilaçlar için son konsantrasyon sırasıyla 0,5 μ M veya 2.5 μ M, 1 μ M veya 5 μ M ve 5 μ M veya 10 μ M olacak şekilde kullanılmıştır.

3.2.8. Plakaya ekilen hücre sayısının belirlenmesi

3.2.8.1. *M.spp* testinden önce plakaya ekilen hücre sayısının belirlenmesi

Farklı tiroid kanseri hücre hatları (WRO, KTC1, KTC2, FRO ve TPC1), üç farklı yoğunlukta (5000, 7500 ve 10,000) 96 kuyulu plakaya triplike olarak ekilmiş, 1, 3, 4 ve 7 gün sonunda SRB protokolü uygulanmıştır.

3.2.8.2. *M.spp* testi sonrası plakaya ekilen hücre sayısının belirlenmesi

KTC1, KTC2, FRO ve TPC1 hücreleri yaklaşık bir aylık antibiyotik tedavisinin ardından, üç farklı yoğunlukta (5000,7500 ve 10,000), 96 kuyulu plakaya triplike olarak ekilmiş, 1, 3, 4 ve 7 gün sonunda SRB protokolü kullanılarak uygulanmıştır. **TPC1 ve KTC2 hücreleri ayrıca** dört farklı yoğunlukta (5000,7500, 10,000 ve 12,500), 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 1, 3, 4 ve 7 gün sonunda SRB protokolü uygulanmıştır.

3.2.8.3. RPMI ve DMEM bazlı besiyerinde plakaya ekilen hücre sayısının karşılaştırılması

Sekiz tiroid hücre hattı DMEM ve RPMI bazlı besiyerinde, 96 kuyulu plakaya, triplike olarak dört farklı yoğunlukta (5000, 7500, 10,000 ve 12,500) ekilmiştir. Besiyerinin, hücre canlılığı üzerine olan etkisi, 1, 3, ve 4 gün sonunda uygulanan SRB testi sonuçlarının analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.

Tablo 3.17: Satın alınan epigenetik ilaç kütüphanesinin içinde bulunan ilaçların sınıflandırılması. Her enzim tipinde sınıflanan ilaçlar belirtilmiştir. Sirtuin enzimlerinin hem bloklayıcı (B), hem de aktivatör (A) fonksiyonları bulunmaktadır.

	HDAC	Aurora Kinaz	Sirtuin	HIF	DNMT	HMT	Histone demetilaz	Bromobölge
1	AR-42 (HDAC-42)	AMG 900	EX-527 - (B)	2-Methoxyestradiol	Azacitidine	BIX01294	GSK-J4	PFI-1
2	Belinostat	AT9283	Sirtinol- (B)	IOX2	Decitabine	Entacapone	Toplam: 1	Toplam: 1
3	CI994 (Tacedinaline)	Barasertib	Quercetin (SophoRETin)- (B)	FG-4592	Toplam: 2	Toplam: 2		
4	CUDC-101	CCT129202	Resveratrol- (A)	Toplam: 3				
5	Droxinostat	CCT137690	SRT1720- (A)					
6	Entinostat (MS-275, SNDX-275)	CYC116	Toplam: 5					
7	ITF2357 (Givinostat)	Danusertib						
8	JNJ-26481585	GSK1070916						
9	LAQ824	JNJ-7706621						
10	M344	PF-03814735						
11	MC1568	PHA-680632						
12	Mocetinostat (MGCD0103)	SNS-314 Mesylate						
13	PCI-24781	TAK-901						
14	PCI-34051	ZM-447439						
15	PI3K/HDAC Inhibitor I	Toplam: 14						
16	Rocilinostat (ACY-1215)							
17	SB939 (Pracinostat)							
18	Scriptaid							
19	Sodium Phenylbutyrate							
20	Trichostatin A (TSA)							
21	Tubastatin A HCl							
22	Valproic acid sodium salt (Sodium valproate)							
23	Vorinostat (SAHA)							
	Toplam: 23							

Tablo 3.18: Epigenetik ilaç kütüphanesinde bulunan ilaçların, IC-50 değerlerine göre sınıflandırılması. Literatürdeki çalışmalardan, ilaç kütüphanesinde bulunan ilaçların farklı hücre tiplerindeki IC-50 değerleri derlenmiş ve ilaçlar IC-50 değerlerine göre üç derecede sınıflandırılmıştır. IC-50 değerleri hakkında bilgi olmayan ilaçlar da ikinci gruba dahil edilmiştir. IC-50: hücre büyümesi üzerinde %50 azalmaya neden olan ilaç konsantrasyonu

	IC-50 Değerlerine Göre Sınıflama	İlaç Sayısı	Son Konsantrasyon
1	Çok düşük IC-50	3	0,5 µM veya 2.5 µM
2	Düşük veya belirsiz IC-50	32	1 µM veya 5 µM
3	Yüksek IC-50	16	5 µM veya 10 µM
	Toplam	51	

3.2.8.4. DMSO varlığında hücre ekim yoğunluğunun karşılaştırılması

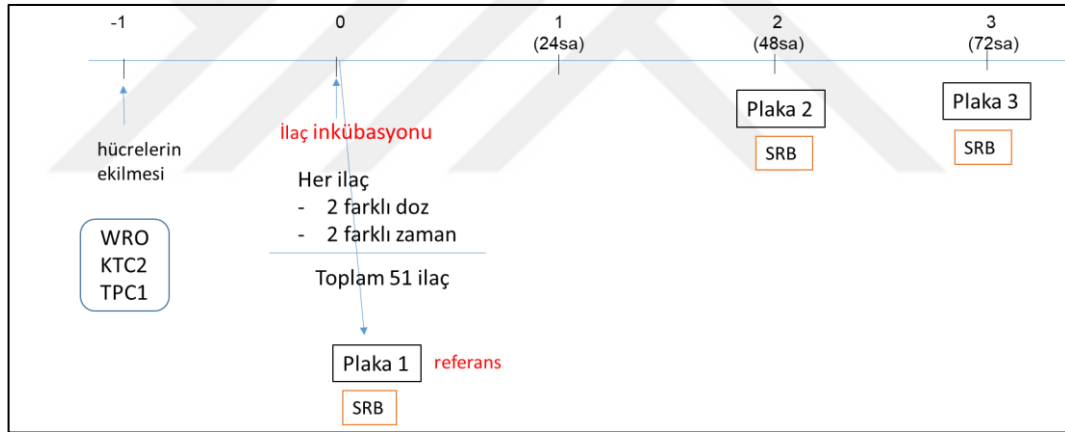
7500 WRO ve 12,500 TPC1 hücresi, 96 kuyulu plakaya, triplike olarak, RPMI bazlı besiyerine ekilmiştir. 24 sa sonra, hücrelerin besiyeri aspire edilmiş, DMSO içeren solüsyon, %0,1 ile %2 (v/v) olacak şekilde hücrelere eklenmiştir. DMSO'nun hücre canlılığı üzerine olan etkisi, hücre ekiminden bir gün (DMSO eklenmeden önce), üç gün (48 sa) ve dört gün (72sa) sonra uygulanan SRB testi sonuçlarının analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.

Tüm tiroid kanseri hücre hatlarının büyümesinin %0,5 DMSO varlığından etkilenip etkilenmediğini anlamak için, hücreler, DMEM veya RPMI bazlı besiyeri kullanılarak daha önce belirlenen optimum sayıda, 96 kuyulu plakaya ekilmiştir. 12,500 KTC1, Nthyori3.1, 8505C ve TPC1 hücreleri RPMI bazlı besiyerinde büyütülmüştür. 7500 WRO ve 10,000 KTC2 hücresi yine RPMI bazlı besiyeri ile karıştırılmış ve plakaya aktarılmıştır. 12,500 FRO ve BCPAP hücreleri ise DMEM bazlı besiyerine eklenmiştir. Ekimden 24 sa sonra, hücrelerin besiyeri aspire edilmiş, RPMI (KTC1, Nthyori3.1, 8505C, TPC1, WRO, KTC2 için) veya DMEM (FRO ve BCPAP için) besiyeri içine eklenip oluşturulan %0,5'lik (v/v) DMSO çözeltisi plakadaki hücrelerin üzerine ilave edilmiştir. DMSO'nun hücre canlılığı üzerine olan etkisi, WRO ve TPC1 hücrelerinde belirtilen yöntemle değerlendirilmiştir.

3.2.9. İlaç inkübasyonları

3.2.9.1. Hücrelerin epigenetik ilaç kütüphanesi ile inkübasyonu

7500 WRO, 12,500 TPC1 ve 10,000 KTC2 hücreleri, 96 kuyulu plakaya triplike olarak ekilmiştir. 24 saatin ardından, hücrelerin besiyeri aspire edilmiş, hücrelere, iki farklı dozda DMSO veya 51 adet epigenetik ilaç eklenmiştir (Tablo 3.17). İlaç eklenmeden önceki kontrolü oluşturacak plaka ise aynı gün SRB testine tabi tutulmuştur. İlaç veya DMSO eklenen plakaların yarısı 48 sa, diğer yarısı ise 72 sa sonra inkübatörden alınıp SRB testi uygulanmıştır. Takip edilen adımlar Şekil 3.1’de gösterilmiştir. İlaçların hücre canlılığı üzerine olan etkisi, ilaçlar veya DMSO eklenmeden önce (referans) ve eklendikten iki gün (48 sa) ve üç gün (72sa) sonra uygulanan SRB testi sonuçlarının analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.



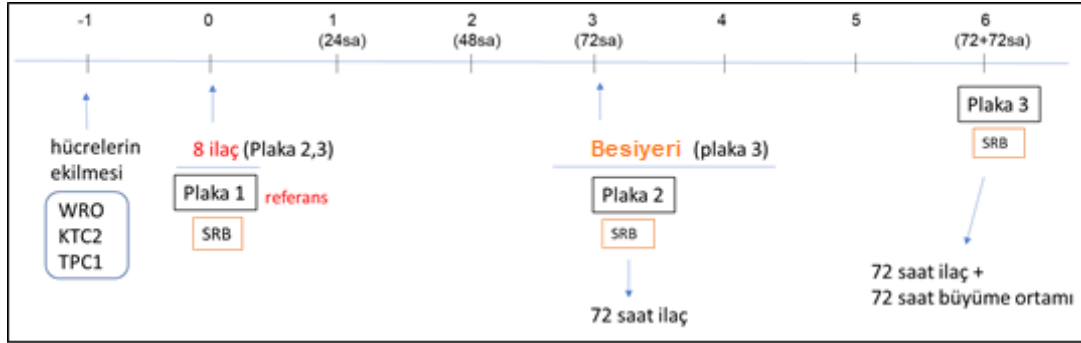
Şekil 3.1: Hücrelerin epigenetik ilaç kütüphanesi ile inkübasyonu

Hücreler 96 kuyulu plakalara ekildikten 24 sa sonra plakalara ilaçlar eklenmiş ve plakalar 48 veya 72 sa inkübatörde bekletilmiştir. Hücre ekiminden 24 sa sonra, referans olarak kullanılacak plaka 1, direkt SRB testine tabi tutulmuştur. Diğer plakalara ise 48 veya 72 saatin sonunda SRB testi uygulanmış ve elde edilen veriler birlikte analiz edilmiştir.

3.2.9.2. KTC2 hücrelerine özgü olan ilaçlar ile “canlanma” testinin gerçekleştirilmesi

7500 WRO, 12,500 TPC1 ve 10,000 KTC2 hücreleri, 96 kuyulu plakaya triplike olarak ekilmiştir. 24 saatin ardından, hücrelerin besiyeri aspire edilmiş, KTC2 hücrelerine özgü epigenetik ilaç veya DMSO, hücrelere Tablo 4.7’de belirtilen dozlarda eklenmiştir. İlaç eklenmeyen plaka, aynı gün SRB testine tabi tutulmuştur.

72 saatlik ilaç inkübasyonunun ardından, bir plakada (plaka 3), ilaç içeren besiyeri kuyulardan çekilmiş, kuyular kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile iki kere yıkanmıştır. Tüm PBS aspire edildikten sonra, kuyulara RPMI bazlı besiyeri eklenmiş ve plaka 72 sa daha inkübatörde bekletilmiştir (Şekil 3.2). Diğer plaka ise aynı gün, SRB testine tabi tutulmuştur. Besiyerinde 72 sa bekletilen son plakaya, 72 saatin sonunda inkübatörden alınıp SRB testi uygulanmıştır. Takip edilen adımlar Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Hücrelerdeki canlanma yüzdesi, ilaçlar veya DMSO eklenmeden önce (referans) ve eklendikten üç gün (48 sa) ve yedi gün (72sa+72sa) sonra uygulanan SRB testi sonuçlarının analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2: Hücrelerin seçilen sekiz ilaç ile inkübasyonu sonrasında yapılan canlanma testi.

Hücreler 96 kuyulu plakalara ekildikten 24 sa sonra, plakalara ilaçlar eklenmiş ve plakalar 72 sa boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Hücre ekiminden 24 sa sonra, referans olarak kullanılacak plaka 1, inkübatörden alınarak SRB testine tabi tutulmuştur. 72 sa inkübasyon sonunda, plaka 2 SRB testine tabi tutulurken, plaka 3'teki ilaç içeren besiyeri kuyulardan uzaklaştırılmış, yerine taze besiyeri eklenmiş ve

plaka 72 sa daha inkübatörde bekletilmiştir. Plaka 3, ikinci 72 sa sonunda SRB testine tabi tutulmuş ve tüm plakalar için elde edilen veriler birlikte analiz edilmiştir.

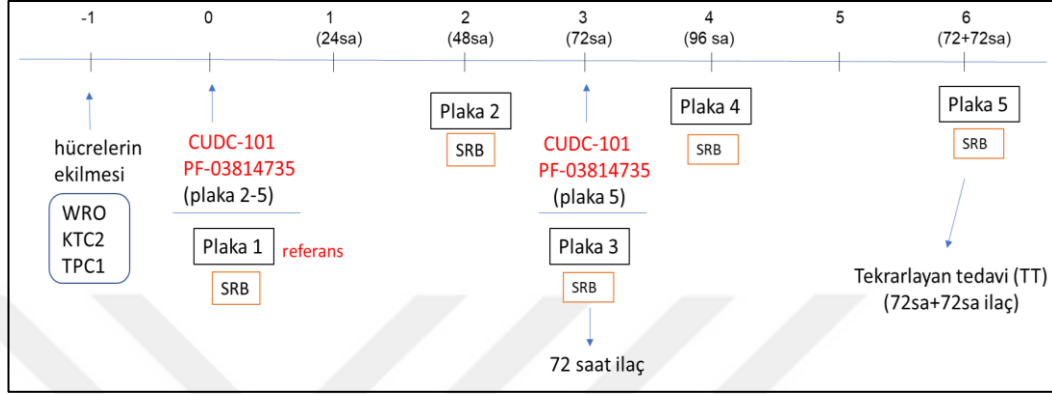
3.2.9.3. Zamana bağlı hücre canlılığı analizi

7500 WRO, 12,500 TPC1 ve 10,000 KTC2 hücreleri, 96 kuyulu 5 adet plakaya triplike olarak ekilmiştir. 24 saatin ardından, hücrelerin besiyeri aspire edilmiş, son konsantrasyon 1 μ M olacak şekilde, kuyulara CUDC-101, PF-03814735 veya DMSO çözeltisi eklenmiştir. İlaç eklenmeyen plaka, aynı gün SRB testine tabi tutulmuştur. İlaç eklenen 3 plaka 48, 72, 96 saatin ardından inkübatörden alınıp SRB testine tabi tutulmuştur. Son plaka ise, 72 sa inkübasyonun ardından, ilaç içeren besiyeri aspire edilmiş, kuyular kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile iki kere yıkanmıştır. Tüm PBS aspire edildikten sonra, son konsantrasyon 1 μ M olacak şekilde, kuyulara yeni hazırlanmış CUDC-101, PF-03814735 veya DMSO çözeltisi eklenmiş ve plaka inkübatörde 72 sa daha (72sa +72sa) bekletilmiştir. Bu son plaka, tekrarlayan tedavi (TT) olarak adlandırılmış ve son 72 saatin sonunda SRB testine tabi tutulmuştur. Takip edilen adımlar Şekil 3.3'te gösterilmiştir. İlaçların hücre canlılığı üzerine olan etkisi, ilaçlar veya DMSO eklenmeden önce, eklendikten iki gün (48 sa), üç gün (72sa), dört gün (96sa) ve yedi gün (72sa+72sa) sonra uygulanan SRB testi sonuçlarının analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.

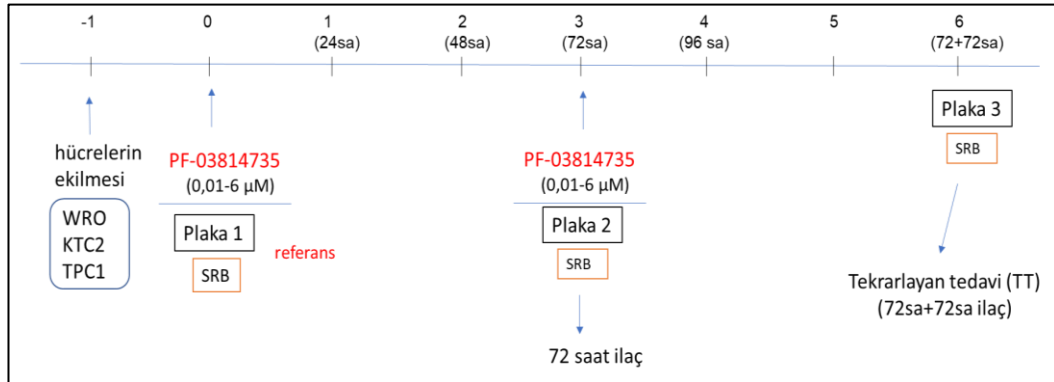
3.2.9.4. Doza bağlı hücre canlılığı analizi

7500 WRO ve 10,000 KTC2 hücreleri, 96 kuyulu 3 adet plakaya triplike olarak ekilmiştir. 24 saatin ardından, hücrelerin besiyeri aspire edilmiş, kuyulara artan dozlarda (0,01- 6,00 μ M) PF-03814735 veya DMSO çözeltisi eklenmiştir. İlaç eklenmeyen plaka, aynı gün SRB testine tabi tutulmuştur. İlaç eklenen ikinci plaka, 72 sa inkübasyonun ardından inkübatörden alınıp SRB testine tabi tutulmuştur. Son plakada ise, 72 sa inkübasyonun ardından, ilaç içeren besiyeri aspire edilmiş, kuyular kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile iki kere yıkanmıştır. Tüm PBS aspire edildikten sonra, kuyulara aynı dozda yeni hazırlanmış PF-03814735 çözeltisi eklenmiş, plaka inkübatörde 72 sa daha (72sa +72sa) bekletilmiştir. Son 72 saatin

sonunda SRB testine tabi tutulmuştur. Takip edilen adımlar Şekil 3.4'te gösterilmiştir. İlaçların hücre canlılığı üzerine olan etkisi, ilaçlar veya DMSO eklenmeden önce, eklendikten üç gün (72sa), ve yedi gün (72sa+72sa) sonra uygulanan SRB testi sonuçlarının analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.3: CUDC-101 ve PF-03814735 ile yapılan zamana bağlı hücre canlılığı analizi. Hücreler 96 kuyulu plakalara ekildikten 24 sa sonra, plakalara 1 μ M CUDC veya PF-03814735 çözeltisi eklenmiş, plakalar 48, 72, 96 sa boyunca (plaka 2-5) inkübatörde bekletilmiş ve süre sonunda, plaka 2-4 SRB testine tabi tutulmuştur. Referans olarak kullanılacak plaka (plaka 1), hücre ekiminden 24 sa sonra, inkübatörden alınarak SRB testine tabi tutulmuştur. Plaka 5 ise, 72 saatin sonunda inkübatörden alınmış, yerine aynı konsantrasyonda yeni hazırlanmış CUDC veya PF-03814735 çözeltileri eklenmiş ve 72 sa daha inkübatörde bekletilmiştir. TT'nin sonunda plaka 5 de SRB testine tabi tutulmuş, tüm plakaların SRB analiz sonuçları birlikte analiz edilmiştir.



Şekil 3.4: PF-03814735 ile doza bağlı hücre canlılığı analizi. Hücreler 96 kuyulu plakalara ekildikten 24 sa sonra, plakalara artan dozlarde PF-03814735 çözeltisi eklenmiş, plaka 2 ve 3, 72 sa boyunca inkübatörde bekletilmiş ve süre sonunda, plaka 2, SRB testine tabi tutulmuştur. Referans olarak kullanılacak plaka (plaka 1), hücre ekiminden 24 sa sonra, inkübatörden alınarak SRB testine tabi tutulmuştur. Plaka 3 ise, 72 saatin sonunda inkübatörden alınmış, yerine aynı konsantrasyonda yeni hazırlanmış PF-03814735 solüsyonları eklenmiş ve 72 sa daha inkübatörde bekletilmiştir. TT'nin sonunda plaka 3 de SRB testine tabi tutulmuş, tüm plakaların SRB analiz sonuçları birlikte analiz edilmiştir.

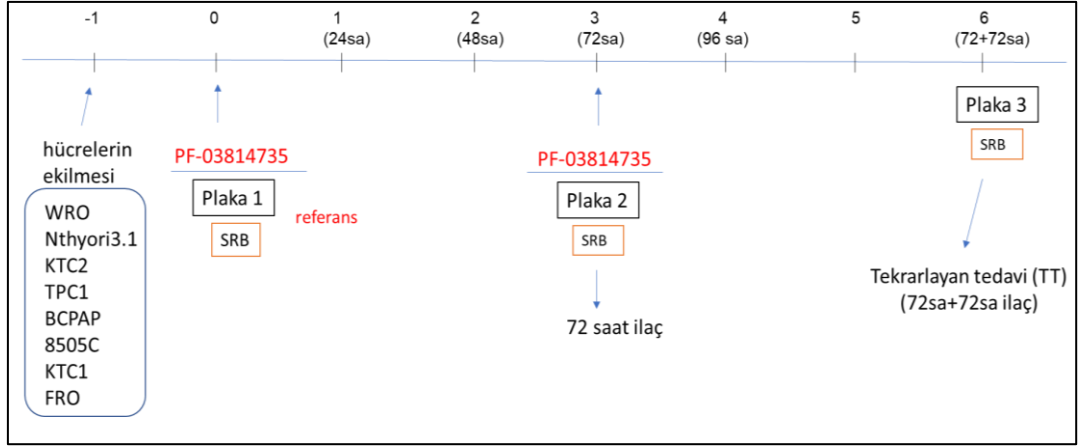
3.2.9.5. PF-03814735'in tüm tiroid hücre hatlarında, hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması

12,500 KTC1, Nthyori3.1, 8505C ve TPC1 hücreleri RPMI bazlı besiyerine aktarılmıştır. 7500 WRO ve 10,000 KTC2 hücresi yine RPMI bazlı besiyeri ile karıştırılmış ve plakaya ilave edilmiştir. 12,500 FRO ve BCPAP hücreleri ise DMEM bazlı besiyerine eklenmiştir. Tüm hücre karışımları, 96 kuyulu 3 adet plakaya ekilmiştir. Ekimden 24 sa sonra, hücrelerin besiyeri aspire edilmiş, RPMI (KTC1, Nthyori3.1, 8505C, TPC1, WRO, KTC2 için) veya DMEM (FRO ve BCPAP için) besiyeri içine eklenip oluşturulan 50 nM PF03814735 veya DMSO çözeltisi, plakadaki hücrelerin üzerine ilave edilmiştir. İlaç eklenmeyen plaka, aynı gün SRB testine tabi tutulmuştur. İlaç eklenen ikinci plaka, 72 sa inkübasyonun ardından inkübatörden alınıp SRB testine tabi tutulmuştur. Son plakada ise, 72 sa inkübasyonun ardından, ilaç içeren besiyeri aspire edilmiş, kuyular kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile iki kere yıkanmıştır. Tüm PBS aspire edildikten sonra, kuyulara aynı dozda yeni hazırlanmış 50nM PF-03814735 çözeltisi eklenmiş, plaka inkübatörde 72 sa daha (72sa+72sa) bekletilmiştir. Son 72 saatin sonunda, plaka, SRB testine tabi tutulmuştur. Takip edilen adımlar Şekil 3.5'te gösterilmiştir. İlaçların hücre canlılığı üzerine olan etkisi, ilaçlar veya DMSO eklenmeden önce, eklendikten üç gün (72 sa), ve yedi gün (72sa+72sa) sonra uygulanan SRB testi sonuçlarının analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.

3.2.10. PF-03814735 ile tedavi sonrasında telomeraz geni (*TERT*) gen ifade seviyelerinin araştırılması

3.2.10.1. Hücre peletlerinin hazırlanması

44,500 WRO, 60,000 TPC1 ve 30,000 KTC2 hücreleri, 24 kuyulu 3 adet plakaya triplike olarak ekilmiş ve plakalar 37°C inkübatöründe bekletilmiştir. 24 saatin ardından, hücrelerin besiyeri aspire edilmiş, son konsantrasyon 0,4 µM olacak şekilde, kuyulara PF-03814735 veya DMSO çözeltisi eklenmiş ve plakalar 37°C inkübatöründe 72 sa bekletilmiştir.



Şekil 3.5: PF-03814735'in tüm tiroid hücre hatlarında, hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması. Hücreler 96 kuyulu plakalara ekildikten 24 sa sonra, plakalara 50 nM PF-03814735 çözeltisi eklenmiş, plaka 2 ve 3, 72 sa boyunca inkübatörde bekletilmiş ve süre sonunda, plaka 2, SRB testine tabi tutulmuştur. Referans olarak kullanılacak plaka (plaka 1), hücre ekiminden 24 sa sonra, inkübatörden alınarak SRB testine tabi tutulmuştur. Plaka 3 ise, 72 saatin sonunda inkübatörden alınmış, yerine aynı konsantrasyonda yeni hazırlanmış PF-03814735 çözeltileri eklenmiş ve 72 sa daha inkübatörde bekletilmiştir. TT'nin sonunda plaka 3 de SRB testine tabi tutulmuş, tüm plakaların SRB test sonuçları birlikte analiz edilmiştir.

Yetmişiki saatin sonunda, ilk plaka, inkübatörden alınmış, kuyular kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile yıkanmış, her kuyuya 250 µL %0,25 Tripsin eklenerek, plaka 37°C inkübatöründe 5 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları ışık mikroskop altında gözlemlendikten sonra, kuyulara 250 µL RPMI bazlı besiyeri eklenmiş, her kuyudan elde edilen homojen hücre çözeltisi 1,5 mL'lik eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Transfer edilen hücreler 8000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra, üstte kalan sıvı aspire edilmiş, hücre peletine PBS eklenip hücreler bir kez daha çöktürülmüştür. Son santrifüjün ardından, hücre peletleri RNA izolasyonu aşamasına kadar -80C'de bekletilmiştir (Şekil 3.6). Bu işlemlerin ardından, ikinci ve üçüncü plaka inkübatörden alınmış, kuyular PBS ile yıkanmıştır. Tüm PBS aspire edildikten sonra, ikinci plakadaki kuyulara aynı dozda yeni hazırlanmış PF-03814735 çözeltisi, üçüncü plakadaki kuyulara ise RPMI bazlı besiyeri eklenmiştir. Plaka inkübatörde 72 sa daha (72sa+72sa) bekletilmiştir. Son 72 saatin sonunda, plakalardaki kuyulara ilk plakaya uygulanan işlemler uygulanmıştır.

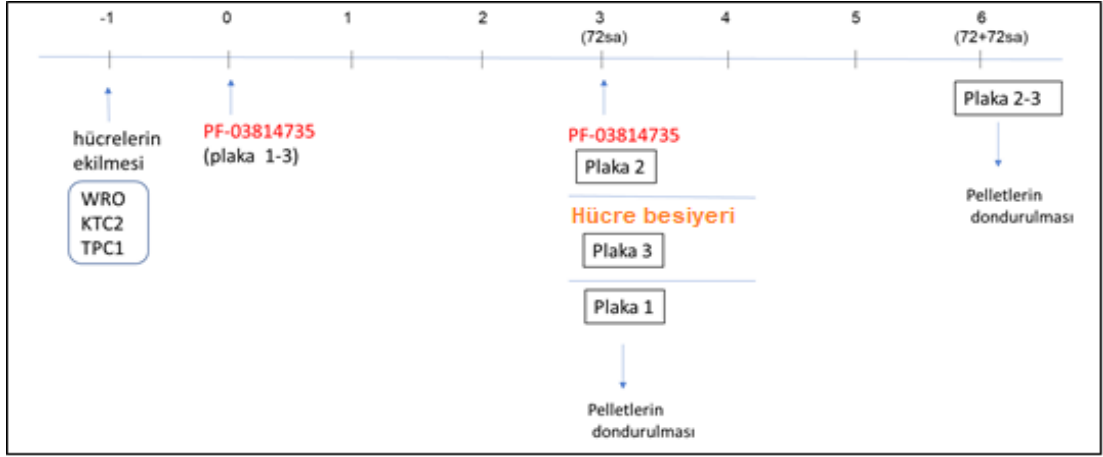
3.2.10.2. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Hücre pelletleri -80 °C'den çıkarılıp buz üzerine yerleştirildikten sonra, **Nucleospin RNA izolasyon kiti** kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonlarını ve saflığını belirlemek için 260 nm, 280 nm ve 230 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm (Nanodrop spektrofotometre) yapılmıştır. RNA örnekleri cDNA sentezine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

RNA örnekleri, -80°C'den çıkarılıp buz üzerine konmuş ve **iScript cDNA sentez kiti** ve 90 ng RNA kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde, cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 3.19'da belirtilmiştir. Elde edilen cDNA örneklerinin konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.10.3. RT-qPZR çalışması

RT-qPZR çalışmasından önce, *TERT* ve *GAPDH* genleri için optimizasyon çalışmaları yapılmış, her iki gen için de beklenen büyüklükte PZR ampliconu elde edilmiş ve bağlanma sıcaklığı olarak 53°C'nin kullanılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir. RT-qPZR çalışması **iTaq evrensel SYBR yeşili karışımı ve iQ5 gerçek zamanlı (real time) qPZR cihazı** kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bileşenler ve reaksiyon koşulları sırasıyla Tablo 3.20 ve Tablo 3.21'de sunulmuştur.



Şekil 3.6: PF-03514735 ile tedavi sonrası hücre pelletlerinin hazırlanması. Hücreler 24 kuyulu 3 plakaya triplike olarak ekildikten 24 sa sonra, kuyulara 0,4 μ M PF-03814735 çözeltisi eklenmiş ve plakalar 72 sa boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda, plaka 1'in kuyularındaki hücrelerden hücre pelletleri elde edilmiş ve -80°C 'de saklanmıştır. Plaka 2 ve 3'de bulunan hücre sıvıları aspire edildikten sonra, plakalara sırasıyla yeni hazırlanmış PF-03814735 çözeltisi ve besiyeri eklenmiş ve plakalar 72 sa daha inkübatörde bekletilmiştir. Sürenin sonunda, plaka 2 ve 3'de bulunan hücrelerin de pelletleri elde edilmiş ve -80°C 'de saklanmıştır.

Tablo 3.19: cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon koşulları.

Basamak	Derece ($^{\circ}\text{C}$)	Süre
Primerin bağlanması	25	5 dk
Ters transkripsiyon	42	30 dk
Enzimin inaktivasyonu	85	5 dk
Saklama	4	sonsuz

Tablo 3.20: RT-qPZR çalışmasında kullanılan bileşenler

Bileşen	Miktar
iTaq SYBR Yeşili Karışımı	10 μL
İleri Primer	1 μL
Geri Primer	1 μL
Steril distile su	değişken
cDNA	500 ng
Toplam	4

3.2.10.4. *TERT* geni kat sayısal değişim seviyelerinin belirlenmesi

RT-qPZR Reaksiyonu ve erime eğrisi analizi sonucunda elde edilen Ct değerlerinin ortalaması belirlenmiştir. Ardından, deneysel ve kontrol (DMSO) grubunda *TERT* ve *GAPDH* genleri için tespit edilen ortalama Ct değerleri arasındaki

fark (sırasıyla ΔCTD , ΔCTK) belirlenmiştir. Bu iki değer arasındaki fark ($\Delta\Delta C_t$) tespit edilmiş ve “ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ” değerleri hesaplanmıştır. Sonuçta belirlenen kat sayısal değişim değerleri deneysel gruptaki *TERT* geni kat sayısal değişimini göstermektedir. Kontrol gruptaki *TERT* geni kat sayısal değişim değerleri ise 1’e sabitlenmiştir.

Tablo 3.21: RT-qPZR çalışması için kullanılan reaksiyon koşulları

Basamak	Derece (°C)	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	20 sn	
Primerin bağlanması	53	30 sn	
Uzatma	72	1 dk	40
Erime eğrisi analizi	55-95	-	1
Saklama	4	sonsuz	1

3.2.11. SRB testi ile hücre canlılığı analizi

İlaç tedavileri sonunda, ilaçların hücre büyümesi üzerindeki etkisi, güncellenmiş SRB Kiti Protokolü ile analiz edilmiştir. Testin optimizasyon çalışmaları için, üretici firmanın yönergeleri uygulanmıştır. Buna göre, hücre kültüründeki inkübatörden alınan plakaların, üstte bulunan süpernatanı aspire edilmiştir. Sekiz kanallı FinnpiPET kullanılarak, kuyular kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile iki kere yıkanmıştır. Tüm PBS aspire edildikten sonra, kuyulara 50 μ L fiksatif çözeltisi eklenmiş, plaka 4°C de 1 sa bekletilmiştir. 1 saatin sonunda, kuyulardaki fiksatif dökülmüş, kuyular distile su ile 3-4 kere yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra, kuyularda kalan su tamamen aspire edilmiş ve plaka 50°C’ye ayarlanmış inkübatörde 30 dakika bekletilmiştir. Bu adımdan sonra tüm aşamalar karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Plakaya, 100 μ L SRB boya çözeltisi eklenmiş, plakanın etrafı alüminyum folyo ile sarılarak, plaka, oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Kuyular, daha sonra 1X boya yıkama çözeltisi ile 3-4 kere yıkanarak kuyulardaki kalan sıvı aspire edilmiştir ve plaka 50°C’ye ayarlanmış inkübatörde 30 dakika bekletilmiştir. Son aşamada, kuyulara 200 μ L çözücü tampon çözelti eklenmiş, plaka çalkalayıcıda 5 dakika tutularak homojen bir karışım oluşması sağlanmıştır. Kuyulardaki abzorban değerleri (540-580 nm) plaka okuyucuda ölçülmüştür.

3.2.11.1. Gerçek abzorbars değerlerinin hesaplanması

Kuyudaki deneysel abzorbars değerinden, sadece besiyeri içeren kuyudaki abzorbars değeri çıkarılmıştır. Gerçek abzorbars, Şekil 3.7’de gösterilmiştir.

$$\begin{aligned} X_d &: \text{okunan deneysel abzorbars} \\ X_b &: \text{büyüme ortamı içeren kuyudaki Abzorbars} \\ \text{Gerçek Abzorbars } (X_i) &: (X_d) - (X_b) \end{aligned}$$

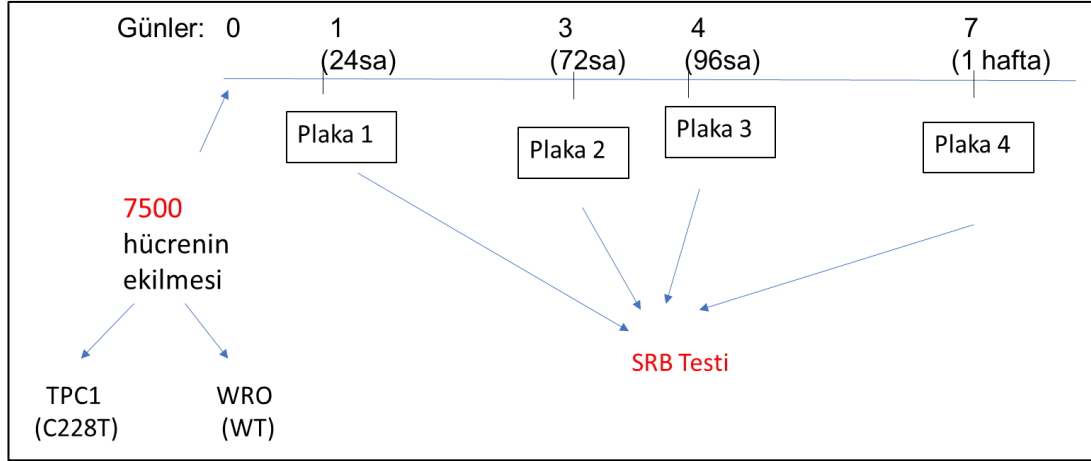
Şekil 3.7: Gerçek abzorbars değerlerinin hesaplanması

3.2.11.2. SRB protokolünün optimizasyonu

7500 WRO ve TPC1 hücreleri, triplike olarak, 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 1, 3, 4 ve 7 gün sonra üretici firmanın kitinde belirtilen SRB protokolü uygulanarak, plaka okuyucuda 540-580 nm arası abzorbars değerleri lmlmştir. Takip edilen adımlar Şekil 3.8’de gösterilmiştir.

3.2.11.3. SRB boyası dilusyon testi

7500 TPC1 hücresi, triplike olarak, 96 kuyulu plakaya ekilmiş, dört gün sonra üretici firmanın SRB protokolü uygulanarak, plaka okuyucuda abzorbars değerleri (560 nm) lmlmştir. Protokol uygulanırken SRB boyası seyreltilmeden veya 1:4-1:1000 oranında 1X SRB yıkama zltisi ile seyreltilerek kullanılmıştır. Tüm analizlerde triplike ölümlerin ortalaması alınmıştır.



Şekil 3.8: SRB protokolünün optimizasyon çalışmaları

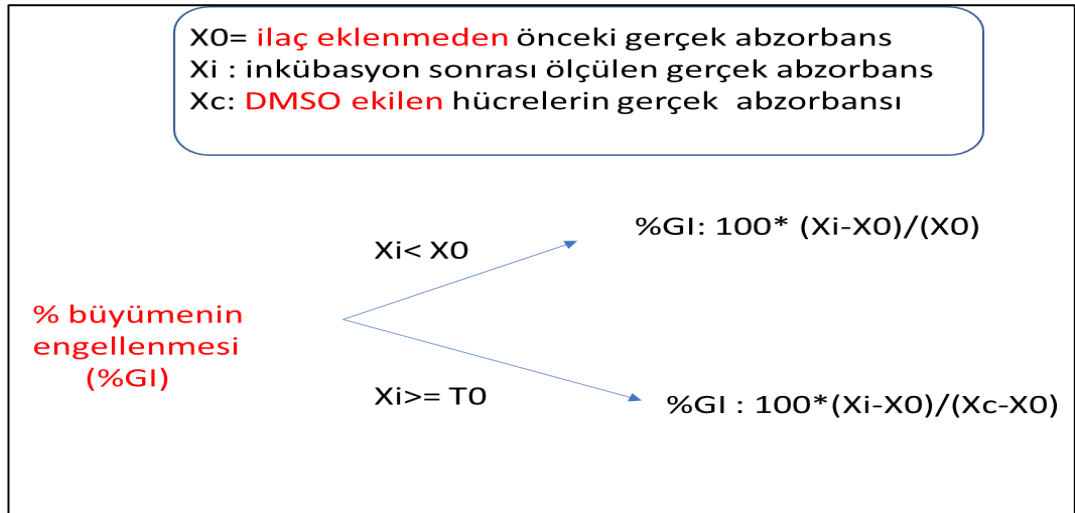
Hücreler 96 kuyulu plakalara ekildikten 24, 72, 96 sa ve 1 hafta sonra, plakalar SRB Testine protokolüne tabi tutulmuş, üretici firma tarafından önerilen protokol takip edilmiştir. Tüm plakaların SRB testi sonuçları birlikte analiz edilmiştir.

3.2.11.4. Kite kullanılan solüsyonların yerine laboratuvarında oluşturulan çözeltilerin kullanılması

7500 TPC1 hücresi, triplike olarak, 96 kuyulu plakaya ekilmiş, bir ve üç gün sonra üretici firmanın SRB protokolü, kite bulunan 1:80 seyreltilmiş SRB boyası ile diğer kit materyalleri (fiksatif, 1X SRB Yıkama Çözeltisi, SRB çözünme çözeltisi) veya laboratuvarında hazırlanan çözeltiler (%10 TKA, %1 asetik asit ve 10 mM Tris pH:10) kullanılarak uygulanmıştır. Buna göre, protokoldeki fiksatif yerine %10 TKA, 1X SRB Yıkama Çözeltisi yerine %1'lik asetik asit ve SRB çözünme çözeltisi yerine 10 mM Tris bazı (pH:10) kullanılmış ve modifiye protokol oluşturulmuştur. Abzorbans değerleri (560 nm) aynı şekilde plaka okuyucuda ölçülmüş ve gerçek abzorbans değerleri hesaplanmıştır. SRB boyası seyreltilmeden veya 1:4-1:1000 oranında 1X SRB yıkama çözeltisi veya %1 asetik asit ile seyreltilerek kullanılmıştır. Tüm analizlerde triplike ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

3.2.11.5. Hücre büyümesinin engellenmesi (%GI) için yapılan hesaplamalar

DMSO veya ilaç ile inkübe edilen plakalar, modifiye protokol ve 1:80 SRB boyası kullanılarak, SRB Testine tabi tutulmuştur. İlaçların %GI üzerindeki etkisi, plaka okuyucuda 565 nm’de elde edilen gerçek abzorban değerleri kullanılarak, üretici firmanın yönergesine göre, Şekil 3.9’da gösterilen formül ile hesaplanmıştır. Bu formüle göre, DMSO ve ilaç eklenen kuyulardaki abzorban değerleri ölçülmüş, sadece besiyerini içeren kuyulardaki abzorban değerinden çıkarılarak gerçek abzorban değerleri elde edilmiştir. İlaç eklendikten sonraki gerçek abzorban değeri (X_i), ilaç eklenmeden önceki gerçek değerden (X_0) küçükse (büyümenin engellendiğini gösterir), %GI değerini hesaplamak için sadece ilaç inkübasyonundan önceki ve sonraki abzorban değerleri karşılaştırılmıştır. Tersine, eğer ilaç eklendikten sonraki gerçek abzorban değeri (X_i), ilaç eklenmeden önceki gerçek değerden (X_0) büyükse (hücre büyümesi olduğunu gösterir), %GI değerini hesaplamak için ilaç inkübasyonundan önceki ve sonraki abzorban değerleri, DMSO eklendikten sonraki abzorban değerleri (kontrol, X_c) ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.9: Hücre büyümesinin engellenmesi hesaplamaları

3.2.11.6. Doza bağlı hesaplamalar

KTC2 ve WRO hücresi artan dozlarda (0,01- 6,00 μ M) PF-03814735 ile inkübe edildiğinde, ilaç konsantrasyonu ve %GI arasında lineer olmayan (sigmoid) ilişki olduğu için, konsantrasyonların doğal logaritmaları (ln) hesaplanmış ve grafiğin yatay eksenine (x) doğrusal hale getirilmiş (lineer) konsantrasyon değerleri, y eksenine ise %GI eklenmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Hücrelerin *TERTp* Mutasyon Profilinin Belirlenmesi

4.1.1. Hücrelerin büyütülmesi, donmuş hücre stoklarının ve peletlerinin hazırlanması

Hücrelerin *TERTp* mutasyon profilinin belirlenmesi amacıyla, ilk aşamada, sıvı nitrojen stoğunda bulunan HK, GBM, TK, melanoma ve MK hücrelerinin tek tek açılması, büyütülmesi, donmuş hücre stoklarının hazırlanması ve genomik DNA eldesi için hücre peletlerinin dondurulması yapılmıştır.

İlk olarak, HepG2 hücresi açılmış ve DMEM bazlı besiyerine (%10 FBS ve %1 penisilin streptomisin [PS]) ekilmiştir. Ancak, birkaç gün içinde tüm hücrelerin öldüğü gözlemlenmiştir. Yapılan araştırmalarda DMEM'deki yüksek glukoz miktarının (4,5 g/L) HK hücreleri için toksik olduğu öğrenilmiştir. Sonuç olarak, düşük glukoz içeren (1g/L) ve glutamin içermeyen DMEM sipariş edilmiş, 2,5mM glutamin, %10 FBS ve %1 PS eklenerek HK besiyeri oluşturulmuştur. Yeni açılan HK hücre hatları bu ortamda başarıyla büyütülmüş, DNA izolasyonu için hücre peletleri -80°C'de dondurulmuş, hücre stoğu oluşturmak için de sıvı azot cryo tüpleri hazırlanmıştır (Tablo 4.1).

Sıvı azot tankında bulunan GBM hücre hatları da teker teker çözülmüş ve yüksek glikozlu DMEM besiyerinde büyütülmüştür. Bu sırada, LN18 hücreleri plaka yüzeyine yapışmamış ve Dr. Önder'in laboratuvarından yeni bir LN18 stoku istenmiş ve başarıyla büyütülmüştür. Melanoma hücreleri de benzer şekilde yüksek glikozlu DMEM bazlı besiyerinde büyütülmüştür. GBM ve melanoma hücrelerinden DNA izolasyonu için hücre peletleri -80°C'de dondurulmuş ve hücreler sıvı azotta saklanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Açılan hücre hatlarının *M.spp* test sonucu, dondurulan hücre stokları ve peletler. Açılan hücrelerin ACIBADEM LABMED Mikrobiyoloji laboratuvarında yapılan *M.spp* test sonuçları, dondurulan cryo tüpler ve DNA pelet sayıları belirtilmiştir. Her tüp ve pelet, yaklaşık 4 milyon hücre içerecek şekilde dondurulmuştur. Hücre peletleri, DNA izolasyon aşamasına kadar -80°C’de saklanmıştır. TT hücreleri, parafoliküler orijinli olduğu ve çalışmada kullanılmayacağı için bu hücrelere *M.spp* tedavisi uygulanmamış, hücre stoğunu saklamak için sınırlı sayıda cryotüp veya pelet dondurulmuştur. Hep3B, LN229 ve SKMEL-28 hücrelerinin ise *M.spp* enfeksiyonu yok edilememiş olsa da sınırlı sayıda saklanmışlardır.

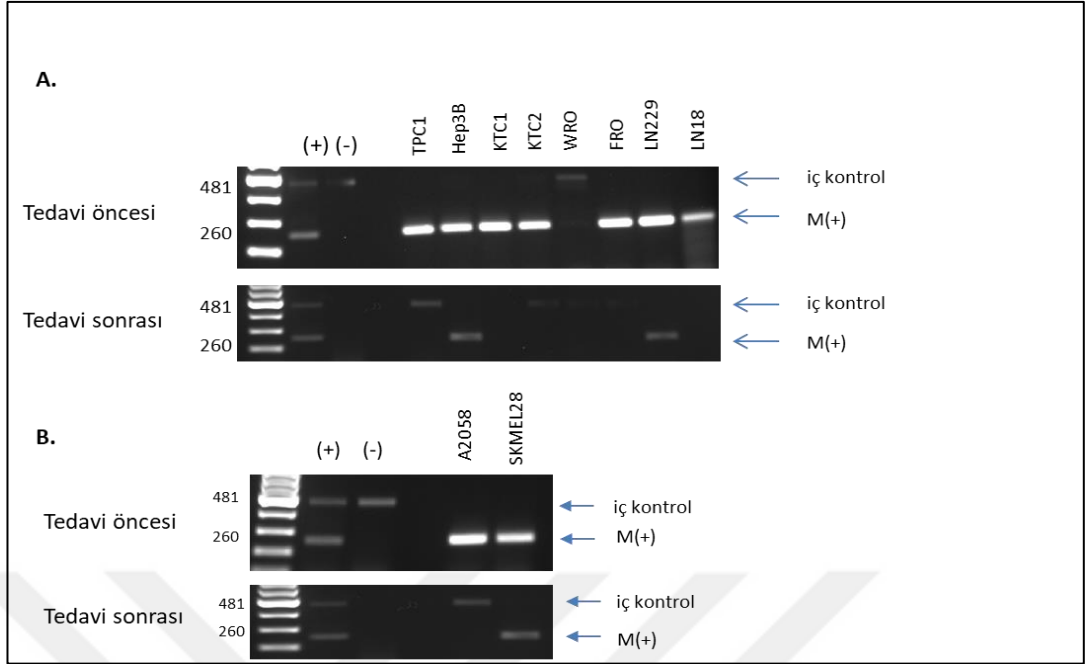
Sayı	Hücre Hattı	İlgili Kanser Tipi	<i>M.spp</i> Test Sonucu	Dondurulan Cryo Tüpler	Dondurulan Peletler
1	SNU182	HK	Negatif	9	4
2	SNU 449	HK	Negatif	9	5
3	SNU398	HK	Negatif	9	3
4	Huh7	HK	Negatif	9	5
5	SNU 475	HK	Negatif	9	3
6	SNU387	HK	Negatif	9	3
7	Hep3B	HK	Pozitif	2	1
8	SNU423	HK	Pozitif	hücreler atıldı	
9	TPC1	TK	Pozitif	9	3
10	KTC1	TK	Pozitif	9	3
11	KTC2	TK	Pozitif	10	3
12	FRO	TK	Pozitif	9	3
13	WRO	TK	Pozitif	9	3
14	BCPAP	TK	Negatif	2	2
15	8505C	TK	Negatif	9	3
16	Nthyori3.1	TK	Negatif	9	2
17	TT	TK	Pozitif	2	1
18	LN229	GBM	Pozitif	2	1
19	U87MG	GBM	Negatif	9	3
20	A172	GBM	Negatif	9	3
21	LN18	GBM	Negatif	7	3
22	M059J	GBM	Negatif	9	3
23	Hs683	GBM	Negatif	3	2
24	MEWO	Melanom	Negatif	9	3
25	G361	Melanom	Negatif	9	3
26	A2058	Melanom	Pozitif	8	3
27	SK-MEL-28	Melanom	Pozitif	9	3

Japonya’daki sıkı kargo taşımacılığı kurallarından dolayı, altı TK hücre hattı (FRO, WRO, KTC1, KTC2, KTC3 ve TPC1) sıvı azotta dondurulmadan flasklar içinde gelmiştir ve geldikleri anda hücre kültüründe büyütülmeye başlanmıştır. Dr. Mitsutake’nin önerisiyle KTC1 dışındaki tüm hücreler RPMI bazlı besiyerinde, KTC1

hücreleri ise yüksek glikoz içeren DMEM bazlı besiyerinde büyütülmüştür. KTC3 hücreleri hiçbir zaman %10'dan fazla yoğunluğa (confluency) ulaşmamış ve çalışmada kullanılamamıştır. Fransa'dan gelen tiroid hücre hatları ise sorunsuz bir şekilde büyütülmüştür. TT hücreleri parafoliküler orijinli olduğu için bu hücreler kısa süre büyütülüp atılmıştır. Foliküler orijinli diğer tüm TK ve immortalize tiroid hücre (Nthyori3.1) peletleri ve hücre stokları da aynı şekilde saklanmıştır (Tablo 4.1).

4.1.2. Supernatanların *M.spp* testi için kullanılması

Elde edilen hücre hatlarında, *M.spp* enfeksiyonunun varlığını araştırmak amacıyla, bir miktar supernatan ACIBADEM LABMED Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir. SNU 423 ve Hep3B dışında açılan tüm HK hücreleri *M.spp* testinde negatif çıkmıştır (Tablo 4.1). SNU423 hücreleri dışında pek çok HK hücresi C228T mutasyonu taşıdığından dolayı (Tablo 3.1) bu hücrelerin çalışma dışında bırakılmasına karar verilmiştir. HK hücrelerinin ardından, GBM ve TK hücrelerinden elde edilen supernatanlar da test edilmiştir. Sonuçta, 6/9 TK, 1/6 GBM, 2/4 melanom hücresi *M.spp* testinde pozitif çıkmıştır (Şekil 4.1, A). Pozitif hücre sayısı beklenenden fazla olunca, test kendi araştırma laboratuvarımızda PZR yöntemi kullanılarak tekrar edilmiştir. Sonuç olarak, HK, TK ve GBM için *M.spp* sonuçları konfirme edilmiş ve toplam 8/22 hücre hattı *M.spp* pozitif bulunmuştur (Tablo 4.1). *M.spp* pozitif çıkan hücreler çalışmamız için kritik hücreler olabileceğinden, bu hücreler üç hafta boyunca değişimli kullanılan iki antibiyotik (Tiamutin, Minosiklin) ile tedavi edilmiş ve tekrar PZR ile test edilmiştir (Şekil 4.1 B, Tablo 4.2). Şekil 4.1 ve Tablo 4.2'den görüleceği gibi, Hep3B, LN229 ve SK-MEL-28 dışındaki tüm hücrelerde, *M.spp* enfeksiyonu verilen antibiyotiklerle başarıyla tedavi edilmiştir. *M.spp* enfeksiyonu temizlenemeyen hücreler (Hep3B, LN229, SK-MEL-28) ise ileriki çalışmalara dahil edilmemiştir.



Şekil 0.1: *M.spp* enfeksiyonunun değişikli kullanılan iki antibiotik ile tedavi edilmesi. *M.spp* testinde pozitif çıkan (A) TK, HK, GBM ve (B) melanom hücreleri, PZR bazlı kit ile tekrar analiz edilmiştir (üst paneller). Üç hafta boyunca değişikli olarak Tiamutin ve Minosiklin ile tedavi sonrası 7/10 hücre hattında *M.spp* enfeksiyonu başarıyla elimine edilmiştir (alt paneller). M(+): *M.spp* pozitif PZR ürünü; (+) pozitif kontrol, (-) negatif kontrol

Tablo 4.2: *M.spp* pozitif olan hücre hatlarının son durumu. LN229, Hep3B ve SKMEL28 hücreleri antibiyotik tedavisinden fayda görmemiştir. SNU 423 hücreleri dışında C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan başka HK hücreleri olduğu için, TT hücreleri ise parafoliküler orijinli olduğu ve çalışmada kullanılmayacağı için tedavi edilmemiştir.

Hücre Hattı	İlgili Kanser Tipi	<i>M.spp</i> Testi	Tedavi Sonrası
Hep3B	HK	Pozitif	Pozitif
SNU423	HK	Pozitif	Tedavi edilmedi
TPC1	TK	Pozitif	Tedavi edildi
KTC1	TK	Pozitif	Tedavi edildi
KTC2	TK	Pozitif	Tedavi edildi
FRO	TK	Pozitif	Tedavi edildi
WRO*	TK	Pozitif	Tedavi edildi
TT**	TK	Pozitif	Tedavi edilmedi
LN229	GBM	Pozitif	Pozitif
A2058	Melanom	Pozitif	Tedavi edildi
SK-MEL-28	Melanom	Pozitif	Pozitif

4.1.3. Hücre peletlerinin DNA izolasyonu için kullanılması

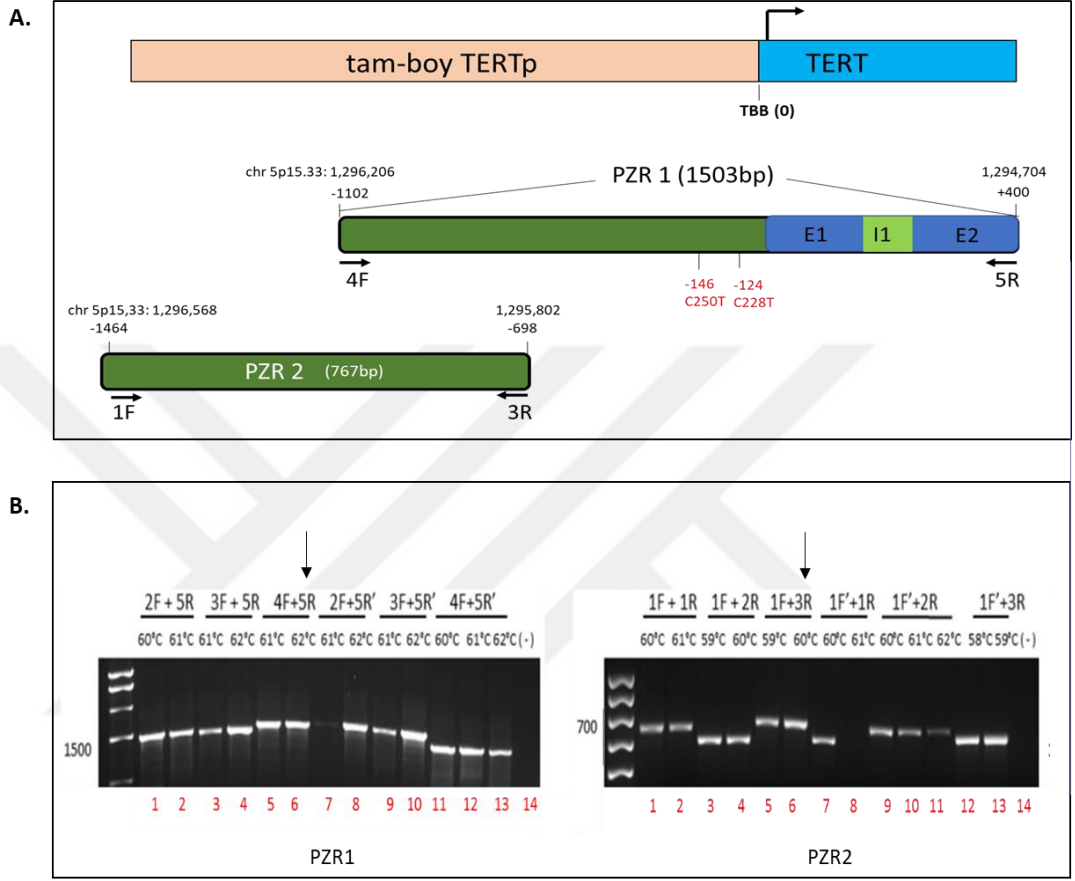
Dondurulan hücrelerin, *TERTp* profilinin belirlenebilmesi amacıyla, öncelikle -80°C’de bulunan SNU 398 hücre peletinden genomik DNA (gDNA) izole edilmiş ve ilk PZR optimizasyon çalışması için kullanılmıştır. Literatürde, seçilen kanser türlerinde, *TERTp* bölgesinde en sık görülen mutasyonların C228T ve C250T olduğu bildirilmiştir (16-19, 21-24, 29). Ancak, *TERTp* mutasyonlarının sadece bu iki bölge ile sınırlı olmadığı gösterilmiştir (16, 74, 212). Dolayısıyla, bu tez çalışmasında, öncelikle C228T veya C250T mutasyonları varlığı araştırılmış, mutasyon bulunmadığında ise tam boy *TERTp* sekansı elde edilerek, herhangi bir mutasyon veya tek nükleotit polimorfizminin (SNP) olup olmadığı belirlenmiştir.

Tam boy *TERTp* bölgesinin, üst üste binen iki farklı PZR ürünü ile kapsanacağı düşünülerek (Şekil 4.2A), iki PZR ürünü için de altışar primer seti oluşturulmuştur. PZR, her primer seti için iki farklı erime sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür (Şekil 4.2B). Şekilde görüldüğü gibi, neredeyse her erime sıcaklığında tam boy *TERTp*, PZR ile başarıyla çoğaltılmıştır. Sonuç olarak, diğer çalışmalarda, her iki PZR için de Şekil 4.2B’de ok ile gösterilen primerler ve erime sıcaklıklarının kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.4. Farklı hücre hatlarında *TERTp* mutasyon profilinin belirlenmesi

Tablo 4.2’de gösterilen hücre hatlarında *TERTp* mutasyon profilinin belirlenebilmesi amacıyla, SNU398 hücreleriyle yapıldığı gibi, öncelikle HK, TK ve melanom hücre peletlerinden gDNA izole edilmiştir. *TERTp*’da sık görülen C228T ve C250T mutasyonları PZR1 ampliconunun içinde olduğu için, Şekil 4.2B’de ok ile gösterilen reaksiyon tekrarlanarak PZR1 ampliconları elde edilmiştir. PZR1 ampliconlarında proksimal promotör mutasyon analizi yapmak amacıyla ACIBADEM LABGEN’de rutin olarak kullanılan *TERTp_ıç2bF* primeri kullanılmıştır (Tablo 3.5). Bu çalışmadaki HK hücrelerinin 4/6’sında (%67) C228T mutasyonu tespit edilmiştir (Tablo 4.3). TK hücrelerinin 6/8’inde (%75), C228T veya C250T mutasyonu belirlenmiştir. BCPAP hücrelerinde, C228T mutasyonuna ek olarak, C229T

mutasyonu da (CC228-229TT) tespit edilmiştir. A2058, Mewo, SK-Mel-28, ve G361 hücrelerinde ise sırasıyla C228T, C250T, G239T ve CC242/243TT mutasyonları olduğu gösterilmiştir.



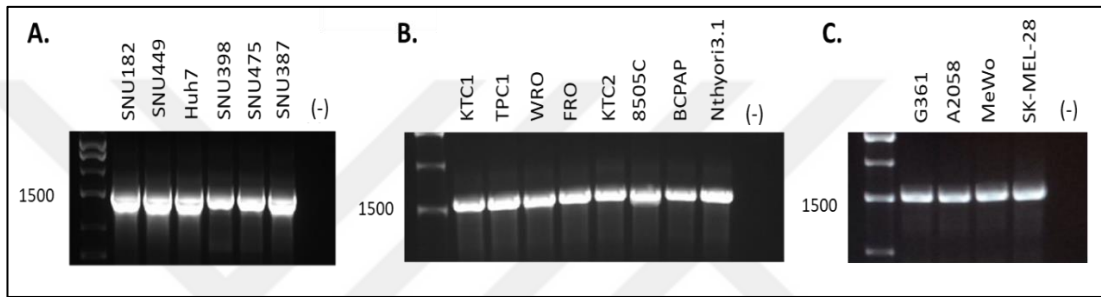
Şekil 0.2: Tam boy telomeraz promotör bölgesinin PZR optimizasyonu. (A) Tam boy *TERTp* amplifikasyon planı. 1577 baz çiftlik PZR1 ampliconu, transkripsiyon başlangıç bölgesinin (TBB) sırasıyla 1032 ve 534 baz yukarı ve aşağısı arasında kalan bölgenin amplifikasyonu ile elde edilmiştir. Tüm hücre hatlarının *TERTp* mutasyon profilini belirlemek için ilk olarak bu amplicon üretilmiş ve sekanslanmıştır. PZR1 ampliconunda mutasyon bulunamayan hücrelerde, TBB'nin 1464 ve 731 yukarısı arasındaki bölgeyi içeren PZR2 ampliconu da elde edilmiş ve sekanslanmıştır. (B) 2 µL PZR1 ampliconu (sol panel) %1'lik, PZR2 ampliconu (sağ panel) ise %2'lik agaroz jeline yüklenmiş, seçilen optimum PZR'ler, ok işaretleri ile belirtilmiştir. E1-E2: ekzon 1-2; I1: intron 1; F-F': ileri primerler; R-R': geri primerler; (-) negatif kontrol

Tablo 4.3: Hücre hatlarının *TERTp* mutasyon profili. HK, tiroid, melanoma ve GBM hücre hatlarından elde edilen gDNA ile önce PZR1 ve Sanger dizileme gerçekleştirilmiştir. TBB'den 350 baz uzaktaki bölge distal (uzak) promotör bölgesi olarak kabul edilmiştir. Proksimal (350 baza kadar olan bölgede) promotörde mutasyon bulunmayan hücrelerin gDNA'sı ile PZR2 ve ardından Sanger dizileme uygulanarak, *TERTp*'un tam boy sekansı elde edilmiştir. Tam boy promotör dizileme sonucunda tespit edilen SNP'ler de ayrıca belirtilmiştir. Analiz sonucunda kullanılan hücre hatlarının mutasyon profili literatürde bulunan bilgiyle konfirme edilmiş, literatürde bulunmayanlar (*) ise ilk defa bu çalışmada belirlenmiştir. 1072 (CC), 349(CC) ve 1256-1260C ins SNP databazındaki rs7712562, rs2853669 ve rs3215401 SNPLerine denk gelmektedir. WT: tam boy *TERT* promoturunda mutasyon bulunmayan hücre hattı

Sayı	Hücre Hattı	İlgili Kanser Tipi	Proksimal Promotör	Distal Promotör
1	SNU182*	HK	WT	1072 (CC)
2	SNU 449*	HK	WT	1072 (CC)
3	SNU398	HK	C228T	
4	Huh7	HK	C228T	
5	SNU 475	HK	C228T	
6	SNU387	HK	C228T	
7	TPC1	PTK	C228T	
8	KTC2	ATK	C228T	
9	BCPAP	PTK	CC228-229TT	
10	FRO*	ATK	C250T	
11	KTC1	PTK	C250T	
12	8505C	ATK	C250T	
13	WRO*	FTK	349 (CC)	1072 (CC) 1256-1260Cins
14	Nthyori3.1*	Immortalize tiroid hücresi	WT	1072 (CC)
15	LN229*	GBM	C228T	
16	U87MG	GBM	C228T	
17	A172	GBM	C228T	
18	M059J	GBM	C228T	
19	Hs683	GBM	C250T	
20	LN18*	GBM	349 (CC)	1072 (CC) 1256-1260Cins
21	A2058*	melanom	C228T	
22	MEWO*	melanom	C250T	
23	SK-MEL-28*	melanom	G239T	
24	G361*	melanom	CC262/263TT	

HK, TK ve melanom hücrelerinin ardından, GBM hücrelerinden elde edilen gDNA'lar ile PZR1 reaksiyonu kurulduğunda, Şekil 4.3'te görülen kaliteli özgül amplikonlar elde edilememiştir. Taq (Promega) enzimi yerine Pfusion High Fidelity DNA polimeraz enzimi kullanılıncaya özgül amplikonlar elde edilmiş ancak reaksiyona

eklenen yeşil tampondan dolayı sekanslama reaksiyonu başarılı olmamıştır. Bu denemenin ardından, daha önce kullanılan kitin içinde bulunan alternatif kimyasallar tek tek denenerek hangi solüsyonda problem olduğu araştırılmıştır (Şekil 4.4A). A172 (GBM) ve KTC1 hücrelerinin PZR'si denenmiş ancak başarılı sonuç alınamamıştır. Sonuçta, 4F+5R primer setindeki geri primerde problem olduğu anlaşılmış ve PZR1 reaksiyonu biraz daha büyük ampikon oluşturan 2F ve 5R' primerleriyle tekrar edilmiştir (Şekil 4.4B). Buna göre, 5/6 (%83) GBM hücre hattında C228T veya C250T mutasyonu tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

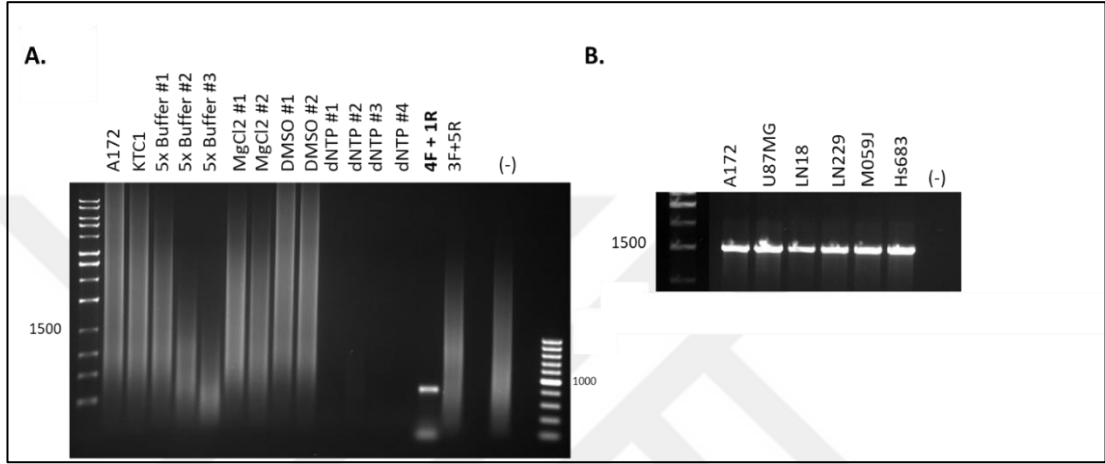


Şekil 0.3: HK, TK ve melanom hücre hatlarında proksimal *TERTp* amplifikasyonu. (A) HK, (B) tiroid ve (C) melanom hücre hatlarından elde edilen gDNA'lar ile 1577 baz çiftlik ampikonu olan PZR1 reaksiyonu kurulmuş ve elde edilen ürünlerden 2 µL, %1'lik agaroz jelinde yürütülmüştür. Tiroid hücre hatları hem TK hem de immortalize olmuş normal tiroid hücrelerini (Nthyori3.1) içermektedir. (-): negatif kontrol

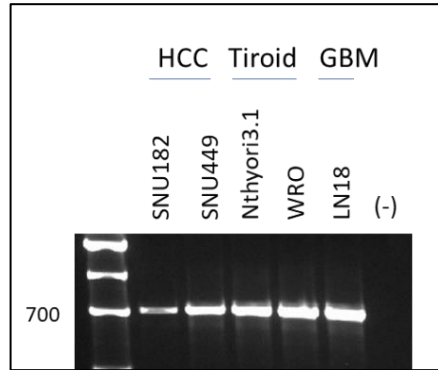
4.1.5. Hücrelerin tam boy *TERTp* dizi analizi

Proksimal *TERTp*'unda mutasyon bulunmayan hücrelerde (SNU449, SNU182, WRO, Nthy3.1 ve LN18), PZR'de kullanılan ileri ve geri primerlere ek olarak, ACIBADEM LABGEN'de rutin olarak kullanılan *TERTp*_dış1F, iç2aR, iç3R primerleri de kullanılmış ve PZR1 (SNU449, SNU 182, WRO, Nthyori3.1) veya PZR3'ün (LN18) tam dizisinin elde edilmesi sağlanmıştır. Bu hücrelerde, ayrıca *TERTp*_1F ve *TERTp*_3R primerleri kullanılarak PZR2 ampikonu elde edilmiş ve distal promotörün dizilenmesi sağlanmıştır (Şekil 4.5). Bu hücrelerin tam boy *TERTp* sekans sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir. Beklenenin aksine, bu beş hücre hattının hiçbirinde proksimal ya da distal *TERTp* mutasyonu tespit edilmemiştir. Ek olarak, her beş hücre hattında en az bir adet SNP tespit edilmiştir. İlginç olarak her 5 hücre hattında da rs7712562 SNP'inin (1072CC) var olduğu belirlenmiştir. WRO ve LN18

hücrelerinin proksimal ve distal *TERT* promotöründe ayrıca, sırasıyla, rs2853369 ve rs3215401 kodlu SNP'lerin C varyantı (349CC) ve C insersiyonunun (1256-1260Cins) olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada, elde edilen 55 hücre hattının yirmi dördünün *TERT**p* mutasyon profili belirlenmiştir (Tablo 4.4). Elde edilen amaçlı olmayan 22 hücre hattının mutasyon profili literatürden (17, 25, 26, 213) tespit edilmiştir.



Şekil 0.4: GBM hücreleri için PCR optimizasyon çalışmaları ve GBM hücre hatlarında proksimal *TERT* promotörünün amplifikasyonu (A) GBM hücre hatlarından elde edilen gDNA'lar ve PZR içinde kullanılan alternatif malzemeler ile PZR1 tekrar edilmiş ve 5R yerine 1R primerinin kullanıldığı reaksiyonun kaliteli ürün çıkarttığı (koyu renk) keşfedilmiştir. (B) GBM hücre hatlarının gDNA'ları, 2F ve 5R' primerleri kullanılarak PZR3 ampikonu elde edilmiştir. (-): negatif kontrol



Şekil 0.5: HK, TKve GBM hücre hatlarında distal *TERT**p*'unun amplifikasyonu. HK, GBM ve tiroid orijinli hücre hatlarından elde edilen gDNA'lar ile 774 baz çiftlik PZR2 reaksiyonu kurulmuş ve elde edilen ürünlerin 2 µL'si %2'lik agaroz jelinde yürütülmüştür. (-): negatif kontrol

Tablo 4.4: Farklı kaynaklardan elde edilen hücre hatlarının *TERTp* mutasyon profilinin belirlenmesi. 24 hücre hattında Sanger dizileme gerçekleştirilmiş, sekans sonuçları UCSC Genom Tarayıcı'da bulunan referans sekans ile karşılaştırılmış ve hücrelerin *TERTp* mutasyon profili belirlenmiştir. Bazı çözülmeyen hücre stoklarının *TERTp* mutasyon profili literatürden tespit edilmiştir (17, 25, 26, 213).

Hücre Orijini	Test Edilen	Literatürden belirlenen	Kalan	Toplam
HK	6	6	1	13
Tiroid (foliküler)	8	0	0	8
GBM	6	5	0	11
Melanom	4	0	5	9
MK	0	11	3	14
Tüm hücre hatları	24	22	9	55

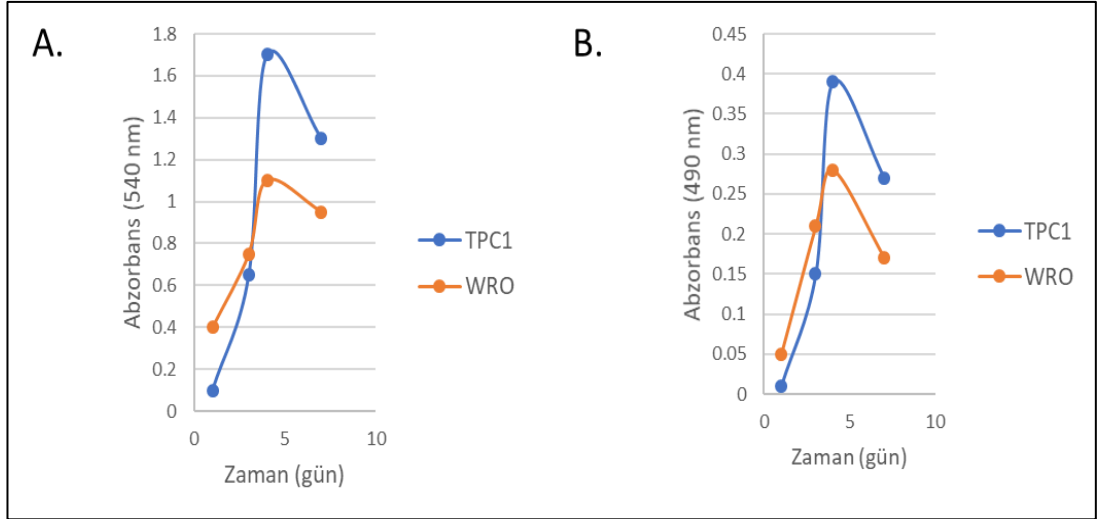
4.2. Tiroid Kanseri Hücrelerinin Epigenetik Kütüphane ile Taranması

4.2.1. SRB protokolünün optimizasyonu

Hücre canlılığının analiz edileceği SRB protokolünü optimize etmek amacıyla, 96 kuyulu plakaya, WRO ve TPC1 tiroid kanseri hücreleri ekilmiş, 1, 3, 4 ve 7 gün sonunda kitte belirtilen SRB protokolü uygulanmıştır. Protokolde 540-580 nm arası aborbans değerlerinin okunması önerilmiştir. Ancak, Şekil 4.6A'da, 540 nm'de elde edilen verilerin bir kısmı aborbans maksimum olan 1'in üstündedir. Bu nedenle, aborbans ölçümleri 490-530 nm arasında da tekrarlanmış ve bu dalga boyunda, tüm aborbans değerlerinin 0 ile 1 arasında olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.6B).

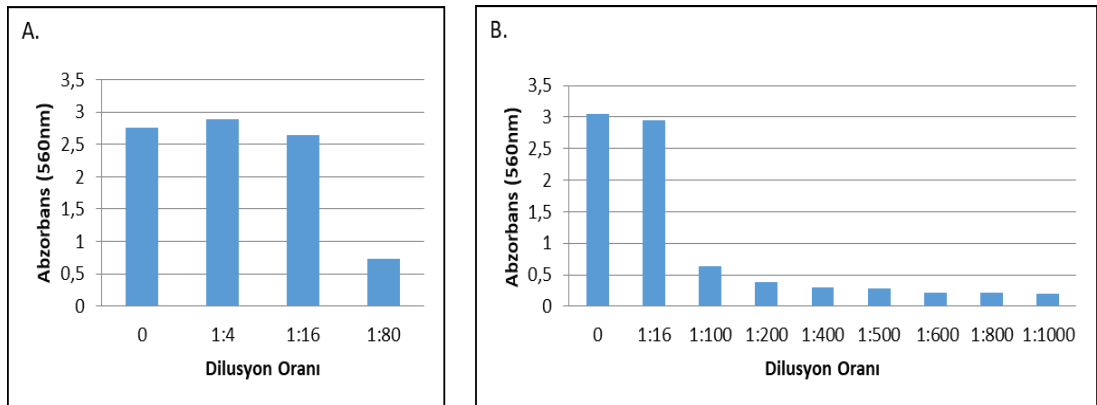
4.2.1.1. Farklı SRB boya dilusyonları ile SRB testinin tekrar edilmesi

Kitte belirtilen protokolü takip edebilmek için, SRB boyasının seyreltilerek kullanılması halinde aborbans değerlerinin 0 ile 1 arasında tespit edileceği hipotez edilmiştir. Bu hipotezi test etmek amacıyla, hücre canlılığı, üç farklı SRB boya dilusyonu kullanılarak yapılmıştır. Hücre ekiminden üç gün sonra, ancak 1:80 oranında SRB boyası kullanıldığında 560 nm'deki aborbans değeri, aborbans maksimumdan ($Abs_{maks} = 1$) düşüktür (Şekil 4.7A).



Şekil 0.6: Plaka okuyucuda alınan abzorban değerlerinin karşılaştırılması (A, B) 7500 WRO ve TPC1 tiroid kanseri hücreleri 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 1, 3, 4 ve 7 gün sonunda kitede belirtilen SRB protokolü uygulanarak plaka okuyucuda (A) 540 nm ve (B) 490 nm’de abzorban değerleri ölçülmüştür. Tüm analizlerde triplike ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

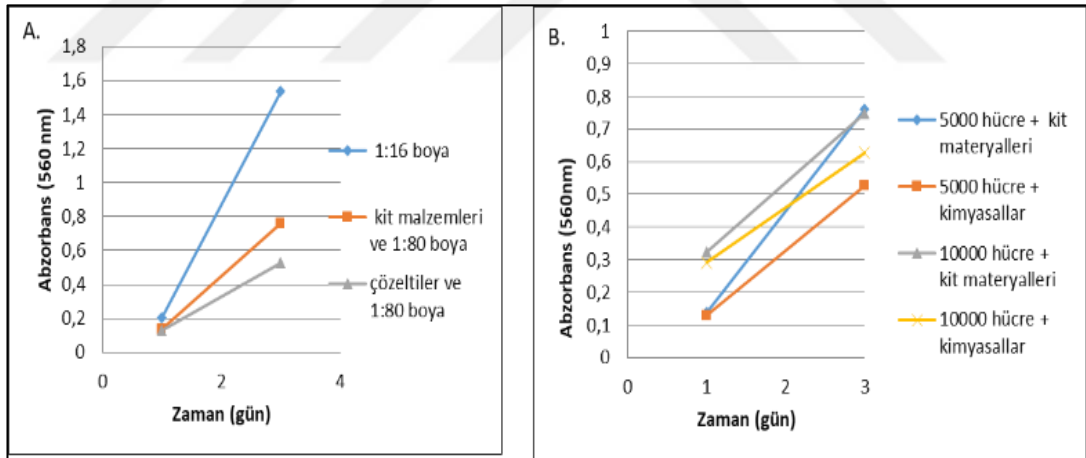
İkinci denemede, SRB boyası 1:1000’e kadar seyreltilmiş ve boyanın seyreltilmesi ile abzorban değerlerinin parabolik olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.7B). Ayrıca, 560 nm’de hücre canlılığı analizi için, 1:80’den fazla seyreltmenin gerekli olmadığı gösterilmiştir.



Şekil 0.7: Farklı SRB boya dilüsyonları kullanarak elde edilen abzorban değerlerinin karşılaştırılması. 7500 TPC1 hücresi 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 4. gün sonunda kitede belirtilen SRB protokolü uygulanarak plaka okuyucuda abzorban değerleri (560 nm) ölçülmüştür. SRB protokolü uygulanırken SRB boyası (A) 1:4-1:80 (B) 1:16-1:1000 arasında seyreltilerek kullanılmıştır. Tüm analizlerde triplike ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

4.2.1.2. Kitte kullanılan çözeltiler yerine laboratuvarında oluşturulan çözeltilerin kullanılması

SRB boyası 1:80 seyreltilince, diğer kit çözeltilerine kıyasla kitte kalan boya miktarı artmıştır. Referans protokolde (214), kit malzemeleri yerine kullanılabilen alternatif malzemeler belirtilmiştir. Dolayısıyla, laboratuvarında oluşturulan çözeltiler kullanılarak SRB hücre canlılığı testi tekrarlanmış ve kit malzemeleri yerine bu çözeltilerin kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır (Şekil 4.8A). 1:80 seyreltilmiş SRB boyası kullanıldığında, kit çözeltileri ile laboratuvarında hazırlanan benzer çözeltilerin, testin etkinliğini değiştirmediği ve kit malzemeleri yerine kullanılabilen ortaya konmuştur. Hazırlanan çözeltilerin, ekilen hücre sayısına bağlı olup olmadığını araştırmak amacıyla, 5000 ve 10,000 TPC1 hücresi 96 kuyulu plakaya ekilmiş ve SRB testi kit malzemeleri ve laboratuvarında hazırlanan çözeltiler kullanılarak tekrarlanmıştır. Her iki hücre yoğunluğunda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.8B).



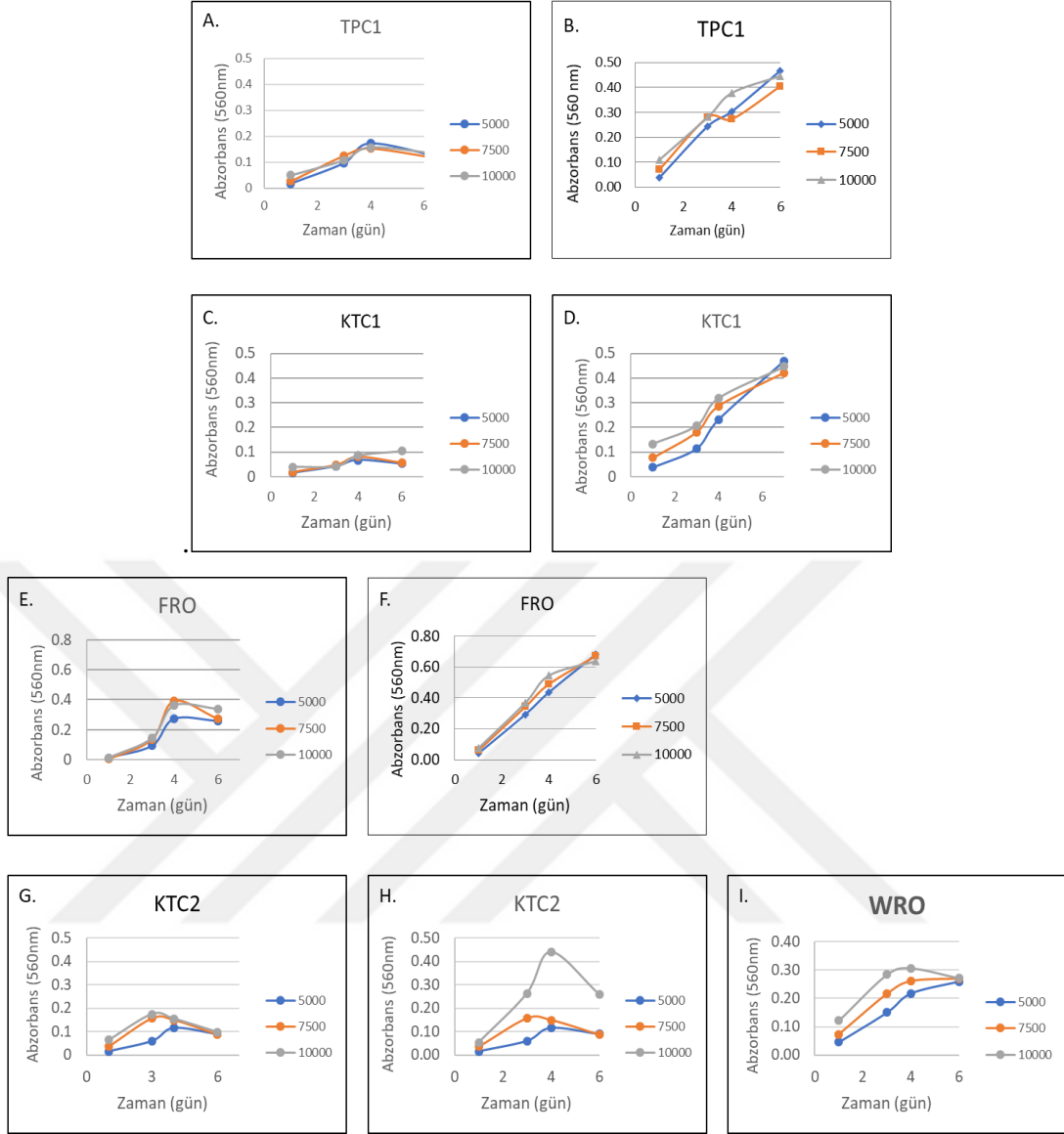
Şekil 0.8: Kite kullanılan çözeltiler ile laboratuvarında hazırlanan kimyasalların karşılaştırılması. (A) 7500 TPC1 hücresi 96 kuyulu plakaya triplike olarak ekilmiş, 1 ve 3 gün sonra kitte belirtilen SRB protokolü, 1:80 boya ile kit materyalleri veya laboratuvarında hazırlanan çözeltiler kullanılarak uygulanmıştır. 1:16 boya ve kit malzemeleri kontrol olarak kullanılmıştır. (B) 5000 veya 10,000 TPC1 hücresi 96 kuyulu plakaya triplike olarak ekilmiş, 1 ve 3 gün sonra SRB protokolü, kit materyalleri veya laboratuvarında hazırlanan çözeltiler kullanılarak uygulanmıştır. Abzorbans değerleri plaka okuyucuda (560 nm) ölçülmüştür. Tüm analizlerde triplike ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

4.2.2. Ekilen hücre sayısının belirlenmesi

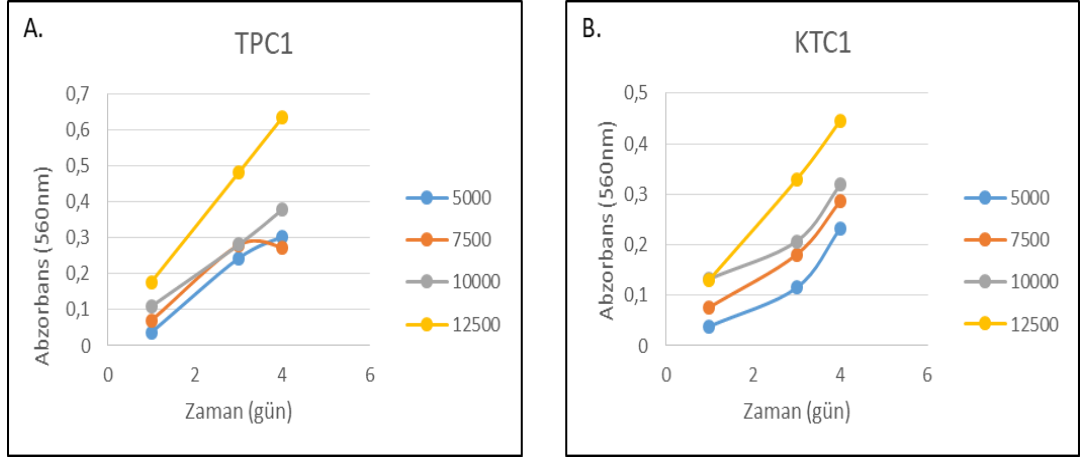
Hücrelerin ilaçlar ile inkubasyonu öncesinde, hücrelerin proliferasyon (eksponansiyel) evresinde olduğundan emin olunmalıdır (215). Bu nedenle, hücreler epigenetik ilaç kütüphanesi ile inkübe edilmeden önce, her birinin plakaya ekim yoğunluğu ayrı ayrı analiz edilmiştir. İlk aşamada, WRO, KTC1, KTC2, FRO ve TPC1 hücreleri üç farklı yoğunlukta (5000, 7500 ve 10,000) ekilmiş ve SRB protokolü uygulanmıştır (Şekil 4.9 A, C, E, G, I). Analiz edilen tüm hücrelerin ekimden dört gün sonra büyümeyi durdurduğu gözlemlenmiştir.

4.2.2.1. *M.spp* enfeksiyonu tedavisinden sonra hücre ekim yoğunluğunun araştırılması

Daha önce belirtildiği gibi, KTC1, KTC2, FRO ve TPC1 hücrelerinde (*M.spp*) enfeksiyonu tespit edilmiştir (Şekil 4.1). *M.spp* enfeksiyonunun hücre metabolizmasını etkilediği bilinmektedir (216, 217). Yaklaşık bir aylık antibiyotik tedavisi ile *M.spp* enfeksiyonunun temizlenmesinin ardından, hücre ekim çalışması tekrar edilmiştir (Şekil 4.9 B, D, F). TPC1, KTC1 ve FRO hücrelerinde dördüncü günden sonra da proliferasyon gözlemlenmiştir. KTC2 hücrelerinde ise, tedavi öncesi aborbans değerleri 0,2'nin altında iken, tedavi sonrasında, 10,000 hücre ekilen kuyularda proliferasyon hızının arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9H). TPC1, KTC1 ve FRO hücrelerinin her üç yoğunlukta ekildiklerinde de eksponansiyel fazda olduğu, ekilen hücre sayısı ile hücre proliferasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9B). İlk aşamada, ekilebilecek maksimum hücre sayısı WRO ve KTC2 hücreleri için 7500 ve 10,000 olarak belirlenmiştir. TPC1 ve KTC1 hücrelerinde, ekilen hücre sayısı ile hücre proliferasyonda artış görüldüğü için (Şekil 4.9B), SRB testi dört farklı yoğunlukta (5000, 7500, 10,000 ve 12,500) TPC1 ve KTC1 hücreleri ekilerek tekrarlanmıştır (Şekil 4.10). Hücre proliferasyonunun maksimum değerlere ulaştığı noktalar tespit edilmiştir. KTC1 ve TPC1 hücreleri için ekilebilecek maksimum hücre sayısı 12,500 olarak belirlenmiştir.



Şekil 0.9: *M.spp* enfeksiyonunun tedavisi öncesi ve sonrasında hücre büyüme eğrilerinin karşılaştırılması. (A, C, E, G, I) Farklı TK hücre hatları üç farklı yoğunlukta 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 1, 3, 4 ve 6 gün sonunda SRB protokolü uygulanmıştır. (B, D, F, H) TPC1, KTC1, FRO ve KTC2 hücrelerindeki *M. Spp* enfeksiyonunun antibiyotik ile tedavi edilmesinin ardından, hücreler 3 farklı yoğunlukta 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 1, 3, 4 ve 6 gün sonunda SRB protokolü uygulanmıştır. Tüm analizlerde triplik ölçümlerin ortalaması alınmıştır. WRO hücreleri *M. Spp* enfeksiyonu taşımadığı için antibiyotik ile tedavi edilmemiştir.



Şekil 0.10: Dört farklı yoğunlukta ekilen TPC1 ve KTC1 hücrelerinin büyüme eğrilerinin karşılaştırılması. (A) TPC1 ve (B) KTC1 hücreleri 4 farklı yoğunlukta 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 1, 3, ve 4 gün sonunda SRB protokolü uygulanmıştır. Abzorbans değerleri plaka okuyucuda (560 nm) ölçülmüştür. Tüm analizlerde triplike ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

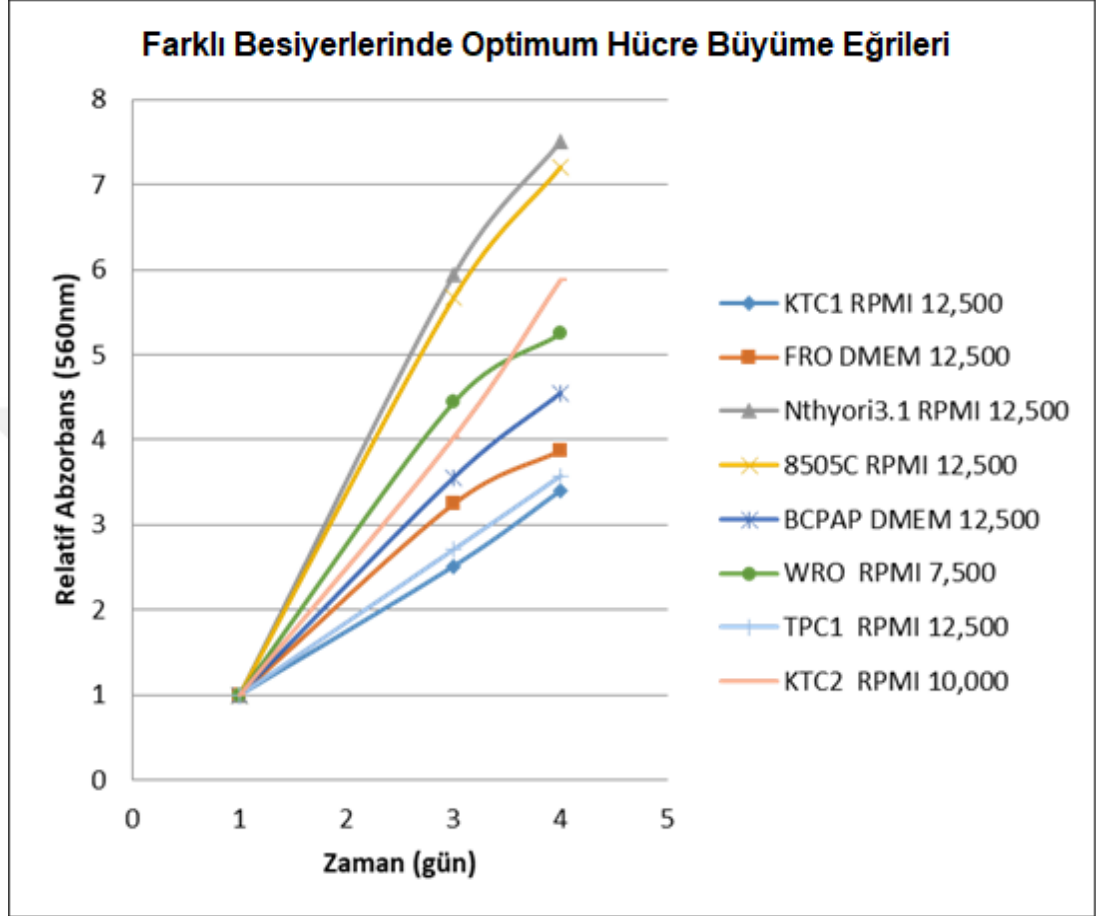
4.2.2.2. Hücre büyüme eğrilerinin RPMI ve DMEM bazlı besiyerinde karşılaştırılması

Literatürde, farklı çalışmalarda, Nthyori3.1, 8505C ve BCPAP hücre hatlarının hem DMEM hem de RPMI bazlı besiyerinde çoğaldığı belirtilmiştir (24, 218, 219). Hem bu hücrelerin hem de Şekil 4.9’da gösterilen diğer beş hücre hattının en iyi hangi besiyerinde büyüdüğünü araştırmak amacıyla, sekiz tiroid hücre hattı DMEM ve RPMI bazlı ortama, üç farklı yoğunlukta ekilmiştir. Hücrelerden elde edilen en dik büyüme eğrileri Şekil 4.11’da gösterilmiştir. Optimal ekim yoğunlukları WRO hücreleri için RPMI bazlı ortamda 7500, KTC2 hücreleri için ise 10,000 olarak tespit edilmiştir. Diğer altı hücre hattı için 12,500 hücre ekimi sonucunda, en uygun proliferasyon eğrisinin olduğu gözlemlenmiştir. Sekiz hücre hattından, sadece FRO ve BCPAP için DMEM besiyerinin daha elverişli olduğu gösterilmiştir.

4.2.2.3. Hücre ekim yoğunluğunun DMSO varlığında karşılaştırılması

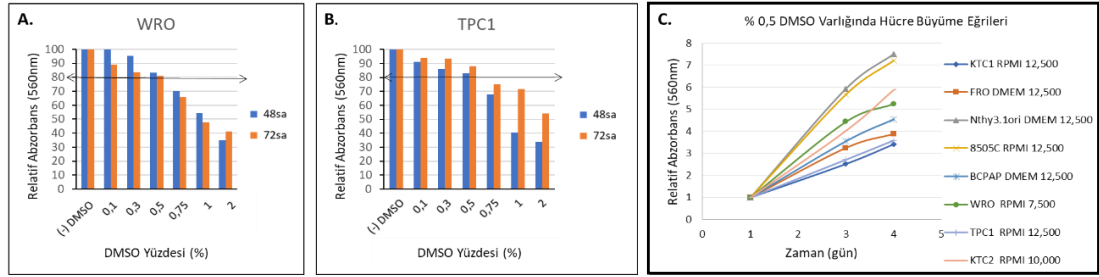
Satın alınan epigenetik ilaç kütüphanesinde bulunan ilaçlar dimetil sülfoksit (DMSO) ortamında çözülmüş olarak teslim alınmıştır. Literatürde, DMSO’nun hücrelerde sitotoksik etki yaratabileceği belirtilmiştir (220). Bu etki, hücre tipine göre

değişim gösterdiği için, DMSO'nun etkisi, Şekil 4.11'de belirlenen yoğunlukta ekilecek hücreler üzerinde araştırılmıştır.



Şekil 0.11: Tiroid hücre hatları için DMEM veya RPMI besiyerinde elde edilen optimum büyüme eğrileri. Hücre hatları, DMEM veya RPMI bazlı besiyeri kullanılarak 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 1, 3 ve 4 gün sonunda SRB protokolü uygulanmıştır. Epigenetik ilaç kütüphanesi 1. günde ekleneceği için abzorbans değerleri 1. günkü değerlere göre normalize edilmiştir. Her hücre hattı için sadece belirlenen optimum ekim koşulu gösterilmiştir. Tüm analizlerde triplike ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

Öncelikle WRO ve TPC1 hücreleri, Şekil 4.11'de belirtilen koşullarda ekilmiş, 24sa sonra kuyulara farklı yoğunlukta DMSO eklenmiştir (Şekil 4.12 A, B). DMSO yoğunluğu %0,5'in üstünde iken hücre canlılığı %80'in altına inmekte ve sitotoksik etki göstermeye başlamaktadır. Bu ilk çalışmanın ardından, sekiz tiroid hücre hattı, Şekil 4.11'de belirtilen koşullarda ekilmiş ve %0,5 DMSO'nun hücrelerin büyüme eğrilerinde değişiklik yapıp yapmadığı araştırılmıştır. Şekil 4.12C ve Şekil 4.11'deki büyüme eğrileri eşleşmektedir. Dolayısıyla, %0,5 DMSO'nun hücrelerin büyüme eğrileri üzerinde sitotoksik etkisi gözlenmemektedir.



Şekil 0.12: DMSO varlığında hücre büyüme eğrilerinin karşılaştırılması. (A) 7500 WRO veya (B) 10,000 TPC1 hücreleri RPMI bazlı besiyerinde 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 24 sa sonra kuyulara farklı yoğunlukta DMSO eklenmiştir. Ekimden 48 ve 72 sa sonra SRB protokolü uygulanmıştır. (C) Tiroid hücre hatları, DMEM veya RPMI bazlı büyüme ortamı kullanılarak 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 24 sa sonra, kuyulara %0,5 DMSO eklenmiştir. 1, 3, ve 4 gün sonunda SRB protokolü uygulanmıştır. Abzorbans değerleri, 1.gündeki (DMSO eklenmeden önceki) abzorbans değerlerine göre normalize edilmiştir. Tüm analizlerde triplicate ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

4.2.3. Hücre hatlarında *TERTp* mutasyonu dışında tespit edilen ikincil mutasyonlar

Epigenetik ilaç kütüphanesi ile inkübasyon öncesi, tiroid hücrelerinin sahip olduğu ikincil mutasyonlar kanser hücre databazlarında (221, 222) ve literatürdeki çalışmalarda araştırılmıştır. TPC1 hücrelerinde *RET/PTC* füzyonu; KTC1, KTC2, BCPAP ve 8505C hücrelerinde ise *BRAF* V600E mutasyonu tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Literatürde, FRO ve WRO hücrelerinin ikincil mutasyonları hakkında çelişkili bilgiler bulunmaktadır (223-226). Dolayısıyla, FRO ve WRO hücrelerinde *BRAF* ve *KRAS* mutasyon profili ACIBADEM LABGEN’de minidizileme ile belirlenmiştir. Anaplastik FRO hücrelerinde *BRAF* V600E mutasyonu tespit edilirken, WRO hücrelerinde bu mutasyonun var olmadığı görülmüştür (Şekil 4.13). Her iki hücre tipinde de *KRAS* ekzon 2’de yer alan kodon 12/13 mutasyonu tespit edilmemiştir (Şekil 4.14).

Tablo 4.5: TK hücrelerinin *BRAF* ve *KRAS* mutasyon profili. TK hücre hatlarının sahip olduğu ikincil mutasyonlar halka açık databazlarda ve literatürde araştırılmış, FRO ve WRO hücrelerinin *BRAF* V600E mutasyon profili hakkında çelişkili ifadelerle rastlandığı için (223-226), bu hücrelerden elde edilen genomik DNA kullanılarak *BRAF* ve *KRAS* genleri, ACIBADEM LABGEN’de PZR amplifikasyonu ile çoğaltılmış, *BRAF* V600 (ekzon 15) ve *KRAS* ekzon 2 kodon 12/13 bölgeleri sekanslanmıştır. * ile işaretli mutasyonlar bu çalışmada belirlenmiştir. Proksimal *TERTp*’da belirlenen mutasyonlar Tablo 4.3’te belirtilmiştir. WT: mutasyon taşımayan hücre.

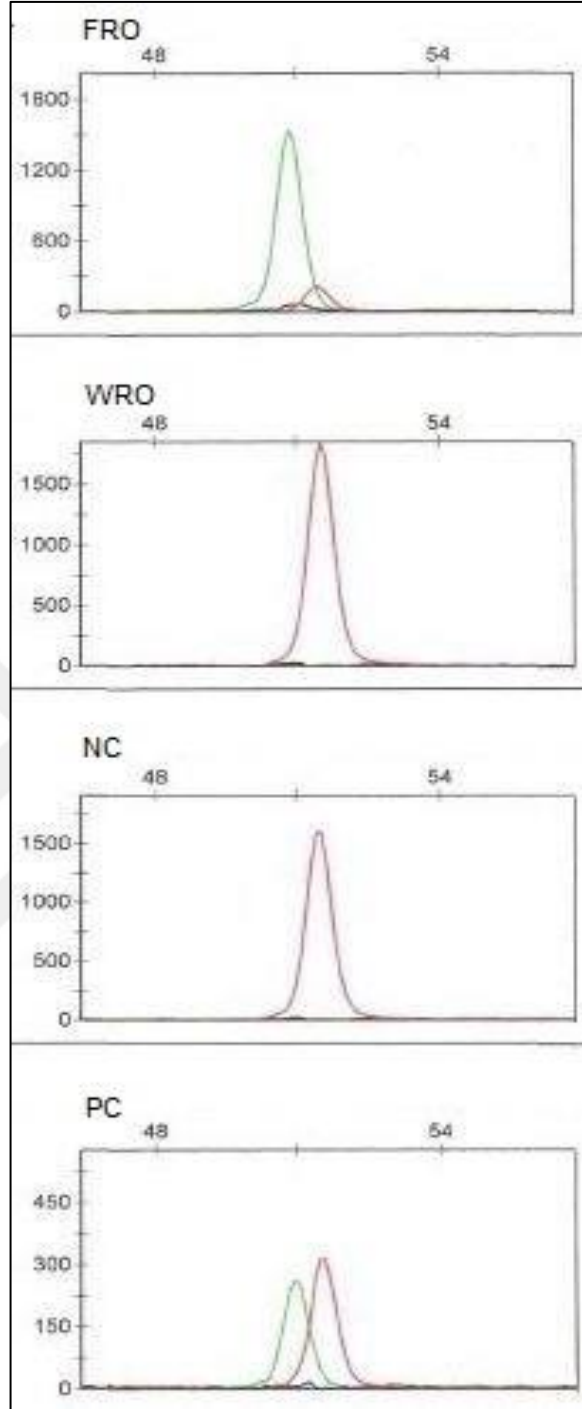
	Hücre Hattı	Proksimal <i>TERTp</i>	2incil Mutasyon
1	TPC1	C228T	<i>RET/PTC</i> füzyonu ¹
2	KTC2	C228T	<i>BRAF</i> V600E ²
3	BCPAP	C228T	<i>BRAF</i> V600E ³
4	KTC1	C250T	<i>BRAF</i> V600E ⁴
5	8505C	C250T	<i>BRAF</i> V600E ⁵
6	FRO	C250T	<i>BRAF</i> V600E* <i>KRAS</i> (Kodon 12/13) WT*
7	WRO	WT	<i>BRAF</i> WT* <i>KRAS</i> (Kodon 12/13) WT*
8	Nthyori3.1	WT	<i>BRAF</i> WT ⁶

- 1- (24, 225-228)
- 2- (24, 225)
- 3- (24, 225, 227-229)
- 4- (24, 225, 227-229)
- 5- (24, 225, 227-230)
- 6- (231)

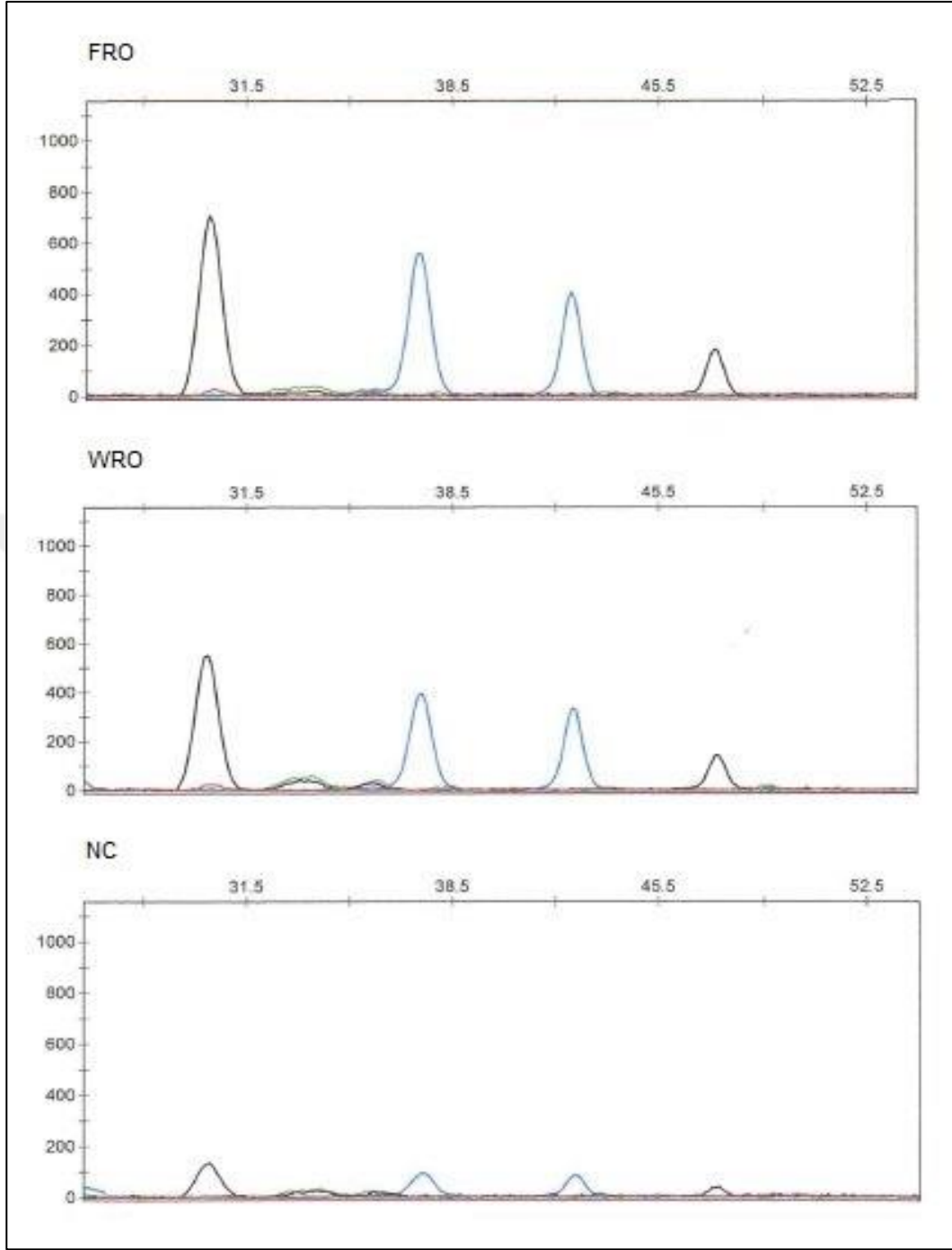
4.2.4. İlaç tedavileri

4.2.4.1. Hücrelerin epigenetik ilaç kütüphanesi ile inkübasyonu

TERTp mutasyonu taşımayan WRO hücreleri (*TERTp* WT), *TERTp* mutasyonu taşıyan ancak *BRAF* mutasyonu taşımayan TPC1 hücreleri (*TERTp* MT/*BRAF* WT) ve hem *TERTp* hem de *BRAF* V600E mutasyonu taşıyan KTC2 hücreleri (*TERTp*/*BRAF* MT), 96 kuyulu plakalara ekilmiş, 24 saatin ardından hücrelere iki farklı dozda 51 adet epigenetik ilaç eklenmiştir. İlaçlarının etkisinin görüldüğü zamanı belirleyebilmek için, hücrelerin yarısı 48 sa, diğer yarısı ise 72 sa sonra inkübatörden alınıp SRB testine tabi tutulmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 0.13: FRO ve WRO hücrelerinde *BRAF* V600E mutasyon varlığının minidizileme ile araştırılması. 5 milyon anaplastik FRO ve foliküler WRO hücrelerinden gDNA izole edilmiş, ACIBADEM LABGEN’de *BRAF* V600E (ekzon 15) mutasyon analizi yapılmıştır. Negatif ve pozitif kontrol olarak sırasıyla steril distile su ve mutasyon taşıdığı daha önce gösterilmiş örnek kullanılmıştır. NC: negatif kontrol; PC: pozitif kontrol



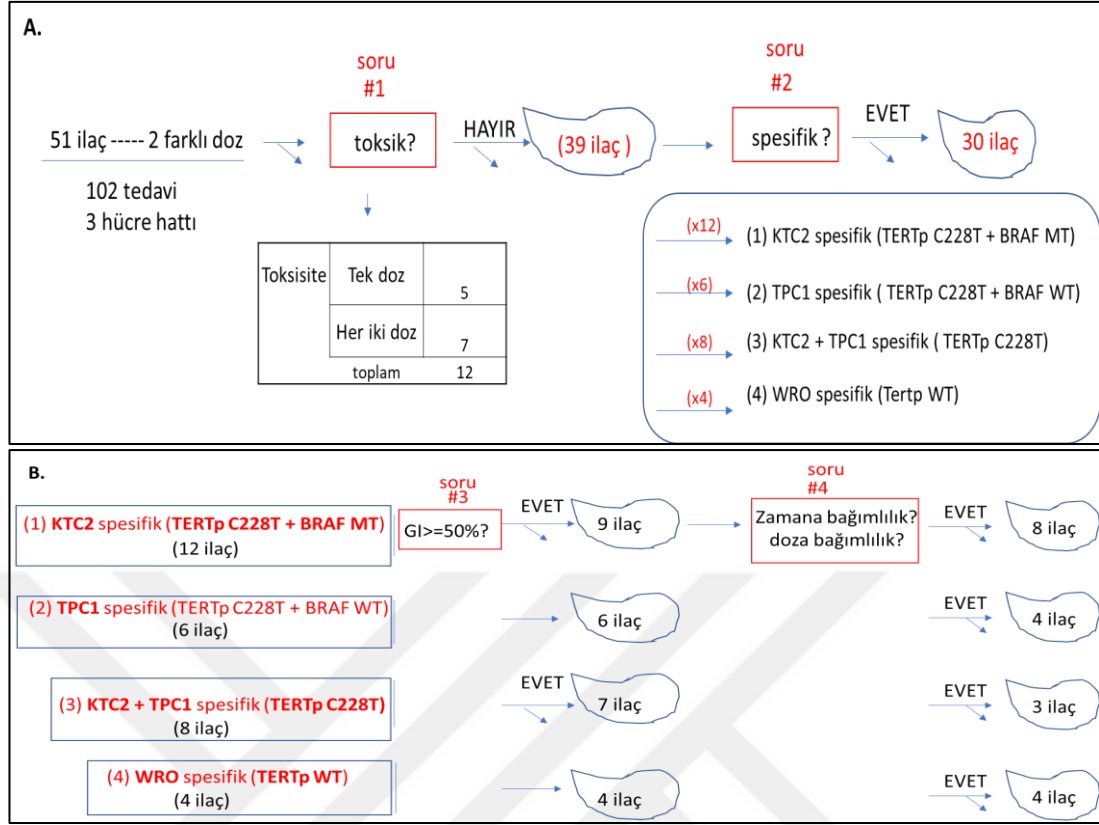
Şekil 0.14: FRO ve WRO hücrelerinde *KRAS* ekzon 2 (kodon 12/13) mutasyon varlığının minidizileme ile araştırılması. 5 milyon anaplastik FRO ve foliküler WRO hücrelesinden genomik DNA izole edilmiş, ACIBADEM LABGEN’de *KRAS* ekzon 2 (kodon 12/13) mutasyon analizi yapılmıştır. Negatif ve pozitif kontrol olarak sırasıyla steril distile su ve mutasyon taşıdığı daha önce gösterilmiş örnek kullanılmıştır. NC: negatif kontrol; PC: pozitif kontrol

SRB testi sonunda, kuyulardaki abzorban değerleri plaka okuyucuda belirlenmiş ve %GI verileri hesaplanmıştır. Öncelikle ilaçların sitotoksitesi değerlendirilmiş, verilen dozlardan birinde sitotoksik olan beş ilaç, her iki dozda da sitotoksik olan yedi ilaç tespit edilmiştir (Şekil 4.15A). En az bir dozda sitotoksik olmayan 44 ilaç içinden bir veya birden çok hücre tipine özgül olan 30 ilaç belirlenmiştir. Bu ilaçlardan on iki tanesi sadece *TERTp/BRAF* MT olan KTC2 hücrelerine özgüldür. Ek olarak, *TERTp* MT/ *BRAF* WT olan TPC1 hücrelerine altı, *TERTp* WT olan WRO hücrelerine dört özgül ilaç belirlenmiştir. Ayrıca, *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelere (KTC2 ve TPC1) özgül sekiz ilaç daha belirlenmiştir.

Bir sonraki aşamada, tespit edilen %GI değerlerinden etkili (%50'nin üzerinde) olanlar seçilmiştir (Şekil 4.15B, Tablo 4.6). Son olarak, seçilen ilaç tedavilerin zamana ve doza bağımlılıkları analiz edilmiş ve toplamda on dokuz ilacın bir veya birden çok hücre tipine özgül olduğu, hücre büyümesini %50'den fazla engellediği ve zamana/doza bağımlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.6). WRO hücrelerine özgül olan dört ilaç (dördüncü grup), hem hücre büyümesini %50'den fazla engellemekte hem de zamana/doza bağımlı etki göstermektedir. KTC2 ve TPC1 hücrelerine özgül ilaçların (üçüncü grup) %30'dan fazlası ise zamana/doza bağımlı etki göstermemektedir.

Tablo 4.6: Özgül etkisi olan ilaçların %GI ve doza/zaman bağımlılık açısından değerlendirilmesi. Özgül olan ilaçlardan büyümeyi %50'den fazla engelleyenler ve doza/zamana bağımlı olanlar tespit edilmiştir.

	Spesifik ilaç Sayısı	%GI >50%	Zamana/ doza bağımlılık	Seçilen ilaçlar
KTC2	12	9	8	8/12 (%67)
TPC1	6	6	4	4/6 (%67)
KTC2+TPC1	8	7	3	3/8 (%38)
WRO	4	4	4	4/4 (%100)
toplam	30	26	19	19



Şekil 0.15: Epigenetik ilaçların hücre büyümesi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. (A) SRB testini takiben, elde edilen aborbans değerleri kullanılarak %GI değerleri tespit edilmiştir. Bu değerler, sitotoksite ve spesifisite analizi için kullanılmıştır. Öncelikle, tek veya her iki dozda da sitotoksik olan 12 ilaç belirlenmiş ve değerlendirmeden çıkarılmıştır. İkinci adımda, belli bir TERTp ve/veya BRAF V600E mutasyon profiline göre özgül olan toplam 30 ilaç belirlenmiştir. (B) Özgül etkisi olan ilaçlardan, büyümeyi %50 veya daha fazla engelleyenler seçilmiştir. Ardından, zamana ve doza bağımlı etki gösteren ilaçlar bir sonraki analiz için seçilmiştir. Bu bölümdeki değerlemenin özeti ayrıca Tablo 4.6’da verilmiştir.

4.2.4.2. KTC2 hücrelerine özgül olan ilaçların değerlendirilmesi

KTC2 hücrelerine özgül olan sekiz ilacın bilgileri, etkili olduğu dozlar, %GI değerleri ve zamana/doza bağımlılık analiz sonuç bilgileri Tablo 4.7’de belirtilmiştir. Bu ilaçların, hücre büyümesi üzerindeki etkileri Şekil 4.16’da gösterilmiştir. Seçilen ilaçların beş tanesi histon deasetilaz (HDAC) inhibitörüyken, iki tanesi hücre proliferasyonunda etkili Aurora kinazların inhibitörü, bir tanesi ise hücre metabolizmasında etkili olan NAD(+) bağımlı protein deasetilaz: SIRT1 aktivatörüdür. Tüm ilaç inkübasyonlarında, 72 saatte büyümenin engellenmesi üzerinde daha büyük etki gözlemlenmiştir. Belirtilen ilaçlardan iki tanesi (GSK1070916 ve Belinostat) büyümeyi %80’den fazla engellemiştir. Ayrıca bazı

ilaçların (Trikoştatın A, Belinostat ve Pracinostat) KTC2 dışındaki hücrelerde, bu dozda proliferatif etki gösterdiği (büyümeyi desteklediği) gözlemlenmiştir.

4.2.4.3. KTC2 hücrelerine özgül olan ilaçlar ile “canlanma” testinin gerçekleştirilmesi

KTC2 hücrelere özgül etkisi olduğu belirlenen sekiz ilacın etkilerinin, ilaç ortamdan kaldırılınca da devam edip etmediğini belirlemek amacıyla, hücreler 72 saatlik ilaç inkübasyonunun ardından, ilaç içeren besiyeri kuyulardan çekilip, kuyulara taze besiyeri eklenmiş ve hücreler 72 sa daha inkübatörde bekledildikten sonra, SRB testi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.17). Bu analizde de ilaç eklenmeyen plaka (plaka 1) referans plaka olarak kullanılmış, ilaç inkübasyonundan 72 sa sonra teste tabi tutulan plaka (plaka 2) ve besiyerinde 72 sa bekletilen plakadaki (plaka 3) abzorban değerleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.17). İlaç 10 (CUDC-101) ve ilaç 17 (PF-03814735) ile inkübasyon sonucunda sadece KTC2 hücrelerinde %30’dan az canlanma olmuştur (Şekil 4.17, Tablo 4.8). CUDC-101 varlığında TPC1 ve WRO hücrelerinde %50’den fazla canlanma olurken PF-03814735 varlığında bu hücrelerde %90’dan fazla canlanma gözlemlenmiştir. Diğer altı ilaç ile inkübasyon sonrasında ise, KTC2 hücrelerinde en az %50 canlanma gözlemlenmiş ve bu ilaçlar bir sonraki çalışmaya dahil edilmemiştir.

4.2.4.4. Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

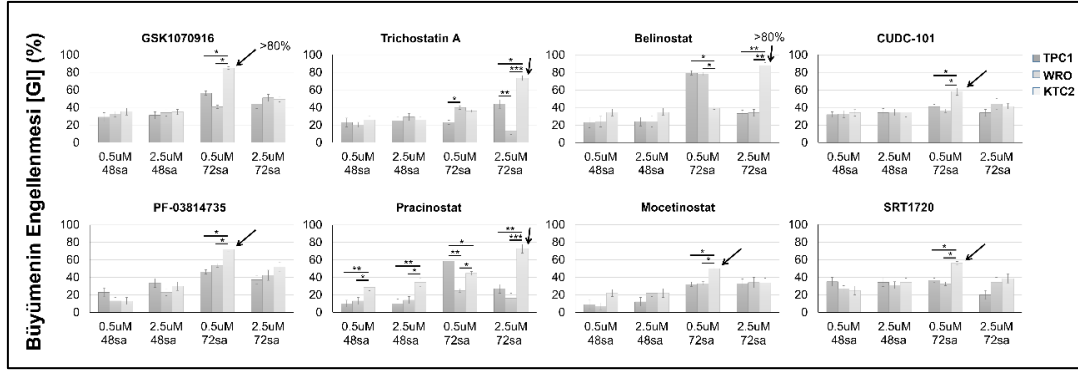
CUDC-101 ve PF-03814735’nin, 48 saatle karşılaştırıldığında, 72 saatte daha etkili olduğu gözlemlendiğinden dolayı, bu ilaçların KTC2 hücrelerinde en etkili olduğu zaman aralığını belirlemek amacıyla, WRO, TPC1 ve KTC2 hücreleri plakalara ekilmiş, 48, 72 ve 96 sa boyunca 1 µM CUDC-101 veya PF-03814735 ile inkübe edilmiştir. Ek olarak, KTC2 hücrelerinin bu ilaçlarla 72 saatlik inkübasyonundan sonra, besiyerinde 72 sa bekletilmesine rağmen canlanma gözlemlenmediği için, 72 sa ilaç inkübasyonunun ardından ikinci 72 saatlik inkübasyonun etkisi (tekrarlayan tedavi) araştırılmıştır. Tekrarlayan tedavinin (TT) KTC2 hücreleri üzerinde etkisini araştırmak için hücreler 1 µM CUDC-101 veya PF-

03814735 ile 48, 72, 96 sa ve TT ile inkübe edildikten sonra SRB testine tabi tutulmuştur (Şekil 4.18).

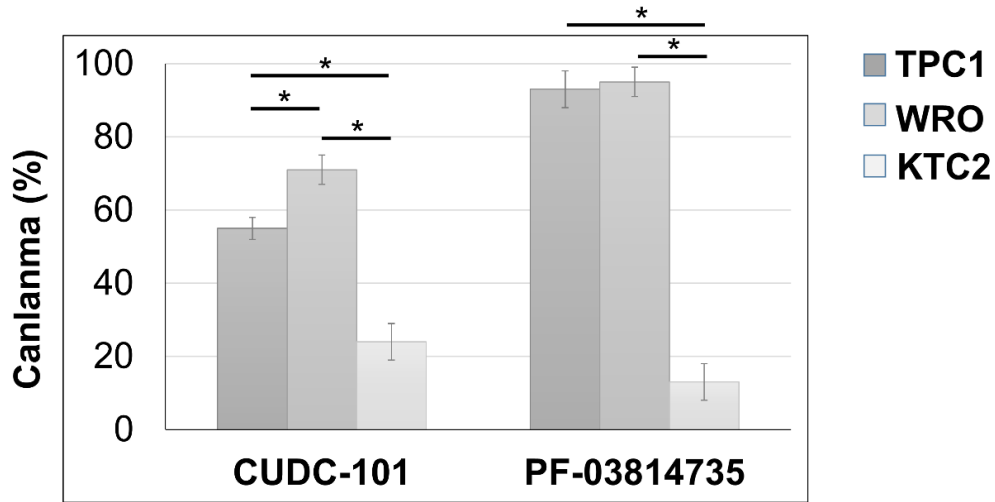
Tablo 4.7: KTC2 hücrelerinde etkili olan sekiz ilacın tüm hücrelerde %GI ve doza/zaman bağımlılık bilgileri. KTC2 hücrelerine özgül olan ilaçların orijinal isimleri, etkili olduğu optimum doz ve zamanla birlikte, %GI ve doz/zaman bağımlılık bilgileri belirtilmiştir. HDAC: histon deasetilaz; (i): inhibitör

İLAÇ BİLGİLERİ			ÖZGÜLLÜK	Doza bağımlılık (72sa)			
Sayı	İsim	Fonksiyon	En etkili doz	%GI > %50 (72sa)	Zamana bağımlılık	Doza bağımlılık (72sa)	
1	ilaç-3	GSK1070916	Aurora Kinaz (i)	0,5uM 72sa	KTC2 (%85%)	hepsi	KTC2 ve TPC1
2	ilaç-6	Trikostatin A	HDACi	5uM 72sa	KTC2 (%73)	hepsi	KTC2 ve TPC1
3	ilaç-9	Belinostat (PXD101)	HDACi	5uM 72sa	KTC2 (%88)	hepsi	hepsi
4	ilaç-10	CUDC-101	HDACi	1uM 72sa	KTC2 (%58)	hepsi	hepsi
5	ilaç-17	PF-03814735	Aurora Kinase (i)	1uM 72sa	KTC2 (%78) WRO (%54)	hepsi	hepsi
6	ilaç-22	Pracinostat	HDACi	5uM 72sa	KTC2 (%73)	hepsi	hepsi
7	ilaç-38	Mocetinostat	HDACi	5uM 72sa	KTC2 (%50)	hepsi	sadece KTC2
8	ilaç-51	SRT1720	SIRT1 aktivatörü	5uM 72sa	KTC2 (%56)	KTC2 ve WRO	KTC2 ve TPC1

CUDC-101 veya PF-03814735 ilaçlarının etkileri 48 saatle karşılaştırıldığında, 72 saatte, %GI üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.18 A, B). %GI’da görülen bu etki, 96 saatte azalmıştır. İlginç olarak, tüm hücre tiplerinde, CUDC-101 ile TT, 72 sa inkübasyondan daha etkilidir ve maksimum etkiye bu sürede ulaşmıştır. KTC2 hücrelerinde büyüme %80’den fazla engellenirken, TPC1 ve WRO hücrelerinde, büyüme %50’den biraz yüksek oranda engellenmiştir (Şekil 4.18A). CUDC-101, tüm hücre tiplerinde büyümeyi %50’den yüksek oranda engellediği için çalışmaya bu ilaçla devam edilmemiştir. PF-03814735 ile TT’nin, sadece *TERT* mutasyonu olan hücrelerde (KTC2 ve TPC1) 72 sa inkübasyondan daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. PF-03814735, KTC2 hücrelerinde, %GI, maksimum etkiye bu sürede ulaşmış ve büyümeyi %80 civarında engellemiştir (Şekil 4.18B). Bu sürede, WRO ve TPC1 hücrelerinde ise büyüme, ancak %50’den az oranda engellenebilmiştir. TPC1 hücrelerinde, PF-03814735’in %GI üzerindeki etkisi, TT’de maksimum düzeye ulaşmış ancak %50’nin üzerine çıkamamıştır.



Şekil 0.16: Seçilen sekiz ilacın hücre büyümesi üzerindeki etkisi. KTC2, TPC1 ve WRO hücreleri epigenetik ilaç kütüphanesiyle inkübe edilmiş, veri analizi sonucunda KTC2 hücrelerine özgül olarak seçilen sekiz ilacın %GI grafikleri gösterilmiştir. Her ilaç iki farklı dozda eklenmiş ve hem 48 hem de 72 sa sonunda ilaçların hücre büyümesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı değişimler bir veya birden çok yıldız ile işaretlenmiştir (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). KTC2 hücreleri üzerinde etkili olan ilaçların, etkili oldukları doz ve zaman ok işareti ile belirtilmiştir. uM: mikromolar

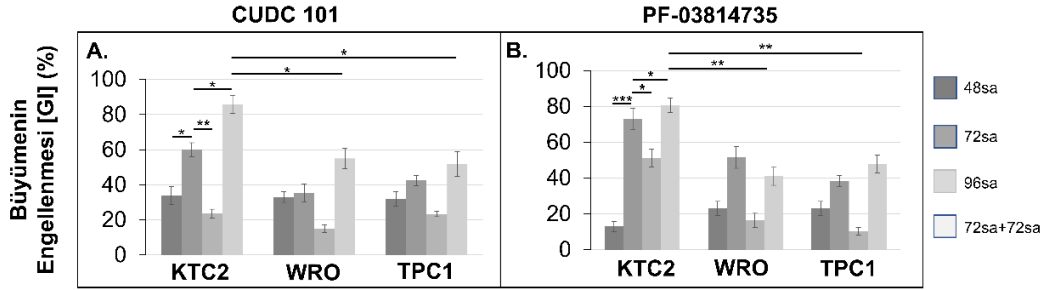


Şekil 0.17: Seçilen sekiz ilaç ile yapılan canlanma deneyi sonrası hücre büyümesinin karşılaştırılması. KTC2, TPC1 ve WRO hücreleri, Tablo 4.7'de gösterilen KTC2 hücrelerine özgül etkisi olan sekiz ilaç ile 72 sa inkübasyonun ardından, 72 sa besiyerinde bekletilmiş (72sa+72sa) ve ilaçların hücre büyümesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Besiyeri eklendikten sonraki %GI değerleri 72 sa ilaç inkübasyonu sonundaki sitotoksosite değerlerine göre normalize edilmiş, aradaki fark canlanma yüzdesi olarak belirtilmiştir. CUDC-101 (ilaç 10) ve PF-03814735 (ilaç 17) ile canlanma testi sonucunda sadece KTC2 hücrelerinde %30'dan düşük canlanma gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı değişimler bir veya birden çok yıldız ile işaretlenmiştir (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Tablo 4.8: KTC2 hücrelerine özgül etkisi olan sekiz ilaç ile elde edilen canlanma yüzdeleri. KTC2, TPC1 ve WRO hücreleri, Tablo 4.7’de gösterilen KTC2 hücrelerine özgül etkisi olan sekiz ilaç ile 72 saat inkübasyonun ardından 72 saat de besiyerinde bekletilmiş ve hücrelerin canlanma yüzdesi karşılaştırılmıştır.

		KTC2	WRO	TPC1
Canlanma (%)	ilaç # 3	72	12	51
	ilaç # 6	70	10	30
	ilaç # 9	62	25	63
	ilaç # 10	24	71	55
	ilaç # 17	13	98	93
	ilaç # 22	55	43	60
	ilaç # 38	63	51	62
	ilaç # 51	60	51	53

İlginç olarak, PF-0381735 ile TT’nin ardından, WRO hücrelerinin büyümesi desteklenmiş, büyüme %20’den düşük oranda engellenebilmiştir. Dolayısıyla, PF-03814735 ile TT, *TERTp* mutasyonu taşıyan KTC2 hücrelerine özel etkiler göstermiş, *TERTp* mutasyonu taşımayan WRO hücrelerinde az etki göstermiştir. Sonuç olarak, PF-03814735’nin özel olarak KTC2 hücrelerini hedefleyen bir inhibitör olduğu gösterilmiş ve doz analizine PF-03814735 ile devam edilmiştir.



Şekil 0.18: CUDC-101 ve PF-03814735 ile inkübe edilen hücrelerde zamana bağlı %GI’ın araştırılması. KTC2, TPC1 ve WRO hücreleri 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 1 μ M CUDC-101 veya PF-03814735 ile 48, 72, 96 sa veya TT ile inkübe edilmiştir. İlaçların hücre büyümesi üzerindeki etkisi SRB testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı değişimler bir veya birden çok yıldız ile işaretlenmiştir (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001). Her iki ilacın da KTC2 hücreleri üzerindeki etkisi tekrarlayan tedavide maksimum seviyeye ulaşmış, bu sürede %GI, CUDC-101 ve PF-03814735 için WRO hücrelerinde sırasıyla %50’nin üstünde ve %20’nin altında kaldığı için, çalışmaya PF-03814735 ile devam edilmiştir.

4.2.4.5. PF-03814735 için optimum inkübasyon dozunun belirlenmesi

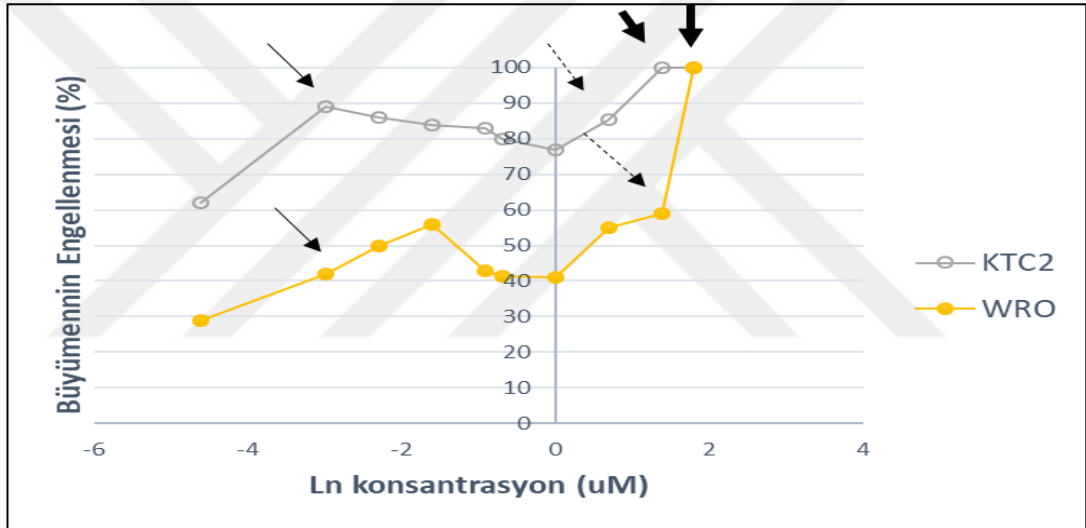
PF-03814735'in *TERTp* ve *BRAF* mutasyonu taşıyan KTC2 hücrelerinde etkili olup, *TERTp* mutasyonu taşımayan WRO hücrelerinde en az etkili olduğu dozu belirlemek amacıyla, WRO ve KTC2 hücrelerine, artan dozlarda (0,5-5 μ M) PF-03814735 ile TT uygulanmış ve hücreler SRB testine tabi tutulmuştur (Şekil 4.19). Daha önceki çalışmalarda, PF-03814735'in optimum dozu 1 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16). Burada ise hem nanomolar hem de mikromolar aralıklar kullanılarak KTC2 hücreleri için optimum olan PF-03814735 yoğunluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. KTC2 hücrelerinde %GI, 50 nM PF-03814735 ile tedavi sonucunda, maksimum değerine (%89) ulaşmıştır (Şekil 4.19). Bu doz, daha önce tespit edilen optimum dozun (1 μ M) yüzde 5'i kadar olmasına rağmen, KTC2 hücrelerinde büyümenin engellenmesinde daha etkili olmuştur. WRO hücreleri, 50 nM PF-03814735 ile inkübe edildiğinde ise, büyümenin engellenmesi %50'nin altında kalmıştır. Dolayısıyla, 50 nM PF-03814735, özgül olarak KTC2 hücrelerinde büyümeyi engellemekte, WRO hücrelerinde daha az etkili olmaktadır.

4 μ M PF-03814735 ile inkübasyonun ardından, KTC2 hücrelerinin büyümesi %100 oranında engellenmiş olmasına rağmen, bu dozda WRO hücrelerinin büyümesi de %50'den yüksek oranda engellenmiş ve WRO hücreleri için optimum değerine ulaşmıştır (Şekil 4.19). Dolayısıyla, PF-03814735, bu dozda KTC2 hücreleri için daha az özgül olmakta ve WRO hücrelerini de etkili bir şekilde hedeflemektedir. 6 μ M PF-03814735 ile tedavinin ise her iki hücre tipi için sitotoksik olduğu ve hücre büyümesinin engellenmesinin %100'e ulaştığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, KTC2 hücrelerinde etkili olan ancak WRO hücrelerinde az etkili olan PF-03814935'in optimum dozunun ve zamanının sırasıyla 50 nM ve TT olduğu gösterilmiştir.

4.2.4.6. Tüm tiroid hücre hatlarının PF-03814735 ile tedavi edilmesi

PF-03814735'in sitotoksik etkilerinin tüm C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan tiroid hücrelerinde teyit edilmesi için, sekiz adet tiroid kaynaklı hücre hattı (7/8 TK ve 1/8 ölümsüzleştirilmiş foliküler tiroid hücre hattı) 50 nM PF-03814735 ile 72 sa veya

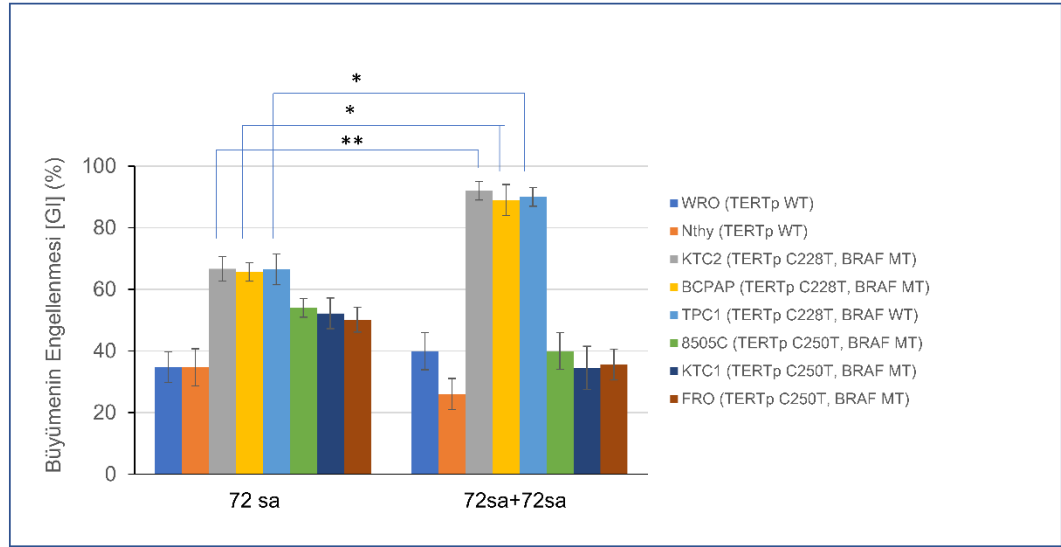
TT inkübe edilmiştir. Süre sonunda SRB testi uygulanarak PF-03814735'in hücre büyümesindeki etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 4.20). Önceki sonuçlarla uyumlu olarak, 50 nM PF-03814735, maksimum sitotoksik etkiyi C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde göstermiştir. C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde (KTC2, TPC1 ve BCPAP) TT en etkili tedavi şeklidir ve TT sonunda, üç hücre tipinde de büyümenin %80'inden fazlası engellenmiştir. Bu 3 hücre hattından 2/3'ü (KTC2 ve BCPAP) *BRAF* V600E mutasyonu taşımakta, TPC1 ise bu mutasyonu taşımamaktadır. Dolayısıyla, *BRAF* V600E mutasyonu varlığından bağımsız, 50 nM PF-03814735, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde, maksimum etkiye TT sonunda ulaşmaktadır.



Şekil 0.19: Artan dozlarda PF-03814735 ile doza bağlı %GI'nin araştırılması. KTC2 ve WRO hücreleri 96 kuyulu plakaya ekilmiş, artan dozlarda PF-03814735 ile TT uygulanmıştır. PF-03814735'in hücre büyümesi üzerindeki etkisi SRB testi ile değerlendirilmiştir. İlaç konsantrasyonu ve %GI arasında doğrusal olmayan (sigmoid) ilişki olmasından dolayı, ilaç konsantrasyonlarının doğal logaritması (ln) alınmış ve konsantrasyonların doğrusal hale getirilmiş değerleri grafiğin yatay eksenine yerleştirilmiştir. 50 nM PF-03814735 (düz oklar) KTC2 hücrelerinde etkili olan; ancak WRO hücrelerinde az etkili olmuştur. 4 µM PF-03814735 ile inkübasyon (kesikli oklar) sonucunda, KTC2 ve WRO hücrelerinin büyümesi sırasıyla, %100 ve %59 oranında engellenmiştir. 6 µM PF-03814735 ile tedavi sonucunda (kalın oklar), ilaç her iki hücre tipi için de sitotoksik hale gelmekte ve büyümeyi %100 oranında engellemektedir.

Beklenmedik bir şekilde, C250T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde (8505C, KTC1, FRO), 72 saatte büyümenin %60'a yakını engellenmiş ve TT sonunda bu oran daha da azalmıştır. Dolayısıyla, PF-03814735, C250T *TERTp* mutasyonu olan hücrelerde çok daha az etkilidir ve bu etki TT ile azalmaktadır. Ek olarak, TT, C250T

TERTp mutasyonu taşıyan veya *TERTp*'unda mutasyon taşımayan (WRO) TK hücrelerinin büyümesini benzer oranda (>30%) engellemiştir. Dolayısıyla, TT, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde etkili bir tedavi yöntemi iken, C250T *TERTp* mutasyonu taşıyanlarda yeterince etkili değildir. TT'den en az etkilenen hücre tipi ise ölümsüzleştirilmiş (immortalize) normal tiroid hücrelerinden oluşan Nthyori3.1 hücre hattıdır.



Şekil 0.20: Tüm tiroid hücrelerinin 50 nM PF-03814735 ile 72 sa ve TT (72sa+72sa) ile inkübasyonu. Sekiz farklı tiroid hücresi hattı (7/8 TK, 1/8 ölümsüzleştirilmiş tiroid kaynaklı hücre hattı) 96 kuyulu plakaya ekilmiş, 50 nM PF-03814735 ile 72 sa ve TT ile inkübasyonun ardından, PF-03814735'in hücre büyümesi üzerindeki etkisi SRB testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı değişimler bir veya birden çok yıldız ile işaretlenmiştir (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). *BRAF* mutasyonu taşıyıp taşımadığından bağımsız olarak, PF-03814735, %GI üzerindeki en kritik etki, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde, TT sonunda görülmektedir. C250T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde ise, 72 sa inkübasyonun ardından, hücre büyümesi %60 civarında engellenmekte, TT sonunda ise, ilacın hücre büyümesi üzerindeki etkisi azalmaktadır.

4.2.4.7. PF-03814735 ile tedavi sonrasında *hTERT* ifade (mRNA) seviyelerinin belirlenmesi

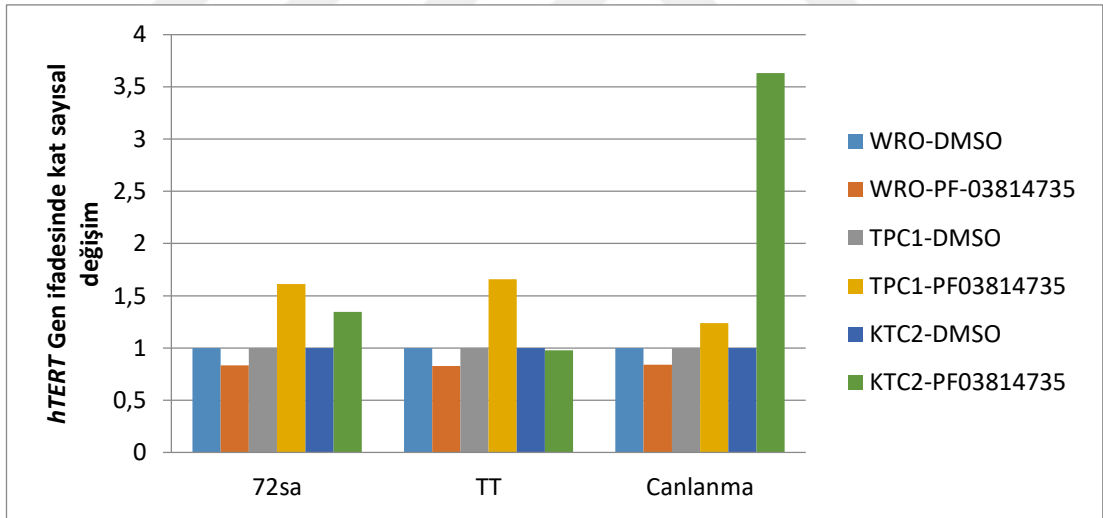
PF-03814735 ile belirlenen optimum tedavi süresi sonucunda, *hTERT* mRNA seviyesinde değişim olup olmadığını belirlemek amacıyla, WRO, TPC1 ve KTC2 hücreleri 24 kuyulu üç plakaya ekilmiş, 24 saatin ardından plakalara PF-03814735 eklenmiş ve plakalar 37°C inkübatöründe bekletilmiştir. 72 saatin sonunda, ilk plakadaki hücrelerden hücre peleti elde edilmiştir. İkinci ve üçüncü plakalara ise

sırasıyla, TT ve canlanma testleri uygulanmıştır. Sürenin sonunda ikinci ve üçüncü plakalardaki hücrelerden de hücre peleti elde edilmiştir. Elde edilen peletlerden total RNA izole edilmiş, cDNA sentezi ve RT-qPZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

RT-qPZR çalışması sonucunda elde edilen Ct değerlerine göre “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ” formülü kullanılarak, *hTERT* geninin ifadesi deneysel (PF-03814735) ve kontrol (DMSO) grubunda *GAPDH* gen ifadesi ile karşılaştırılmış, deneysel grup kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve deneysel gruptaki *hTERT* gen ifadesindeki katsayısal değişim değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.9). WRO hücrelerinde her üç uygulamada da *hTERT* gen ifadesi 0,8 kat azalmıştır (Şekil 4.21). TPC1 hücrelerinde ise her iki ilaç uygulamasında da *hTERT* mRNA kontrol grubun göre 1,6 kat artarken, canlanma testi sonucunda 1,24 kat artış belirlenmiştir. Bu iki hücre hattının aksine, her uygulamada, KTC2 hücrelerinin mRNA seviyesinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. 72 saatlik PF-03814735 tedavisinin ardından, TPC1 hücrelerindeki benzer biçimde *hTERT* mRNA 1,3 kat artmıştır. Optimum tedavi süresi olan TT'nin ardından, kontrol grubu (PF-03814735) ve deneysel grup (DMSO) arasında fark tespit edilememiştir. Dolayısıyla, TT sonucunda, *hTERT* gen ifadesi sabit kalırken hücrelerin büyümesi %90 engellenmektedir. PF-03814735, 72 sa tedavinin ardından hücrelerin canlanmasına engel olurken, *hTERT* gen ifadesinde yaklaşık dört kat artışa neden olmuştur. Bu durum hücrelerin tekrar çoğalmaya başlamak için hazırlık yaptığı anlamına gelebilir.

Tablo 4.9: PF-03814735 ile tedavi sonucunda *hTERT* gen ifadesindeki kat sayısal değişim değerleri. WRO, TPC1 ve KTC2 hücreleri 24 kuyulu 3 plakaya triplike olarak ekilmiş, 24 saatin ardından PF-03814735/DMSO ile gösterilen uygulamalar yapılmıştır. Sürenin sonunda, hücre peletlerinden RNA izole edilmiş ve RT-qPZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. *GAPDH* ve *hTERT* genleri için belirlenen ortalama Ct değerleri gösterilmektedir. Gen ifadesindeki kat sayısal değişimi belirlemek için öncelikle deneysel (PF-03814735) ve kontrol (DMSO) grubunda *hTERT* ve *GAPDH* genleri için tespit edilen Ct değerleri arasındaki fark (sırasıyla Δ CTD, Δ CTK) belirlenmiştir. Ardından, bu değerler arasındaki fark ($\Delta\Delta$ Ct) tespit edilmiş ve “ $2^{-\Delta\Delta$ Ct” değerleri hesaplanmıştır.

UYGULAMA	HÜCRELER	PF-03814735 Δ CTD		DMSO Δ CTK		<i>hTERT</i> gen İfadesindeki Kat Sayısal Değişim
		<i>GAPDH</i> ort. Ct	<i>hTERT</i> ort Ct.	<i>GAPDH</i> ort Ct.	<i>hTERT</i> ort. Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct
72sa Tedavi	WRO	22,12	31,36	24,46	33,44	0,84
	TPC1	23,99	33,44	22,55	32,69	1,61
	KTC2	22,91	33,06	23,00	33,58	1,35
Tekrarlayan Tedavi (TT)	WRO	22,90	32,72	23,11	32,66	0,83
	TPC1	24,83	34,17	24,67	34,74	1,66
	KTC2	24,92	35,43	22,93	33,41	0,98
Canlanma	WRO	21,82	33,23	22,21	33,37	0,84
	TPC1	21,52	31,93	22,13	32,85	1,24
	KTC2	23,7	32,64	21,53	32,33	3,63



Şekil 0.21: PF-03814735 ile tedavi sonrasında *hTERT* gen ifadesindeki kat sayısal değişim değerleri. WRO, TPC1 ve KTC2 hücreleri 24 kuyulu 3 plakaya triplike olarak ekilmiş, 24 saatin ardından, birinci plakaya PF-03814735/ DMSO çözeltisi eklenerek plaka inkübatörde 72 sa bekletilmiştir. Süre sonunda, birinci plakadaki hücrelerden pelet eldilmiş. İkinci ve üçüncü plakalara sırasıyla TT ve canlanma testi uygulanmıştır. Sürenin sonunda (72sa+72sa), bu iki plakadan hücre peleti elde edilmiştir. Hücre peletlerinden RNA izole edilmiş ve RT-qPZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Belirlenen ortalama Ct değerleri kullanılarak deneysel (PF-03814735) grupta *TERT* gen ifadesindeki kat sayısal değişim değerleri, kontrol grubuna (DMSO) göre normalize edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

Bu çalışmada, toplam sekiz adet tiroid (7/8 tiroid kanseri ve 1/8 immortalize edilmiş normal tiroid hücreleri), on üç adet HK, on bir adet GBM, dokuz adet melanom ve ondört adet MK hücre hattı elde edilmiştir (Tablo 4.1).

5.1.1. Tiroid, HK, GBM ve melanom orijinli hücrelerde *TERTp* mutasyon profilinin araştırılması

5.1.1.1. Tiroid orijinli hücre hatları

Kullanılan tiroid kanseri hücre hatlarından 3/6'sı papiler (PTK), 1/6'sı foliküler (FTK), kalan 3/6'sı ise daha agresif form olan anaplastik (ATK) kaynaklıdır. Ayrıca, ölümsüzleştirilmiş normal tiroid hücrelerinden oluşturulmuş Nthyori3.1 hücreleri de çalışmaya dahil edilmiştir. İlk *TERTp* mutasyon analizi sonucunda, C228T veya C250T mutasyon varlığı araştırılmış, 3/8 hücre hattının (TPC1, KTC2 and BCPAP) C228T, 3/8 hücre hattının (KTC1/8505C/FRO) ise daha az görülen C250T *TERTp* mutasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.3B ve Tablo 4.3). FRO hücrelerinin C250T mutasyonu taşıdığı ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir. TPC1 hücrelerinin mutasyon profili literatürdeki iki raporla uyumludur (24, 70). KTC2, BCPAP, KTC1 ve 8505C hücrelerinin *TERTp* mutasyon profili de Landa ve ark.'nın çalışmasıyla örtüşmektedir (24). Ayrıca, Liu ve ark.'nın raporunda da, BCPAP hücreleri için CC228-229TT mutasyonunu saptanmıştır (70). Bu çalışmada WRO ve Nthyori3.1 hücrelerinde *TERTp* mutasyonları tespit edilmemiştir. Liu ve ark. da WRO hücrelerinde *TERTp*'da mutasyonu belirlememişlerdir (70).

Pek çok çalışmada, *TERTp* mutasyonlarının C228T veya C250T noktalarında görüldüğü gösterilmesine rağmen (232), farklı araştırmalar, proksimal promotörün başka bölgelerinde de *TERTp* mutasyonları görüldüğünü tespit etmiştir (14, 16, 29, 74,

212, 233, 234). Melanomlarda, *TERTp*'da farklı noktalarda, tek nokta mutasyonları ve çift zincir kırıklarına sıklıkla rastlanmaktadır (14, 16, 29, 233). Ek olarak, daha az görülen *TERTp* mutasyonları MK'de de tespit edilmiştir (74, 212, 234). C228T veya C250T *TERTp* mutasyonu tespit edilemeyen WRO ve Nthyori3.1 hücrelerinde sık görülmeyen *TERTp* mutasyonları tespit etmek amacıyla, tam boy *TERTp*'u, üst üste binen iki PZR amplikonu ile çoğaltılmış (Şekil 4.2A), öncelikle proksimal promotör (Şekil 4.3B) daha sonra da distal promotör (Şekil 4.5) dizilenmiştir. Beklenmedik bir şekilde, iki hücre hattında da herhangi bir *TERTp* mutasyonu tespit edilmemiştir (Tablo 4.3). WRO ve Nthyori3.1 hücrelerinin tam boy *TERT* sekansında da hiçbir mutasyon olmadığı ilk defa ortaya konmuştur. Tiroid kanseri hasta örnekleriyle yapılan güncel araştırmalara göre, *TERTp* mutasyonları daha çok agresif olan (ATK veya AFTK) kanserlerde tespit edilmektedir (232). Dolayısıyla, WRO (FTK) ve Nthyori3.1 (ölümsüzleştirilmiş normal tiroid hücreleri) gibi daha az agresif, daha çok farklılaşmış hücrelere sahip hücre hatlarında *TERTp* mutasyonu tespit edilmemesi çok da şaşırtıcı değildir.

5.1.1.2. HK orijinli hücre hatları

HK hücre hatlarından altı tanesinin *TERTp* mutasyon profili literatürden belirlenmiş (26), altı hücre hattının *TERTp* mutasyon profili ise PZR ve Sanger sekanslama ile çalışmamızda belirlenmiştir. SNU 398, Huh7, SNU475 ve SNU387 hücrelerinde C228T *TERTp* mutasyonu tespit edilirken, SNU 449 ve SNU 182 hücrelerinde C228T veya C250T nokta mutasyonları belirlenmemiştir (Tablo 4.3). Bu sonuçlar, Nault ve ark.'nın çalışmasıyla uyumludur (26). SNU 449 ve SNU 182 hücrelerinde ayrıca, sık görülmeyen *TERTp* mutasyonları tespit etmek amacıyla, tam boy *TERTp*'u, üst üste binen iki PZR amplikonu ile çoğaltılmış, öncelikle proksimal promotör (Şekil 4.3A) daha sonra da distal promotör (Şekil 4.5) dizilenmiştir. Sonuç olarak, bu hücrelerde tam boy *TERTp* sekansında hiçbir mutasyon olmadığı ilk defa gösterilmiştir.

5.1.1.3. GBM orijinli hücre hatları

Elde edilen GBM hücre hattından 5/11 tanesinin *TERTp* mutasyon profili literatürden tespit edilmiştir (17, 24, 25). Açılıp büyütülen 6/11 hücre hattından iki tanesinin (A172 ve U87MG) *TERTp* mutasyon durumu literatürde bulunan bilgiyle doğrulanmış (17, 24, 25), diğer 4 hücre hattının (LN18, LN229, M059J ve Hs683) *TERTp* mutasyon profili ilk defa çalışmamızda saptanmıştır. LN229 ve M059J hücrelerinde C228T, Hs683 hücrelerinde C250T *TERTp* mutasyonu gösterilmiştir. (Tablo 4.3). LN18 hücrelerinde, C228T veya C250T nokta mutasyonları bulunmamıştır. LN-18 hücrelerinde, sık görülmeyen *TERTp* mutasyonları tespit etmek amacıyla, tam boy *TERTp*'u, üst üste binen iki PZR amplikonu ile çoğaltılmış, öncelikle proksimal promotör (Şekil 4.3B) daha sonra da distal promotör (Şekil 4.5) dizilenmiştir. Bu hücrelerde tam boy *TERTp* sekansında hiçbir mutasyon olmadığı ilk defa gösterilmiştir.

5.1.1.4. Melanom hücrelerinin *TERTp* mutasyon profilinin araştırılması

Açılıp büyütülen 3/4 melanom hücre hattının (A2058, MEWO ve SK-MEL-28) *TERTp* mutasyon profili de ilk defa çalışmamızda belirlenmiştir. A2058, MEWO, SK-MEL-28 hücrelerinde sırasıyla, C228T, C250T ve G239T *TERTp* mutasyonları tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Huang ve ark., raporlarında G361 hücrelerinde *TERTp* mutasyonu tespit edilmediği belirtilmiştir (17). Ancak yazarlar çalışmalarında sadece C228T ve C250T mutasyon varlığını araştırmışlardır. Oysa bu çalışmada, Sanger dizileme ile bu iki nokta mutasyonu etrafında olan tüm mutasyonlar araştırılmış (Şekil 4.3C, Tablo 4.3) ve G361 hücrelerinde CC262/263TT mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyon, melanomlarda sık görülen ultraviyole (UV) ışını ile indüklenmiş DNA hasarını (pirimidin dimeri) çağrıştırmaktadır. Tiroid, HK ve GBM hücrelerinin aksine, melanom hücreleri arasında *TERTp* mutasyonuna sahip olmayan (*TERTp* WT) bir hücre hattı belirlenmemiştir. Deri orijinli melanom hücrelerinin çoğunda, UV ışını ile maruziyet olduğu için, bu hücrelerde *TERTp* WT genotipe sahip hücre hattı bulma olasılığı oldukça düşüktür.

Sonuç olarak, üç tiroid (WRO, FRO, Nthyori), iki HK (SNU 182/SNU 449), dört GBM (LN18, LN229, M059J ve Hs683) ve dört melanom (MeWO, SK-Mel-28, A2058 ve G361) olmak üzere toplam on üç hücre hattının *TERTp* mutasyon profili ilk defa bu tez kapsamında belirlenmiştir.

5.1.2. Tam boy *TERTp* sekansı elde edilen hücrelerde tek nükleotit polimorfizmlerinin (SNP) araştırılması

Tam boy *TERTp* sekansı elde edilen hücrelerde, nükleotit değişimleri tespit edilmiş, bu değişimlerin SNP veritabanına (235) eklenen polimorfizmlerden olup olmadığı araştırılmıştır. HK (SNU 182, SNU449), tiroid (WRO, Nthyori3.1) ve GBM (LN18) hücrelerinin distal promotöründe, ortak bir SNP (rs7712562) tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Bu polimorfizm, TBB'den 1072 nükleotit uzakta yer almaktadır (1072CC). Transkripsiyon faktörlerinin (TF) bağlanma bölgelerini araştıran sanal bir laboratuvar olan PROMO'da (236), bu SNP olan ve olmayan *TERTp* dizileri karşılaştırılmış ve polimorfizm taşıyanlarda, yeni T-antigen (T-Ag), Cremtau1/2 (cAMP responsive factor element modülatör-tau) ve Myogenin TF bağlanma bölgeleri olduğu tahmin edilmiştir. Ayrıca, RC2, Zic3, Myb2 (Myb proto-onkogen 2) ve C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) alfa/beta TF bağlanma bölgelerinin kaybolduğu da öne sürülmüştür. Protoonkogen olan Myb proteinlerin aktivitelerinin programlı hücre ölümüne engel olduğu ve hücre büyümesini indüklediği farklı tümör modellerinde gösterilmiştir (237-240). C/EBP proteinlerinin de B-hücreli akut lenfositik lösemi (B-ALL) ve prostat kanserlerinde, hücre ve tümör büyümesini arttırdığı gösterilmiştir (241, 242). *TERTp* mutasyonu taşımayan bu hücre tiplerinde, bu polimorfizm ile Myb2 ve C/EBP TF bağlanma bölgelerinin kaybolmasının hücrelere daha az büyüme avantajı sağladığı ve daha yavaş büyümelerine sebep olduğu düşünülebilir.

WRO (tiroid) ve LN18 (GBM) hücrelerinde iki ek SNP (rs3215401, rs2853669) tespit edilmiştir. "rs3215401" kodlu SNP, rs7712562 gibi distal promotörde, TBB'den 1256-1260 baz çifti uzakta yer almakta ve C nükleotit insersiyonu içermektedir. PROMO'da, bu SNP olan ve olmayan *TERTp* dizileri karşılaştırılmış ve polimorfizm

taşıyanlarda, yeni nöroendokrin farklılaşma faktöre (IA-1) bağlanma bölgesinin oluştuğu, bunun yanında nükleer faktör ETF (TEA bölgesi transkripsiyon faktör 2) ve SP-1 (SP-1 transkripsiyon faktörü) bağlanma bölgelerinin kaybolduğu gösterilmiştir. ETF ve Sp-1 transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgelerinin artışı, hepatositlerde MAPK sinyal iletim yolağının aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (243). Dolayısıyla, *TERTp* mutasyonu taşımayan bu iki hücre tipinde, bu polimorfizmin, benzer şekilde MAPK aktivitesini azalttığı ve hücrelerin daha yavaş büyümelerine sebep olduğu düşünülebilir.

“rs2853669” kodlu SNP’in ise küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinde *TERTp*’unda ETS2 TF bağlanma bölgesinin parçalandığı gösterilmiştir (244). Bu polimorfizmin, göğüs kanseri hücrelerinde ETS2 TF bağlanmasına ek olarak protoonkogen olan myc TF bağlanmasına da engel olduğu ve *TERT* mRNA ifadesini azalttığı gösterilmiştir (115). İki ayrı çalışmada, tiroid hücrelerinin büyümesinde bu polimorfizmin bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (132, 133). Speigl-Kreinecker ve ark.’nın bulgularına göre, mutasyon taşımayan *TERTp*’a sahip GBM hücrelerinde (SNP görülen tüm hücrelerde gözleendiği gibi), varyant alelin varlığı, telomeraz aktivitesini azaltmış, telomer uzunluğunu ve büyüme hızını artırmıştır (245). Bu durumun tersine, daha agresif olan telomeraz pozitif olan hücrelerde, daha yüksek telomeraz aktivitesine, daha kısa ve düzenli telomerlere rastlanmıştır (246). Bu polimorfizmi taşıyan hücreler çok agresif hücreler olmadıkları ve telomeraz aktivitesini arttıran *TERTp* mutasyonu taşımadıkları için, bu polimorfizmin telomeraz aktivitesini daha da azaltmasını ve hücre büyümesini yavaşlatmasını sağlamış olması akla yatkındır.

5.1.3. Tiroid hücrelerinde ikincil *BRAF* mutasyonlarının araştırılması

Güncel yayınlarda, az farklılaşmış AFTK ve ATK gibi agresif tiroid kanseri hücrelerinde, *TERTp* ve *BRAF* V600E mutasyonlarının birlikte gözleendiği rapor edilmiştir (31-35, 247-254). Dolayısıyla, kullanılan tiroid kanseri hücrelerinin *BRAF* mutasyon profili literatürden araştırılmış ve epigenetik ilaç kütüphanesi olan taramada hem *BRAF* mutasyonu olan hem de olmayan hücreler kullanılmıştır. Literatürde WRO

ve FRO hücrelerinin *BRAF* V600E mutasyon durumu hakkında çelişkili ifadelerle rastlanmıştır (218, 223-226, 244). Bu yüzden, FRO ve WRO hücrelerinin *BRAF* V600E ve *KRAS* kodon 12/13 mutasyonuna sahip olup olmadığı araştırılmış ve anaplastik FRO hücrelerinin *BRAF* V600E mutasyonu taşıdığı, foliküler WRO hücrelerinin ise bu mutasyona sahip olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.13). Ayrıca, bu hücrelerin ikisinin de *KRAS* mutasyonu taşımadığı gösterilmiştir (Şekil 4.14). Papiller (35, 255, 256) ve foliküler (257, 258) tiroid kanserlerinin çoğunda, sırasıyla *BRAF* ve *RAS* genlerinde aktive eden mutasyonlar tespit edilmiştir. WRO hücrelerinin ne *BRAF* V600E ne de *KRAS* mutasyonuna sahip olmaması ilginçtir. Güncel bir çalışmaya göre, FTK'lerde, RAS mutasyonları en çok *NRAS* ve *HRAS* genlerinde (kodon 61) görülmektedir (36, 257, 258). Song ve ark., çalışmalarında, FTK tümörlerinde, *N/H/KRAS* genlerine ait kodon 12/13'de mutasyona rastlanmamıştır. Dolayısıyla, WRO hücrelerinde de *NRAS* veya *HRAS* kodon 61 mutasyonunun varlığı olasıdır.

5.1.4. Tiroid hücrelerinin epigenetik ilaç kütüphanesi ile taranması

Büyütülen tiroid hücreleri arasında, *TERTp* mutasyonu ile *RET*/translokasyonu taşıyan ama *BRAF* V600E mutasyonu taşımayan tek hücre hattı TPC1 hücreleridir (Tablo 4.5). Hücrelerin çoğunda (5/8) hem *TERTp* hem de *BRAF* V600E mutasyonu bulunmaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada, çift mutant (*TERTp* ve *BRAF*) olan KTC2 hücrelerinde etkili olan ve *TERTp* mutasyonu taşımayan (WT) hücrelerde az etkili olan epigenetik ilaçlar araştırılmıştır. İlk tarama çalışmasında, i. mutant *TERTp* (TPC1), ii. mutasyonu taşımayan *TERTp* (WRO) ve iii. mutant *TERTp* ve *BRAF*(KTC2) 51 ilaç içeren epigenetik ilaç kütüphanesi ile taranmış ve KTC2 hücrelerine özgül etki gösteren 8 ilaç belirlenmiştir (Tablo 4.7, Şekil 4.16).

KTC2 hücrelerinde özgül etki gösteren ilaçların çoğu (5/8) epigenetik değişiklikleri kontrol eden histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin inhibitörü, 2/8'i hücre büyümesinde etkili olan Aurora kinaz enzimlerinin inhibitörü ve 1/8'i hücre metabolizmasını kontrol eden NAD⁺ bağımlı protein deasetilaz (SIRT1) enziminin aktivatörüdür. Seçilen ilaçların hücre büyümesi üzerindeki etkisi, 72 saatte (48 saatle karşılaştırıldığında) daha fazladır. Epigenetik değişiklikler, kendisini zaman içinde

gösterdiği için (259) bu sonuç oldukça akla yatkındır. Bazı ilaçlar, daha yüksek olan dozda etkiliyken, bazıları daha düşük dozda KTC2 hücrelerinde kritik etki göstermiştir. Epigenetik ilaçlar, hem büyüme destekleyici (growth promoter) hem de tümör baskılayıcı (tumor supressor) genlerin ifadesini etkilediği için (259) bazıları yüksek dozlarda tümör baskılayıcı genlerin ifadesine engel olarak büyüme destekleyici etkilerinin olması kuvvetle muhtemeldir.

5.1.5. Optimum ilaç doz ve zamanın belirlenmesi

KTC2 hücrelerinde özgül etki gösteren ve bu etkiyi, ilaç içeren ortam taze besiyeri ile değiştirildiğinde kaybetmeyen iki ilaç tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Bu iki ilacın zamana bağlı etkisi araştırılmış, her iki ilacın da tekrarlayan tedavide büyüme maksimum düzeyde engellediği ve bu etkinin 96 saatte azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.18). 96 saatte azalan ilaç etkisinin ilaç inaktivasyonuna bağlı olduğu tahmin edilmektedir. CUDC-101 ile tekrarlayan tedavi sonucunda hem KTC2 hem de WRO hücrelerinin büyümesi %50'den fazla engellenmiştir. Bu nedenle bu ilaç çalışmadan çıkarılmış, sadece PF-03814735'in optimum inkübasyon dozu belirlenmiştir.

5.1.6. Tüm folliküler orijinli tiroid hücre hatlarının PF-03514735 ile inkübasyonu

Bazı güncel çalışmalarda, çift mutasyon (*TERTp* ve *BRAF V600E*) taşıyan tiroid tümörlerinde tümörün agresifliğinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (31-36, 247-254). Başka araştırmalarda ise, sadece *TERTp* mutasyonunun varlığının hastalığın nüksünü ve uzak metastaza olasılığını arttırdığı belirlenmiştir (129-133).

PF-03814735 ile optimum inkübasyon dozu ve zamanı belirlendikten sonra, foliküler orijinli tüm tiroid hücreler, PF-03814735 ile hem 72sa hem de iki kez ilaç verildiğinde (TT) inkübe edilmiştir. Sonuç olarak, PF-3814735'in hücre büyümesi üzerindeki etkisinin *BRAF* mutasyonu varlığından bağımsız olduğu ancak *TERTp* mutasyonunun varlığı ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20). Bu bulgu,

tiroid tümörü agresifliğini sadece *TERTp* mutasyonunun varlığıyla ilişkilendiren çalışmalarla uyumludur (129-133).

Her iki zaman diliminde de PF-03814735'in, C250T *TERTp* mutasyon taşıyan hücrelere kıyasla, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde daha etkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.20). Bu bulgu, C228T (14, 17, 27, 28) ve C250T (69) *TERTp* mutasyonlarının farklı mekanizmalarını olduğunu gösteren çalışmalarla ve C250T mutasyonlarının tiroid kanserlerinde daha az saptandığını belirten raporlarla (24, 30-33, 35, 36, 128) uyumludur.

PF-03814735, C250T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde, hücre büyümesi üzerinde maksimum etkiye 72 saatte ulaşmış ve bu etki TT ile azalmıştır (Şekil 4.20). Bu bulgu, C250T *TERTp* mutasyonunun, hücrelerin ilaca olan direncini arttırdığını ve ilacın sitotoksik etkilerinden hücreleri koruduğu görüşünü desteklemektedir.

TT sonucunda, WRO hücrelerin büyümesi daha çok engellenmiştir (TT: %40; 72sa: %32). Bu durumun tersine, immortalize edilmiş Nthyori3.1 hücrelerinin büyümesi tekrarlayan tedaviden sonra azalmıştır (Şekil 4.20). Bu bulgu, normal tiroid hücrelerinin PF-03814735'in tekrarlayan tedavi sonucu oluşan sitotoksik etkilerine daha dirençli olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, optimum doz ve zamanda uygulanan PF-03814735 tedavisinin, kanser hücrelerine sitotoksik etki yaratıp, normal hücrelere az zarar vereceği tahmin edilmektedir.

PF-03814735'in, farklı hücre tiplerinde, hücrede gerçekleşen epigenetik olayları modifiye ettiği ve hücre büyümesine engel olan Aurora Kinaz A/B inhibitörü olduğu gösterilmiştir (260). Jani ve ark., meme kanseri hücrelerinin PF-03814735 ile inkübasyonu sonucunda, histon H3 proteini fosforilasyonun ve sitokinezin engellendiğini, programlı hücre ölümünün (apoptoz) ise indüklendiğini göstermişlerdir. Bu çalışmadaki bulgulardan yola çıkarak, *BRAF* V600E mutasyon durumundan bağımsız olarak, PF-03814735'in, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan tiroid tümörlerinde de etkili olması ve hücre büyümesini engelleyeceği tahmin edilmektedir.

5.1.7. PF-03814735 ile tedavi sonrasında *hTERT* gen ifadesindeki değişimin araştırılması

Farklı çalışmalarda *TERTp* mutasyonlarının, *hTERT* ifade seviyesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (14, 16, 17, 248). Dolayısıyla, KTC2 hücrelerine özgül olan PF-03814735 ile tedavi sonrasında hücrelerdeki *hTERT* gen ifadesinin azalacağı hipotez edilmiştir. Ancak, beklenilenin tersine, PF-03814735'in az etkili olduğu *TERTp*'da mutasyon taşımayan WRO hücrelerinde hem ilaç tedavilerinde hem de canlanma deneyinde *hTERT* ifade seviyesinin yaklaşık 0,8 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, PF-03814735'in WRO hücrelerinde az etkili olduğu bulgusunu destekler niteliktedir.

C228T *TERTp* mutasyonuna sahip TPC1 ve KTC2 hücrelerinde ise, PF-03814735 ile tedavi sonucunda, *hTERT* ifade seviyesinin arttığı ya da sabit kaldığı ortaya konmuştur (Şekil 4.21). KTC2 hücrelerinde, daha az etkili olan 72 sa tedavinin ardından *hTERT* mRNA 1,3 kat artarken, TT sonucunda *hTERT* ifade seviyesinin sabit kaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, TT sonunda, hücrelerin büyümesinin yaklaşık %90 engellenmesi (Şekil 4.21) bulgusunu da desteklemektedir. Ek olarak, canlanma deneyi sonucunda KTC2 hücrelerinde *hTERT* ifade seviyesinde 4 kat artış olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu da hücrelerin tekrar büyümeye başlamak için hazırlık yaptığının ve büyümenin engellenmesinin sona erdiğinin göstergesi olacak niteliktedir.

KTC2 hücrelerinin aksine, TPC1 hücrelerinde hem 72 saatlik hem de TT sonucunda *hTERT* ifade seviyesi yaklaşık 1,6 kat artmıştır. Canlanma deneyinde ise *hTERT* ifade seviyesi sadece 1,24 kat artmıştır. Dolayısıyla, *hTERT* gen ifade seviyesi açısından bu hücrelerin tedaviye daha dirençli olduğu, TPC1 hücrelerinde *BRAF* mutasyonu yerine bulunan *RET/PTC* translokasyonunun *hTERT* ifade seviyesini yüksek tutmada etkili olduğu tahmin edilmektedir.

PF-03814735 ile tedavi sonrasında büyümenin engellenmesinde *BRAF* mutasyon varlığının etkili olmadığı ortaya koyulmasına rağmen (Şekil 4.20) aynı durum *hTERT*

ifade seviyesi için geçerli değildir. PF-03814735 ile inkübasyon sonucunda, sadece *TERTp* C228T ve *BRAF* mutasyonu taşıyan KTC2 hücrelerinde hem büyüme %90 engellenmiş hem de *hTERT* ifade seviyesi sabit kalmıştır. Bu durumun aksine, *BRAF* mutasyonu taşımayan TPC1 hücrelerinde hücre büyümesi aynı oranda (%90) engellenmesine rağmen, *hTERT* ifade seviyesi artmaya devam etmiştir. Bu bulgular ışığında, uzun süreli PF-03814735 tedavisinin hem *TERTp* C228T hem de *BRAF* V600E mutasyonu taşıyan hücrelerde daha etkili olacağı tahmin edilmektedir.

5.1.8. Çalışma sırasında karşılaşılan problemler

5.1.8.1. PZR sırasında karşılaşılan problemler

GBM hücrelerinde *TERTp* mutasyon belirleme çalışmaları sırasında, PZR1'de problem yaşanmış, tekil ve net olan PZR1 bantları elde edilememiştir. Bu sorunu çözmek için, öncelikle farklı bir enzim kiti (Pfusion High Fidelity DNA polimeraz) kullanılmış ancak enzim tampon çözeltisinde bulunan yeşil boyanın sekans sonuçlarını etkilemesi nedeniyle bu enzim daha sonra kullanılamamıştır. PZR1 için kullanılan enzim kitinde (GoTaq DNA polimeraz) kullanılan her malzemenin alternatif tüpü kullanılmış ve sorunun ters primerde olduğu, farklı bir ters primer kullanıldığında sorunun kaybolduğu gösterilmiştir (Şekil 4.4A). Bu hücreler için, ayrı bir primer seti kullanılarak, farklı bir amplikon (PZR3) sentezlenmiş ve dizileme sorunsuzca gerçekleştirilmiştir.

5.1.8.2. Hücrelerin *M.spp* ile enfekte olması

Epigenetik ilaç kütüphanesi ile ilaç inkübasyonu öncesinde, foliküler orijinli tiroid hücrelerinin plakaya ekim yoğunluğu araştırılmıştır (Şekil 4.9). Ancak, hücrelerinin büyük bir kısmında (5/8) PZR yöntemi ile *M.spp* enfeksiyonu tespit edilmiş ve enfekte olan hücreler üç hafta boyunca değişimli kullanılan antibiyotik ile tedavi edilmiştir. Tedaviden sonra iki hafta daha hücreler kültürde büyütülüp *M.spp* testi tekrarlanmış (Şekil 4.1), hücrelerin *M.spp* enfeksiyonunun giderildiği gösterildikten sonra, hücrelerin plakaya ekim yoğunluğu tekrar araştırılmıştır (Şekil 4.9). Sonuç olarak,

M.spp enfeksiyonunun hücre büyümesini engellediği gösterilmiştir. Ancak tüm bu adımlar epigenetik ilaç kütüphanesi ile taramanın gecikmesine neden olmuştur.

5.1.8.3. Hücrelerin ilaç inkübasyonlarının uzun sürmesi

Hücrelerin plakalara ekilmesinden itibaren, canlanma testinin gerçekleştirilmesi toplam sekiz gün sürmüştür. Benzer şekilde, KTC2 hücrelerine özgül etkisi olan iki ilacın (CUDC-101 ve PF-03814735) optimum inkübasyon zamanı, sekiz günlük çalışma ile belirlenmiştir ve PF-03814735'in en çok TT sonucunda büyümeyi engellediği gösterilmiştir. Dolayısıyla, PF-03814735'in optimum inkübasyon dozunun belirlenmesi ve tüm tiroid hücrelerinin bu ilaç ile inkübe edilmesi de 8'er gün sürmüştür. Kemoterapi ilaçlarının hastalarda etkili olması için, ilaç tedavileri belirli aralıklarla tekrarlanmaktadır. PF-03814735'in de C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerde tekrarlayan tedavi sonucunda maksimum etkiyi göstermesi yüz güldürücüdür. Ancak, ilaç inkübasyon sürelerinin 8'er gün sürmesinden dolayı, bu çalışmada, tiroid kanseri dışındaki diğer kanser hücreleri (HK, GBM ve melanom) PF-03814935 ile tedavi edilememiştir.

5.1.9. Çalışmanın gelecek planları

Bu çalışmada, beş farklı orijinli kansere özgü hücre hattı koleksiyonu elde edilmiştir. HK, tiroid, GBM ve melanom hücrelerinin *TERTp* mutasyon profili belirlenmiş ve MK orijinli hücre hatları ile hiç çalışma yapılamamıştır. Gelecekte, bu hücrelerin hem bu çalışmanın devamı hem de yeni projelerde kullanılması amaçlanmaktadır.

PF-03814735'in, özellikle C228T *TERTp* mutasyonuna sahip tiroid kanseri hücrelerinde etkili olduğu çalışmamızda gösterilmiş, ancak bu tedavi, HK, GBM, melanom veya MK orijinli hücrelerde denenememiştir. Yüksek sıklıkla C228T *TERTp* mutasyonunu içeren HK, GBM, melanom veya MK gibi hücrelerde de (17, 248) bu tedavinin uygulanıp uygulanamayacağı ileriki çalışmalarda test edilmelidir. Tedavinin, öncelikle, %50'sinde yarısında *BRAF* mutasyonu da tespit edilen

melanomalarda (261, 262), daha sonra ise *TERTp* mutasyonunun sıklıkla görüldüğü GBM ve HK ve MK kanserlerinde uygulanması planlanmaktadır.

PF-03814735 gibi, CUDC-101 adlı epigenetik ilacın da C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan KTC2 hücrelerine özgül etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.16, ilaç 10). Bu ilaç, *TERTp*'da hem C228T mutasyonu taşıyan (KTC2) hem de hiç mutasyon taşımayan (WRO) hücrelerde büyümeyi %50'den fazla engellediği için çalışmadan çıkarılmıştır (Şekil 4.18). CUDC-101'in, farklı orijinli kanser hücrelerinde, birden çok proteini (HDAC/HER2/EGFR) hedefleyerek hücre büyümesini engellediği (257, 263) ve apoptozu indüklediği (257) gösterilmiştir. Ayrıca, farklı ksenograft tümör modellerinde, CUDC-101'in tümör büyümesini engellediği bildirilmiştir (257, 263). PF03814735 ile CUDC-101'in kombine tedavisinin, sinejistik etki yaratacağı ve hücre büyümesi üzerinde, tek başına PF-03814735 tedavisine kıyasla, daha etkili olabileceği tahmin edilmektedir. Kanser tedavilerde kullanılan ilaçlara karşı zamanla direnç gelişmektedir. Bu nedenle, farklı terapötik ilaç kombinasyonları içeren hedefe yönelik tedavi uygulamaları sonucunda farklı orijine sahip tümör hücrelerinde, umut veren sonuçlar bildirilmiştir (264). Dolayısıyla, PF-03814735 ve CUDC-101'in kombinasyonunun uygulanması, tiroid hücrelerinin PF-03814735'e karşı daha az direnç göstermesini sağlayabilir. İleriki çalışmalarda, farklı PF-03814735 ve CUDC-101 kombinasyonları ile öncelikli olarak tiroid hücrelerin tedavi edilmesi söz konusudur.

PF-03814735'in C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan tiroid kanseri hücre hatlarında (KTC2, TPC1 ve BCPAP) etkili olduğu, *TERTp*'da mutasyon taşımayan hücre hattının (WRO) bu ilaca daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu bulguların fizyolojik olup olmadığını göstermek için, aynı tedavi, hem tümör biyopsilerinden elde edilen hücrelerde hem de ksenograft tümör modellerinde tekrarlanmalıdır. Bu amaçla, öncelikle, farklı tip tiroid tümörlerine (PTK, FTK ve ATK) sahip hastalardan alınan tümör biyopsilerinden elde edilecek hücreler, kültüre alınmalıdır. Daha sonra, hücrelerin, bu çalışmada belirlenen optimum doz ve zamanda PF-03814735 ile inkübasyonu sağlanıp, PF-03814735'in kanser hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkisi araştırılmalıdır. Ek olarak, ileriki çalışmalarda, C228T *TERTp* mutasyonu içeren KTC2, TPC1 veya BCPAP hücreleri, ağır kombine bağışıklık yetmezliği (SCID) olan

farelere aşıl原因arak ksenograft fare model(ler)i elde edilmelidir. Ayrıca bir tiroid kanseri hastasından alınan biyopsi örneği kullanılarak da ksenograft tümör modeli oluşturabilir. Fare model(ler)inde tümörün büyümesini takiben, fareler PF-03814735 ile tedavi edilmeli ve hücre kültüründe gözlenen etkilerin oluşan tümörlerde de devam edip etmeyeceği araştırılmalıdır.

5.2. Sonuç

Bu çalışmada, farklı kaynaklardan on üç HK, sekiz tiroid, on bir GBM, dokuz melanom ve ondört MK hücre hattı elde edilmiş, sekiz tiroid, altı HK, onbir GBM ve dört melanom hücre hattı kültürde büyütülmüştür. Kültürde büyütülen tüm hücrelerin, *TERTp* mutasyon profili araştırılmış, bazı hücrelerin mutasyonu literatür ile teyit edilirken, diğerleri ise ilk defa belirlenmiştir. Üç tiroid (WRO, FRO, Nthyori), iki HK (SNU 182/SNU 449), 4 GBM (LN18, LN229, M059J ve Hs683) ve dört melanom (MeWO, SK-Mel-28, A2058 ve G361) hücre hattının *TERTp* mutasyon profili ilk defa bu çalışmada belirlenmiştir.

İkinci aşamada, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan hücrelerin epigenetik ilaçlarla hedeflenebileceği ve bu hücrelere özgü etki gösteren epigenetik ilaçlar bulunabileceği hipotez edilmiştir. Bu amaçla, üç adet tiroid kanseri hücre hattı epigenetik ilaç kütüphanesi ile taranmış, PF-03814735 adlı ilacın en etkili olduğu doz ve zaman belirlenmiş ve tüm tiroid orijinli hücreler, belirlenen optimum doz ve zamanda, PF-03814735 ile muamele edilmiştir. Hücrelerin *BRAF* mutasyon durumundan bağımsız olarak, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan tiroid kanseri hücrelerinde PF-03814735 ile TT sonucunda, büyümenin engellendiği gösterilmiştir. Bu tedavinin, C250T *TERTp* mutasyonu taşıyan tiroid hücrelerinde daha az etkili olduğu ve mutasyon taşımayan hücrelerin bu ilaca karşı dirençli olduğu ortaya konmuştur. Ek olarak, TT sonucunda, C228T mutasyonu taşıyan KTC2 hücrelerinde *hTERT* ifade seviyesinin sabit kaldığı, canlanma deneyi sonucunda ise dört kat arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular, PF-03814735'in, özgül olarak, C228T *TERTp* mutasyonu taşıyan tiroid kanseri hücre hatlarını hedeflemek için kullanılabilceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*. 2002;69(4-5):188-97.
2. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. 2010;11(5):319-30.
3. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol*. 1992;225(4):951-60.
4. Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA, Green DK, Cooke HJ. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res*. 1991;256(1):45-8.
5. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev*. 2008;88(2):557-79.
6. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*. 1992;11(5):1921-9.
7. Morrison SJ, Prowse KR, Ho P, Weissman IL. Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity*. 1996;5(3):207-16.
8. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011-5.
9. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer*. 2007;96(7):1020-4.
10. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995;269(5228):1236-41.
11. Bestilny LJ, Brown CB, Miura Y, Robertson LD, Riabowol KT. Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res*. 1996;56(16):3796-802.
12. Sharma HW, Sokoloski JA, Perez JR, Maltese JY, Sartorelli AC, Stein CA, et al. Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(26):12343-6.
13. Lopatina NG, Poole JC, Saldanha SN, Hansen NJ, Key JS, Pita MA, et al. Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306(3):650-9.
14. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013;339(6122):959-61.
15. Egberts F, Kruger S, Behrens HM, Bergner I, Papaspyrou G, Werner JA, et al. Melanomas of unknown primary frequently harbor TERT-promoter mutations. *Melanoma Res*. 2014;24(2):131-6.
16. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hemminki K, Kumar R. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;24:30-7.

17. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013;339(6122):957-9.
18. Killela PJ, Pirozzi CJ, Healy P, Reitman ZJ, Lipp E, Rasheed BA, et al. Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget*. 2014;5(6):1515-25.
19. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):6021-6.
20. Labussiere M, Boisselier B, Mokhtari K, Di Stefano AL, Rahimian A, Rossetto M, et al. Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology*. 2014;83(13):1200-6.
21. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(5):E754-65.
22. Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*. 2013;126(6):931-7.
23. Wu S, Huang P, Li C, Huang Y, Li X, Wang Y, et al. Telomerase reverse transcriptase gene promoter mutations help discern the origin of urogenital tumors: a genomic and molecular study. *Eur Urol*. 2014;65(2):274-7.
24. Landa I, Ganly I, Chan TA, Mitsutake N, Matsuse M, Ibrahimasic T, et al. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(9):E1562-6.
25. Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, et al. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta Neuropathol*. 2013;126(2):267-76.
26. Nault JC, De Reynies A, Villanueva A, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, et al. A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. *Gastroenterology*. 2013;145(1):176-87.
27. Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*. 2015;348(6238):1036-9.
28. Mancini A, Xavier-Magalhaes A, Woods WS, Nguyen KT, Amen AM, Hayes JL, et al. Disruption of the beta1L Isoform of GABP Reverses Glioblastoma Replicative Immortality in a TERT Promoter Mutation-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2018;34(3):513-28 e8.
29. Egberts F, Bergner I, Kruger S, Haag J, Behrens HM, Hauschild A, et al. Metastatic melanoma of unknown primary resembles the genotype of cutaneous melanomas. *Ann Oncol*. 2014;25(1):246-50.
30. Bae JS, Kim Y, Jeon S, Kim SH, Kim TJ, Lee S, et al. Clinical utility of TERT promoter mutations and ALK rearrangement in thyroid cancer patients with a high prevalence of the BRAF V600E mutation. *Diagn Pathol*. 2016;11:21.
31. Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest*. 2016;126(3):1052-66.

32. Shi X, Liu R, Qu S, Zhu G, Bishop J, Liu X, et al. Association of TERT promoter mutation 1,295,228 C>T with BRAF V600E mutation, older patient age, and distant metastasis in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(4):E632-7.
33. Gandolfi G, Ragazzi M, Frasoldati A, Piana S, Ciarrocchi A, Sancisi V. TERT promoter mutations are associated with distant metastases in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(4):403-13.
34. Liu X, Qu S, Liu R, Sheng C, Shi X, Zhu G, et al. TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):E1130-6.
35. Jin L, Chen E, Dong S, Cai Y, Zhang X, Zhou Y, et al. BRAF and TERT promoter mutations in the aggressiveness of papillary thyroid carcinoma: a study of 653 patients. *Oncotarget.* 2016;7(14):18346-55.
36. Song YS, Lim JA, Choi H, Won JK, Moon JH, Cho SW, et al. Prognostic effects of TERT promoter mutations are enhanced by coexistence with BRAF or RAS mutations and strengthen the risk prediction by the ATA or TNM staging system in differentiated thyroid cancer patients. *Cancer.* 2016;122(9):1370-9.
37. Cong YS, Bacchetti S. Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J Biol Chem.* 2000;275(46):35665-8.
38. Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res.* 2000;60(3):537-41.
39. Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2006;8(4):416-24.
40. Hou M, Wang X, Popov N, Zhang A, Zhao X, Zhou R, et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A derepresses the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in human cells. *Exp Cell Res.* 2002;274(1):25-34.
41. Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(4):839-65.
42. Ayyoub M, Migliaccio M, Guillaume P, Lienard D, Cerottini JC, Romero P, et al. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur J Immunol.* 2001;31(9):2642-51.
43. Abras A, Ballart C, Llovet T, Roig C, Gutierrez C, Tebar S, et al. Introducing automation to the molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: A comparative study of sample treatments, DNA extraction methods and real-time PCR assays. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195738.
44. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10114-8.
45. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345(6274):458-60.
46. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature.* 1990;346(6287):866-8.
47. McClintock B. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1939;25(8):405-16.

48. Sandell LL, Zakian VA. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell*. 1993;75(4):729-39.
49. Autexier C, Lue NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:493-517.
50. Collins K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(7):484-94.
51. Danzy S, Su CY, Park S, Li SY, Ferraris AM, Ly H. Absence of pathogenic mutations of the human telomerase RNA gene (hTERC) in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2006;20(5):893-4.
52. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, et al. A mammalian telomerase-associated protein. *Science*. 1997;275(5302):973-7.
53. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*. 1997;90(4):785-95.
54. Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. 2007;315(5820):1850-3.
55. Wong JM, Collins K. Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita. *Genes Dev*. 2006;20(20):2848-58.
56. Weinberg RA. *The biology of cancer*. New York: Garland Science; 2007.
57. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
58. Shay JW. Telomerase in human development and cancer. *J Cell Physiol*. 1997;173(2):266-70.
59. Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol*. 2000;18(13):2626-34.
60. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res*. 2000;28(3):669-77.
61. Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, Xiao Q, Hann SR, Adams RR, et al. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene*. 1999;18(5):1219-26.
62. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H, et al. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res*. 2000;6(4):1239-47.
63. Xu D, Wang Q, Gruber A, Bjorkholm M, Chen Z, Zaid A, et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene*. 2000;19(45):5123-33.
64. Gomez DL, Farina HG, Gomez DE. Telomerase regulation: a key to inhibition? (Review). *Int J Oncol*. 2013;43(5):1351-6.
65. Liu JP, Cassar L, Pinto A, Li H. Mechanisms of cell immortalization mediated by EB viral activation of telomerase in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Res*. 2006;16(10):809-17.
66. Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, Tai YT, Mitsiades CS, Mitsiades N, et al. Cytokines modulate telomerase activity in a human multiple myeloma cell line. *Cancer Res*. 2002;62(13):3876-82.

67. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998;279(5349):349-52.
68. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol*. 1998;8(5):279-82.
69. Li Y, Zhou QL, Sun W, Chandrasekharan P, Cheng HS, Ying Z, et al. Non-canonical NF-kappaB signalling and ETS1/2 cooperatively drive C250T mutant TERT promoter activation. *Nat Cell Biol*. 2015;17(10):1327-38.
70. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(4):603-10.
71. Liu X, Wu G, Shan Y, Hartmann C, von Deimling A, Xing M. Highly prevalent TERT promoter mutations in bladder cancer and glioblastoma. *Cell Cycle*. 2013;12(10):1637-8.
72. Quaas A, Oldopp T, Tharun L, Klingefeld C, Krech T, Sauter G, et al. Frequency of TERT promoter mutations in primary tumors of the liver. *Virchows Arch*. 2014;465(6):673-7.
73. Kinde I, Munari E, Faraj SF, Hruban RH, Schoenberg M, Bivalacqua T, et al. TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine. *Cancer Res*. 2013;73(24):7162-7.
74. Borah S, Xi L, Zaug AJ, Powell NM, Dancik GM, Cohen SB, et al. Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science*. 2015;347(6225):1006-10.
75. Reitman ZJ, Pirozzi CJ, Yan H. Promoting a new brain tumor mutation: TERT promoter mutations in CNS tumors. *Acta Neuropathol*. 2013;126(6):789-92.
76. Chiba K, Johnson JZ, Vogan JM, Wagner T, Boyle JM, Hockemeyer D. Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing. *Elife*. 2015;4.
77. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hosen I, Volz F, Hemminki K, Weyerbrock A, et al. TERT promoter mutations and telomere length in adult malignant gliomas and recurrences. *Oncotarget*. 2015;6(12):10617-33.
78. Stern JL, Theodorescu D, Vogelstein B, Papadopoulos N, Cech TR. Mutation of the TERT promoter, switch to active chromatin, and monoallelic TERT expression in multiple cancers. *Genes Dev*. 2015;29(21):2219-24.
79. Thompson CC, Brown TA, McKnight SL. Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science*. 1991;253(5021):762-8.
80. Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*. 2003;303:11-34.
81. LaMarco K, Thompson CC, Byers BP, Walton EM, McKnight SL. Identification of Ets- and notch-related subunits in GA binding protein. *Science*. 1991;253(5021):789-92.
82. Wu H, Xiao Y, Zhang S, Ji S, Wei L, Fan F, et al. The Ets transcription factor GABP is a component of the hippo pathway essential for growth and antioxidant defense. *Cell Rep*. 2013;3(5):1663-77.
83. Flory E, Hoffmeyer A, Smola U, Rapp UR, Bruder JT. Raf-1 kinase targets GA-binding protein in transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol*. 1996;70(4):2260-8.

84. Rachakonda PS, Hosen I, de Verdier PJ, Fallah M, Heidenreich B, Ryk C, et al. TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43):17426-31.
85. Lee S, Opresko P, Pappo A, Kirkwood JM, Bahrami A. Association of TERT promoter mutations with telomerase expression in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29(3):391-3.
86. Nickerson ML, Dancik GM, Im KM, Edwards MG, Turan S, Brown J, et al. Concurrent alterations in TERT, KDM6A, and the BRCA pathway in bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(18):4935-48.
87. Valentijn LJ, Koster J, Zwijnenburg DA, Hasselt NE, van Sluis P, Volckmann R, et al. TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nat Genet*. 2015;47(12):1411-4.
88. Peifer M, Hertwig F, Roels F, Dreidax D, Gartlgruber M, Menon R, et al. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*. 2015;526(7575):700-4.
89. Zhu CQ, Cutz JC, Liu N, Lau D, Shepherd FA, Squire JA, et al. Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2006;94(10):1452-9.
90. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW, Kim JM. Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;182(1):1-11.
91. Wang N, Liu T, Sofiadis A, Juhlin CC, Zedenius J, Hoog A, et al. TERT promoter mutation as an early genetic event activating telomerase in follicular thyroid adenoma (FTA) and atypical FTA. *Cancer*. 2014;120(19):2965-79.
92. Yamashita T, Wang XW. Cancer stem cells in the development of liver cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(5):1911-8.
93. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J Clin Gastroenterol*. 2013;47 Suppl:S2-6.
94. Xu W, Yu J, Wong VW. Mechanism and prediction of HCC development in HBV infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31(3):291-8.
95. Chen CH, Huang GT, Yang PM, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, et al. Hepatitis B- and C-related hepatocellular carcinomas yield different clinical features and prognosis. *Eur J Cancer*. 2006;42(15):2524-9.
96. Simonetti J, Bulkow L, McMahon BJ, Homan C, Snowball M, Negus S, et al. Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology*. 2010;51(5):1531-7.
97. Mohamad B, Shah V, Onyshchenko M, Elshamy M, Aucejo F, Lopez R, et al. Characterization of hepatocellular carcinoma (HCC) in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients without cirrhosis. *Hepatol Int*. 2016;10(4):632-9.
98. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45(4):529-38.
99. Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(2):123-35.
100. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):674-87.

101. Tornesello ML, Buonaguro L, Buonaguro FM. An overview of new biomolecular pathways in pathogen-related cancers. *Future Oncol.* 2015;11(11):1625-39.
102. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1226-39 e4.
103. Tornesello ML, Buonaguro L, Izzo F, Buonaguro FM. Molecular alterations in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C infections. *Oncotarget.* 2016;7(18):25087-102.
104. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002;31(4):339-46.
105. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012;44(6):694-8.
106. De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, Repetto O, Zignego AL, Izzo F, et al. Genetic diversity of the KIR/HLA system and susceptibility to hepatitis C virus-related diseases. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117420.
107. Tornesello ML, Buonaguro L, Tatangelo F, Botti G, Izzo F, Buonaguro FM. Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Genomics.* 2013;102(2):74-83.
108. Unsal H, Yakicier C, Marcais C, Kew M, Volkmann M, Zentgraf H, et al. Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(2):822-6.
109. Gouas D, Shi H, Hainaut P. The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Lett.* 2009;286(1):29-37.
110. Imbeaud S, Ladeiro Y, Zucman-Rossi J. Identification of novel oncogenes and tumor suppressors in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2010;30(1):75-86.
111. Nault JC, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatobiliary carcinogenesis. *Semin Liver Dis.* 2011;31(2):173-87.
112. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet.* 2012;44(7):760-4.
113. Nault JC, Zucman-Rossi J. TERT promoter mutations in primary liver tumors. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016;40(1):9-14.
114. Pezzuto F, Izzo F, Buonaguro L, Annunziata C, Tatangelo F, Botti G, et al. Tumor specific mutations in TERT promoter and CTNNB1 gene in hepatitis B and hepatitis C related hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(34):54253-62.
115. Xu D, Dwyer J, Li H, Duan W, Liu JP. Ets2 maintains hTERT gene expression and breast cancer cell proliferation by interacting with c-Myc. *J Biol Chem.* 2008;283(35):23567-80.
116. Zhang C, Tian YP, Wang Y, Guo FH, Qin JF, Ni H. hTERT rs2736098 genetic variants and susceptibility of hepatocellular carcinoma in the Chinese population: a case-control study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2013;12(1):74-9.
117. Ding CY, Hu LM, Hu ZB, Shen HB. [The relationship between gene polymorphism of telomerase reverse transcriptase and susceptibility to hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2011;45(7):593-6.

118. Ko E, Seo HW, Jung ES, Kim BH, Jung G. The TERT promoter SNP rs2853669 decreases E2F1 transcription factor binding and increases mortality and recurrence risks in liver cancer. *Oncotarget*. 2016;7(1):684-99.
119. Gray J. *Gray's anatomy : selected writings*. London: Allen Lane; 2009. vii, 480 p. p.
120. McHenry CR, Phitayakorn R. Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland. *Oncologist*. 2011;16(5):585-93.
121. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see commets]. *Cancer*. 1998;83(12):2638-48.
122. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, Jemal A, Ryerson AB, Henry KA, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(6):d1v048.
123. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2):245-62.
124. Santoro M, Melillo RM, Fusco A. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(5):645-53.
125. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(3):184-99.
126. Parameswaran R, Brooks S, Sadler GP. Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers. *Int J Surg*. 2010;8(3):186-93.
127. Eberhardt NL, Grebe SK, McIver B, Reddi HV. The role of the PAX8/PPARgamma fusion oncogene in the pathogenesis of follicular thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;321(1):50-6.
128. Liu T, Wang N, Cao J, Sofiadis A, Dinets A, Zedenius J, et al. The age- and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas. *Oncogene*. 2014;33(42):4978-84.
129. Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, et al. TERT, BRAF, and NRAS in Primary Thyroid Cancer and Metastatic Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(6):1898-907.
130. Xu B, Tuttle RM, Sabra MM, Ganly I, Ghossein R. Primary Thyroid Carcinoma with Low-Risk Histology and Distant Metastases: Clinicopathologic and Molecular Characteristics. *Thyroid*. 2017;27(5):632-40.
131. Sun J, Zhang J, Lu J, Gao J, Ren X, Teng L, et al. BRAF V600E and TERT Promoter Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma in Chinese Patients. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153319.
132. Muzza M, Colombo C, Rossi S, Tosi D, Cirello V, Perrino M, et al. Telomerase in differentiated thyroid cancer: promoter mutations, expression and localization. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;399:288-95.
133. George JR, Henderson YC, Williams MD, Roberts DB, Hei H, Lai SY, et al. Association of TERT Promoter Mutation, But Not BRAF Mutation, With Increased Mortality in PTC. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(12):E1550-9.
134. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359(5):492-507.

135. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
136. Appin CL, Brat DJ. Molecular genetics of gliomas. *Cancer J.* 2014;20(1):66-72.
137. Gupta M, Djalilvand A, Brat DJ. Clarifying the diffuse gliomas: an update on the morphologic features and markers that discriminate oligodendroglioma from astrocytoma. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(5):755-68.
138. Smith JS, Alderete B, Minn Y, Borell TJ, Perry A, Mohapatra G, et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene.* 1999;18(28):4144-52.
139. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget.* 2012;3(7):709-22.
140. Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science.* 2011;333(6041):425.
141. Narayana A, Gruber D, Kunnakkat S, Golfinos JG, Parker E, Raza S, et al. A clinical trial of bevacizumab, temozolomide, and radiation for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurosurg.* 2012;116(2):341-5.
142. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res.* 2004;10(6):1871-4.
143. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol.* 2013;31(32):4085-91.
144. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 2009;360(8):765-73.
145. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807-12.
146. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2499-508.
147. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
148. Diplas BH, He X, Brosnan-Cashman JA, Liu H, Chen LH, Wang Z, et al. The genomic landscape of TERT promoter wildtype-IDH wildtype glioblastoma. *Nat Commun.* 2018;9(1):2087.
149. Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, Royds JA, Yeager TR, Robinson RA, et al. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas. *Clin Cancer Res.* 2005;11(1):217-25.
150. Henson JD, Cao Y, Huschtscha LI, Chang AC, Au AY, Pickett HA, et al. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat Biotechnol.* 2009;27(12):1181-5.

151. Grobelny JV, Godwin AK, Broccoli D. ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. *J Cell Sci.* 2000;113 Pt 24:4577-85.
152. Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol.* 2012;124(5):615-25.
153. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2009;174(4):1149-53.
154. Balsl J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008;116(6):597-602.
155. Mellai M, Piazzini A, Caldera V, Monzeglio O, Cassoni P, Valente G, et al. IDH1 and IDH2 mutations, immunohistochemistry and associations in a series of brain tumors. *J Neurooncol.* 2011;105(2):345-57.
156. Mosrati MA, Malmstrom A, Lysiak M, Krysztofiak A, Hallbeck M, Milos P, et al. TERT promoter mutations and polymorphisms as prognostic factors in primary glioblastoma. *Oncotarget.* 2015;6(18):16663-73.
157. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell.* 2016;164(3):550-63.
158. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 2012;26(11):1131-55.
159. Das Thakur M, Stuart DD. The evolution of melanoma resistance reveals therapeutic opportunities. *Cancer Res.* 2013;73(20):6106-10.
160. Parkin DM, Mesher D, Sasieni P. 13. Cancers attributable to solar (ultraviolet) radiation exposure in the UK in 2010. *Br J Cancer.* 2011;105 Suppl 2:S66-9.
161. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013;500(7463):415-21.
162. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012;150(2):251-63.
163. Gartner JJ, Parker SC, Prickett TD, Dutton-Regester K, Stitzel ML, Lin JC, et al. Whole-genome sequencing identifies a recurrent functional synonymous mutation in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(33):13481-6.
164. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med.* 2015;373(20):1926-36.
165. Makowski MM, Willems E, Fang J, Choi J, Zhang T, Jansen PW, et al. An interaction proteomics survey of transcription factor binding at recurrent TERT promoter mutations. *Proteomics.* 2016;16(3):417-26.
166. Griewank KG, Murali R, Puig-Butlle JA, Schilling B, Livingstone E, Potrony M, et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(9).
167. Populo H, Boaventura P, Vinagre J, Batista R, Mendes A, Caldas R, et al. TERT promoter mutations in skin cancer: the effects of sun exposure and X-irradiation. *J Invest Dermatol.* 2014;134(8):2251-7.

168. Nagore E, Heidenreich B, Rachakonda S, Garcia-Casado Z, Requena C, Soriano V, et al. TERT promoter mutations in melanoma survival. *Int J Cancer*. 2016;139(1):75-84.
169. Vallarelli AF, Rachakonda PS, Andre J, Heidenreich B, Riffaud L, Bensussan A, et al. TERT promoter mutations in melanoma render TERT expression dependent on MAPK pathway activation. *Oncotarget*. 2016;7(33):53127-36.
170. Netto GJ. Clinical applications of recent molecular advances in urologic malignancies: no longer chasing a "mirage"? *Adv Anat Pathol*. 2013;20(3):175-203.
171. Eser S, Yakut C, Ozdemir R, Karakilinc H, Ozalan S, Marshall SF, et al. Cancer incidence rates in Turkey in 2006: a detailed registry based estimation. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(6):1731-9.
172. Letasiova S, Medve'ova A, Sovcikova A, Dusinska M, Volkovova K, Mosoiu C, et al. Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ Health*. 2012;11 Suppl 1:S11.
173. Burch JD, Rohan TE, Howe GR, Risch HA, Hill GB, Steele R, et al. Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer*. 1989;44(4):622-8.
174. Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urol Oncol*. 2012;30(2):199-211.
175. Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol Lett*. 2010;193(2):131-7.
176. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63(2):234-41.
177. Case RA, Pearson JT. Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. II. Further consideration of the role of aniline and of the manufacture of auramine and magenta (fuchsine) as possible causative agents. *Br J Ind Med*. 1954;11(3):213-6.
178. Golka K, Wiese A, Assennato G, Bolt HM. Occupational exposure and urological cancer. *World J Urol*. 2004;21(6):382-91.
179. van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol*. 2009;56(3):430-42.
180. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21(18):1315-30.
181. Riley GF, Potosky AL, Lubitz JD, Kessler LG. Medicare payments from diagnosis to death for elderly cancer patients by stage at diagnosis. *Med Care*. 1995;33(8):828-41.
182. Dancik GM, Owens CR, Iczkowski KA, Theodorescu D. A cell of origin gene signature indicates human bladder cancer has distinct cellular progenitors. *Stem Cells*. 2014;32(4):974-82.
183. Anastasiadis A, Cordeiro E, Bus MT, Alivizatos G, de la Rosette JJ, de Reijke TM. Follow-up procedures for non-muscle-invasive bladder cancer: an update. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012;12(9):1229-41.

184. Wang QY, Zhao Y, Zhang R. The role of mutations and overexpression of the fibroblast growth factor receptor-3 in bladder cancer. *Minerva Med.* 2015;106(6):333-7.
185. Knowles MA, Platt FM, Ross RL, Hurst CD. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(3-4):305-16.
186. Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN, van Rhijn BW, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One.* 2010;5(11):e13821.
187. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(9):713-25.
188. Bell RJ, Rube HT, Xavier-Magalhaes A, Costa BM, Mancini A, Song JS, et al. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Mol Cancer Res.* 2016;14(4):315-23.
189. Hosen I, Rachakonda PS, Heidenreich B, de Verdier PJ, Ryk C, Steineck G, et al. Mutations in TERT promoter and FGFR3 and telomere length in bladder cancer. *Int J Cancer.* 2015;137(7):1621-9.
190. Critelli R, Fasanelli F, Oderda M, Polidoro S, Assumma MB, Viberti C, et al. Detection of multiple mutations in urinary exfoliated cells from male bladder cancer patients at diagnosis and during follow-up. *Oncotarget.* 2016;7(41):67435-48.
191. Fletcher TM, Salazar M, Chen SF. Human telomerase inhibition by 7-deaza-2'-deoxypurine nucleoside triphosphates. *Biochemistry.* 1996;35(49):15611-7.
192. Fletcher TM, Cathers BE, Ravikumar KS, Mamiya BM, Kerwin SM. Inhibition of human telomerase by 7-deaza-2'-deoxyguanosine nucleoside triphosphate analogs: potent inhibition by 6-thio-7-deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate. *Bioorg Chem.* 2001;29(1):36-55.
193. Liu Y, Snow BE, Hande MP, Baerlocher G, Kickhoefer VA, Yeung D, et al. Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo. *Mol Cell Biol.* 2000;20(21):8178-84.
194. Kickhoefer VA, Liu Y, Kong LB, Snow BE, Stewart PL, Harrington L, et al. The Telomerase/vault-associated protein TEP1 is required for vault RNA stability and its association with the vault particle. *J Cell Biol.* 2001;152(1):157-64.
195. Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, Hitomi M, Barnett GH, Ishizaka Y, et al. Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. *FASEB J.* 1998;12(10):801-11.
196. Ishii K, Yang WL, Cvijic ME, Kikuchi Y, Nagata I, Chin KV. Telomere shortening by cisplatin in yeast nucleotide excision repair mutant. *Exp Cell Res.* 2000;255(1):95-101.
197. Burger AM, Double JA, Newell DR. Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur J Cancer.* 1997;33(4):638-44.
198. Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S. Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood.* 2001;97(9):2903-7.
199. Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, Majumdar A, Naoe M, Lebkowski JS, et al. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated

tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med.* 2000;6(9):1011-7.

200. Marian CO, Cho SK, McEllin BM, Maher EA, Hatanpaa KJ, Madden CJ, et al. The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth. *Clin Cancer Res.* 2010;16(1):154-63.

201. Goldblatt EM, Gentry ER, Fox MJ, Gryaznov SM, Shen C, Herbert BS. The telomerase template antagonist GRN163L alters MDA-MB-231 breast cancer cell morphology, inhibits growth, and augments the effects of paclitaxel. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(7):2027-35.

202. Joseph I, Tressler R, Bassett E, Harley C, Buseman CM, Pattamatta P, et al. The telomerase inhibitor imetelstat depletes cancer stem cells in breast and pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res.* 2010;70(22):9494-504.

203. Djojotubroto MW, Chin AC, Go N, Schaetzlein S, Manns MP, Gryaznov S, et al. Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. *Hepatology.* 2005;42(5):1127-36.

204. Chiappori AA, Kolevska T, Spigel DR, Hager S, Rarick M, Gadgeel S, et al. A randomized phase II study of the telomerase inhibitor imetelstat as maintenance therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(2):354-62.

205. Salloum R, Hummel TR, Kumar SS, Dorris K, Li S, Lin T, et al. A molecular biology and phase II study of imetelstat (GRN163L) in children with recurrent or refractory central nervous system malignancies: a pediatric brain tumor consortium study. *J Neurooncol.* 2016;129(3):443-51.

206. Acun T, Oztas E, Yagci T, Yakicier MC. SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation. *BMC Cancer.* 2011;11:223.

207. Institute UG. 2019 [cited 2019. Available from: <https://genome.ucsc.edu/>].

208. Information NNCfB. Primer-BLAST [cited 2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>].

209. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):e115.

210. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007;23(10):1289-91.

211. Information NNCfB. 2019 [cited 2019. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch].

212. Descotes F, Kara N, Decaussin-Petrucci M, Piaton E, Geiguer F, Rodriguez-Lafrasse C, et al. Non-invasive prediction of recurrence in bladder cancer by detecting somatic TERT promoter mutations in urine. *Br J Cancer.* 2017;117(4):583-7.

213. Allory Y, Beukers W, Sagrera A, Flandez M, Marques M, Marquez M, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur Urol.* 2014;65(2):360-6.

214. Voigt W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med.* 2005;110:39-48.

215. R B, M L. Clinical relevance of the molecular mechanisms of resistance to anti-cancer drugs. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 1999;1(15):1-21.

216. Levine EM, Thomas L, McGregor D, Hayflick L, Eagle H. Altered nucleic acid metabolism in human cell cultures infected with mycoplasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;60(2):583-9.

217. McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J. Cytogenetic effects of mycoplasma infection of cell cultures: a review. *In Vitro*. 1984;20(1):1-18.
218. Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hebrant A, van Staveren WC, et al. Thyroid cancer cell lines: an overview. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:133.
219. Park KS, Kim JB, Bae J, Park SY, Jee HG, Lee KE, et al. Berberine inhibited the growth of thyroid cancer cell lines 8505C and TPC1. *Yonsei Med J*. 2012;53(2):346-51.
220. Hebling J, Bianchi L, Basso FG, Scheffel DL, Soares DG, Carrilho MR, et al. Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. *Dent Mater*. 2015;31(4):399-405.
221. Cosmic catalog of somatic mutations in cancer 2019 [Available from: https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines/cbrowse/all].
222. CCLE Cancer cell line encyclopedia 2019 [Available from: <https://portals.broadinstitute.org/ccle>].
223. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenth U, Benezra M, Knauf JA, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4331-41.
224. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(9):4393-7.
225. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009;69(11):4885-93.
226. Piscazzi A, Costantino E, Maddalena F, Natalicchio MI, Gerardi AM, Antonetti R, et al. Activation of the RAS/RAF/ERK signaling pathway contributes to resistance to sunitinib in thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(6):E898-906.
227. Meireles AM, Preto A, Rocha AS, Rebocho AP, Maximo V, Pereira-Castro I, et al. Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines. *Thyroid*. 2007;17(8):707-15.
228. Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakar BS. Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(12):1333-42.
229. Garcia-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res*. 2005;65(22):10199-207.
230. Nucera C, Porrello A, Antonello ZA, Mekel M, Nehs MA, Giordano TJ, et al. B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(23):10649-54.
231. Cahill S, Smyth P, Denning K, Flavin R, Li J, Potratz A, et al. Effect of BRAFV600E mutation on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer*. 2007;6:21.
232. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(3):R143-55.

233. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*. 2017;545(7653):175-80.
234. Ward DG, Baxter L, Gordon NS, Ott S, Savage RS, Beggs AD, et al. Multiplex PCR and Next Generation Sequencing for the Non-Invasive Detection of Bladder Cancer. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149756.
235. The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP): National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine; [cited 2018 11/18]. Available from: [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/).
236. Promo homepage version 3.0.2 [Available from: http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3].
237. Sandberg ML, Sutton SE, Pletcher MT, Wiltshire T, Tarantino LM, Hogenesch JB, et al. c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Dev Cell*. 2005;8(2):153-66.
238. Ye P, Zhao L, Gonda TJ. The MYB oncogene can suppress apoptosis in acute myeloid leukemia cells by transcriptional repression of DRAK2 expression. *Leuk Res*. 2013;37(5):595-601.
239. Lahortiga I, De Keersmaecker K, Van Vlierberghe P, Graux C, Cauwelier B, Lambert F, et al. Duplication of the MYB oncogene in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2007;39(5):593-5.
240. Hugo HJ, Pereira L, Suryadinata R, Drabsch Y, Gonda TJ, Gunasinghe NP, et al. Direct repression of MYB by ZEB1 suppresses proliferation and epithelial gene expression during epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2013;15(6):R113.
241. Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, Sugimoto KJ, Majid A, Walewska R, et al. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood*. 2007;109(8):3451-61.
242. Xiao W, Hodge DR, Wang L, Yang X, Zhang X, Farrar WL. Co-operative functions between nuclear factors NFkappaB and CCAT/enhancer-binding protein-beta (C/EBP-beta) regulate the IL-6 promoter in autocrine human prostate cancer cells. *Prostate*. 2004;61(4):354-70.
243. Zellmer S, Schmidt-Heck W, Godoy P, Weng H, Meyer C, Lehmann T, et al. Transcription factors ETF, E2F, and SP-1 are involved in cytokine-independent proliferation of murine hepatocytes. *Hepatology*. 2010;52(6):2127-36.
244. Hsu CP, Hsu NY, Lee LW, Ko JL. Ets2 binding site single nucleotide polymorphism at the hTERT gene promoter--effect on telomerase expression and telomere length maintenance in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2006;42(10):1466-74.
245. Spiegl-Kreinecker S, Lotsch D, Ghanim B, Pirker C, Mohr T, Laaber M, et al. Prognostic quality of activating TERT promoter mutations in glioblastoma: interaction with the rs2853669 polymorphism and patient age at diagnosis. *Neuro Oncol*. 2015;17(9):1231-40.
246. Mason PJ, Perdigonés N. Telomere biology and translational research. *Transl Res*. 2013;162(6):333-42.
247. Sohn SY, Park WY, Shin HT, Bae JS, Ki CS, Oh YL, et al. Highly Concordant Key Genetic Alterations in Primary Tumors and Matched Distant Metastases in Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(5):672-82.

248. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 2013;4:2185.
249. Hahn SY, Kim TH, Ki CS, Kim SW, Ahn S, Shin JH, et al. Ultrasound and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas with BRAF and TERT promoter mutations. *Oncotarget.* 2017;8(65):108946-57.
250. Kim TH, Kim YE, Ahn S, Kim JY, Ki CS, Oh YL, et al. TERT promoter mutations and long-term survival in patients with thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(10):813-23.
251. Oishi N, Kondo T, Ebina A, Sato Y, Akaishi J, Hino R, et al. Molecular alterations of coexisting thyroid papillary carcinoma and anaplastic carcinoma: identification of TERT mutation as an independent risk factor for transformation. *Mod Pathol.* 2017;30(11):1527-37.
252. Ren H, Shen Y, Hu D, He W, Zhou J, Cao Y, et al. Co-existence of BRAF(V600E) and TERT promoter mutations in papillary thyroid carcinoma is associated with tumor aggressiveness, but not with lymph node metastasis. *Cancer Manag Res.* 2018;10:1005-13.
253. Shen X, Liu R, Xing M. A six-genotype genetic prognostic model for papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(1):41-52.
254. Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, et al. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *J Clin Oncol.* 2014;32(25):2718-26.
255. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(7):1454-7.
256. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene.* 2003;22(29):4578-80.
257. Lai CJ, Bao R, Tao X, Wang J, Atoyian R, Qu H, et al. CUDC-101, a multitargeted inhibitor of histone deacetylase, epidermal growth factor receptor, and human epidermal growth factor receptor 2, exerts potent anticancer activity. *Cancer Res.* 2010;70(9):3647-56.
258. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(5):2318-26.
259. Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:49.
260. Jani JP, Arcari J, Bernardo V, Bhattacharya SK, Briere D, Cohen BD, et al. PF-03814735, an orally bioavailable small molecule aurora kinase inhibitor for cancer therapy. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(4):883-94.
261. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med.* 2012;10:85.
262. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-54.
263. Cai X, Zhai HX, Wang J, Forrester J, Qu H, Yin L, et al. Discovery of 7-(4-(3-ethynylphenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yloxy)-N-hydroxyheptanamide

(CUDc-101) as a potent multi-acting HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem.* 2010;53(5):2000-9.

264. Holohan B, Wright WE, Shay JW. Cell biology of disease: Telomeropathies: an emerging spectrum disorder. *J Cell Biol.* 2014;205(3):289-99.



Toward *In Vitro* Epigenetic Drug Design for Thyroid Cancer: The Promise of PF-03814735, an Aurora Kinase Inhibitor

Sevim Dalva-Aydemir,¹ Cemaliye Boylu Akyerli,² Şirin Kılıçturgay Yüksel,^{1,3}
 Hilal Keskin,¹ and Mustafa Cengiz Yakicier³

Abstract

Thyroid cancer (TC) is a very common malignancy worldwide. Chief among the innovative molecular drug targets for TC are epigenetic modifications. Increased telomerase activity in cancer cells makes telomerase a novel target for epigenetic anticancer drug innovation. Recently, telomerase reverse transcriptase (*TERT*) gene promoter (*TERTp*) mutations (C228T and C250T) were reported at high frequency in TC cell lines and tumor biopsies. In this study, three representative TC cell lines, mutant *TERTp* (TPC1), mutant *BRAF/TERTp* (KTC2), and wild-type *TERTp* (WRO), were screened with a drug library composed of 51 epigenetic drugs: 14 Aurora kinase inhibitors; 23 histone deacetylase inhibitors; 5 sirtuin modifiers; 3 hypoxia-inducible factor inhibitors; 2 DNA methyltransferase inhibitors; 2 histone methyltransferase inhibitors, a histone demethylase inhibitor, and a bromodomain inhibitor. Effects of the drugs on cell growth at 48 and 72 h were compared. PF-03814735, a small-molecule inhibitor of Aurora kinase A (IC₅₀=0.8 nM) and B (IC₅₀=5 nM), was the most potent on KTC2 cells, whereas CUDC-101, a multitarget inhibitor, was effective on both WRO and KTC2 cells. Notably, PF-03814735 was found to be the most effective epigenetic drug on cell lines harboring the C228T mutation. In conclusion, these new findings offer specific guidance on dose and time course selection to design novel therapeutic interventions against TC using PF-03814735, and specifically target cells carrying the *TERTp*^{C228T} mutation. In a larger context of drug discovery science, these findings inform new strategies to forecast optimal treatment regimens for TC, particularly with Aurora kinase inhibitors and in ways guided by epigenetic drug design.

Keywords: epigenetics, drug design, PF-03814735, Aurora kinase inhibitor, telomerase, thyroid cancer

Introduction

DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC INNOVATION in clinical oncology can benefit from knowledge of host/environment interactions broadly, and the field of epigenetics in particular (Dawson, 2017). To this end, cancer research and drug development are currently witnessing the dawn of epigenetics-guided drug discovery and development (Dzobo, 2019).

Thyroid cancer (TC) is one of the most common endocrine malignancies and offers an opportunity for epigenetic drug design that can greatly impact public health. Additionally, increased telomerase activity in cancer cells makes telomerase a novel target for anticancer therapeutics innovation.

Telomerase reverse transcriptase (*TERT*) gene promoter (*TERTp*) mutations (C228T and C250T) were reported at a high frequency in TC cell lines and tumor biopsies. Both

TERTp mutations were shown to create *de novo* E26 transformation-specific (ETS) transcription factor family binding sites (Horn et al., 2013; Mancini et al., 2018; Song et al., 2019; Vallarelli et al., 2016) and increase *TERT* expression as well as telomerase activity (Vinagre et al., 2013).

Numerous studies demonstrated that telomere lengthening is controlled by epigenetic mechanisms (Cong and Bacchetti, 2000; Dessain et al., 2000; Gonzalo et al., 2006; Hou et al., 2002; Lopatina et al., 2003). Notably, cells harboring *TERTp* hotspot mutations contain active histone marks and maintain transactivation by recruiting GA-binding protein (GABP), whereas cells harboring wild-type *TERTp* exhibit epigenetically silenced chromatin (Bell et al., 2015). Furthermore, it has been reported that *TERTp* was hypermethylated in terminally differentiated cells at CpG islands and thus, inhibition of DNA methylation (Gonzalo et al., 2006) or histone

¹Biochemistry and Molecular Biology PhD Program, Institute of Health Sciences, Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, Istanbul, Turkey.

²Medical Biology, School of Medicine, Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, Istanbul, Turkey.

³Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, Istanbul, Turkey.

deacetylation (Cong and Bacchetti, 2000) induced telomere elongation and increased genomic instability in somatic cells.

Based on the frequency of *TERTp*^{C228T} mutations in TC and the critical effects of epigenetic modifications on *TERTp* activity, candidate epigenetic drugs were hypothesized to target TC cells harboring *TERTp*^{C228T}. In this study, three representative TC cell lines, mutant *TERTp* (TPC1), mutant *BRAF/TERTp* (KTC2), and wild-type *TERTp* (WRO), were used to screen an epigenetic drug library, with a view to inform future epigenetic-guided drug design and development in TC.

Materials and Methods

Study design

In this study, the *TERTp* mutation status of eight thyroid-originated cell lines was determined. *TERTp* and *BRAF*/

Three representative cell lines, TPC1, KTC2, and WRO cells, were screened with an epigenetic drug library containing 51 drugs. Effects of the drugs on cell growth were evaluated by the sulforhodamine B (SRB) assay (Vichai and Kirtikara, 2006). Following dose and time response analyses, all cell lines were treated with 50 nM of PF-03814735 for 72 h and 72 h+72 h (Repeated treatment [RpT]). The effects of the drug on cells carrying *TERTp* mutations (C228T or C250T) and wild-type *TERTp* were compared.

Cell lines and culture conditions

Cell lines used in this study were obtained from two sources. TC cell lines: FRO, WRO, KTC1, KTC2, and TPC1 were kindly received from Norisato Mitsutake (Nagasaki University, Nagasaki, Japan). TC cell lines: BCPAP, 8505C, and immortalized thyroid cells (Nthyori3.1) were kindly received from Paul Hofman (Institute of Research on Cancer and Aging of Nice [IRCAN], Nice, France).

KTC1, KTC2, WRO, 8505C, and Nthyori3.1 cells were cultured in RPMI 1640 with L-Glutamine, whereas BCPAP and TPC1 cells were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium, both supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% Eagle's minimum essential medium, nonessential amino acid solution and 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin). Different media were preferred to obtain similar doubling time for all cell lines. All culture reagents were purchased from Gibco (Paisley, United Kingdom). Tissue culture flasks were purchased from Costar (Cambridge, MA, USA). Flasks were incubated in a humidified 37°C incubator with 10% CO₂ (Thermo Scientific, USA).

Detection of TERTp mutations

Genomic DNA was isolated from thyroid cell lines using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). *TERTp* mutation profile of all cells was determined by polymerase chain reaction (PCR) amplification followed by Sanger sequencing.

Briefly, a 1640 bp region of *TERTp* covering C228T and C250T hotspot mutations was PCR amplified (PCR1) using thermal cycler DNA Engine, PTC-200 (Bio-Rad MJ Research, USA) with an initial denaturing step at 96°C for 2 min followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 62°C for 35 sec, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. PCR was carried out in a total of 50 µL reaction volume, consisting of 50–100 ng DNA, 1× Colorless GoTaq Flexi Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1% dimethyl sulfoxide (DMSO), 20 pmoles of forward (*TERTp*_1F) and reverse (*TERTp*_3R) primers, and 1.25 U GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, USA). Amplifications (5 µL of the PCR product) were verified on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. PCR products were then purified using the ExoSAP-IT Kit (Affymetrix, USA) followed by automated Sanger sequencing using the

TABLE 1. *TERTp* MUTATION STATUS OF DIFFERENT THYROID CANCER CELL LINES

Cell line	Type of tumor	TERTp variations		
		Mutation	Other (SNP)	Secondary mutation
TPC1	PTC	C228T		<i>RET/PTC</i> fusion
KTC2	ATC	C228T		<i>BRAF</i> ^{V600E}
BCPAP	PTC	CC229, 228TT		<i>BRAF</i> ^{V600E}
KTC1	PTC	C250T		<i>BRAF</i> ^{V600E}
8505C	ATC	C250T		<i>BRAF</i> ^{V600E}
FRO	ATC	C250T		<i>BRAF</i> ^{V600E}
WRO	FTC	Wild-type	349(CC) 1072(CC) 1256–1260insC	<i>KRAS</i> wild-type <i>BRAF</i> wild-type <i>KRAS</i> wild-type
Nthyori3.1	Immortalized	Wild-type	349(TT) 1072(CC)	<i>BRAF</i> wild-type

TERTp mutation status of TC cell lines and immortalized thyroid cells (Nthyori3.1) were determined by Sanger sequencing. Full-length *TERTp* was sequenced for only C228T/C250T wild-type WRO and Nthyori3.1 cells. *BRAF* and *KRAS* mutation status of all cell lines were taken from other studies in literature. Due to the reported conflicting results on *BRAF* status of FRO and WRO cells, both *BRAF* (V600E) and *KRAS* (codons 12/13) mutations (in bold) were investigated. To the best of our knowledge, *BRAF* mutation status of FRO and WRO cells and *TERTp* mutation status of WRO and Nthyori3.1 cells, including SNPs were determined for the first time in our study. 349(CC), 1072(CC), and 1256–1260insC correspond to rs2853669, rs7712562, and rs3215401 at SNP database.

ATC, anaplastic TC; FTC, follicular TC; PTC, papillary TC; SNP, single nucleotide polymorphism; TC, thyroid cancer; *TERTp*, telomerase reverse transcriptase gene promoter.

PF-03814735: AN EPIGENETIC DRUG CANDIDATE

3

TERTp_2F primer according to the manufacturer's recommendations. Briefly, a total of 2 μ L of the PCR product was submitted to the sequencing reaction with 10 pmoles of primer, and 4 μ L DTCS—Quick Start Kit (Beckman Coulter, Inc., USA). The reaction was performed for 30 cycles with denaturation at 94°C for 20 sec, annealing at 50°C for 20 sec, and extension at 60°C for 2 min. After dye removal, sequencing was performed on GenomeLab XP Genetic Analysis Systems (Beckman Coulter, Inc.).

If no hotspot mutation was detected, full-length PCR1 amplicon was sequenced using *TERTp_1F*, *TERTp_3R*, *TERTp_1R*, and *TERTp_2R* primers. In case no mutation was found in this region, a 776 bp product of distal *TERTp* (573–1349 bp upstream of transcription start site) was also amplified (PCR2) and sequenced using the above conditions with primer annealing temperature of 60°C and the forward (*TERTp_3F*) and reverse (*TERTp_4R*) primers. A graphical

Table S1.

Detection of BRAF and KRAS mutations

BRAF exon 15 (250 bp) and *KRAS* Exon2 (200 bp) were amplified and minisequenced using the primers and conditions described previously (Magnin et al., 2011). The products were analyzed by ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with GeneMapper v3.5 Software (Day et al., 2015).

Epigenetic drug library

Epigenetic drug library was purchased from Selleck Biochemicals (Munich, Germany). The library included 51 epigenetic drugs which consisted of 14 Aurora kinase inhibitors, 23 histone deacetylase (HDAC) inhibitors, 5 sirutin modifiers (activator and inhibitors), 3 hypoxia-inducible factor inhibitors, 2 DNA methyltransferase inhibitors, 2 histone methyltransferase inhibitors, an histone demethylase inhibitor, and a bromodomain inhibitor.

Drug treatments

For microtiter growth inhibition (GI) assays, WRO, KTC2, and TPC1 cells were trypsinized with 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco) at 37°C for 5–10 min and resuspended in growth medium. Cells were counted using a hemocytometer (Sigma-Aldrich Co. Ltd, Irvine, United Kingdom). For all drug treatments, cells were plated in triplicate at 7500 or 10,000 cells per well depending on the properties of cell lines (to obtain optimal confluency before drug treatment) in 96-well flat-bottomed microtiter plates (Costar, Cambridge, MA, USA). The cell suspension was inoculated into 96-well microtiter plates with a multichannel pipette (Finnpipette F1; Labsystems, Finland) in 200 μ L total volume.

For the initial drug screening, IC₅₀ values of all drugs were investigated from literature, and 51 drugs were classified in three sets based on treatment doses. TPC1, WRO, and KTC2 cells were incubated with two different doses (0.5 and 2.5 μ M, 1 and 5 μ M or 5 and 10 μ M) of epigenetic compounds 24 h postseeding. Effects of the drugs on cell growth were

evaluated by comparing cellular growth at day 1 (before treatment), day 3 (48 h post treatment), and day 4 (72 h posttreatment) using Cytoscan SRB Cell Cytotoxicity Assay (G Biosciences, St. Louis, MO, USA).

SRB Assay was used in all preceding cell growth analyses. For the recovery assay, cells were incubated with the most effective dose of preselected drugs for 72 h. After 72 h, culture media were removed, cells were washed twice with 1 \times PBS without calcium and magnesium (Gibco), and cultured in fresh media for 72 more hours. Cellular recovery was evaluated by comparing cellular growth at day 1, day 4 (72 h), and day 7 (72 h+72 h). For time response analysis, cells were incubated with 1 μ M CUDC-101 and PF-03814735 for 48 h, 72 h, 96 h, as well as RpT. For RpT, culture media were removed after 72 h, cells were washed twice with 1 \times PBS, and cultured in fresh drug suspension for 72 more hours. GI was evaluated by comparing cellular growth on day 1 with that of day 3 (48 h), day 4 (72 h), day 5 (96 h), and day 7 (RpT). For dose/response analysis, KTC2 and WRO cells were treated with increasing doses of PF-03814735 for 72 h as well as RpT. GI was evaluated by comparing cellular growth on day 1 with day 4 (72 h) and day 7 (RpT). For investigation of the effects of PF-03814735 on all thyroid cell lines, TPC1, KTC2, WRO, 8505C, BCPAP, KTC1, FRO, and Nthyori3.1 cells were incubated with 50 nM of PF-03814735 for 72 h as well as RpT. GI was evaluated by comparing cellular growth on day 1 with day 3 (72 h) and day 7 (RpT). For all drug treatments, DMSO was used as the vehicle control. Percentage of GI in DMSO-treated (control, X_c) and drug-treated (experimental, X_i) cells were compared.

Analysis of drug cytotoxicity by the SRB assay

At the end of drug treatments, GI was evaluated by a modified protocol of the SRB. Briefly, attached cells were washed twice with 1 \times PBS and fixed using the CytoScan SRB Cell Cytotoxicity Assay according to the manufacturer's protocol. Different from the manufacturer's instructions, SRB dye solution was diluted 1:80 for recording optimum absorbance values (between 0 and 1). Optical density at 565 nm was determined using a microplate spectrophotometer (BioTek ELx50). Percentage of GI was determined using the following equation: $GI\% = 100 \times [(X_i - X_0) / (X_0) \times 100]$ at which $X_i < X_0$, where X_0 is absorbance of untreated cells and $GI\% = 100 \times [(X_i - X_0) / (X_c - X_0) \times 100]$ at which $X_i \geq X_0$. When $X_i < X_0$ (suggesting GI), GI% was calculated by comparing X_i only with X₀. If, X_i \geq X₀ (indicating cellular growth), GI% was calculated by comparing X_i with X₀ as well as X_c.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Student t-test (Sidak/Bonferroni method) on GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). The difference between two values was considered significant if $p \leq 0.05$.

Other methodological details

NCI-60 Screening Methodology was retrieved on November 11, 2018 from the https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm

Results

Determination of *TERT* mutation profile

TERT of different TC cell lines were amplified and sequenced using two overlapping PCR products (Supplementary Fig. S1). Initially, the first amplicon (PCR1), which contained the hotspot mutations was sequenced. Accordingly, 6/7 of TC cell lines carried either C228T or C250T mutation (Table 1). FRO cells were shown to carry C250T mutation for the first time. Furthermore, WRO and Nhyori3.1 cells lacked the hotspot mutations. To investigate whether or not these cells harbor another promoter mutation, the full-length *TERT* was sequenced. To the best of our knowledge, the WRO and Nhyori3.1 cells were demonstrated for the first time to have a wild-type proximal as well as distal *TERT*. It was further shown that both cells carried a common *TERT* single nucleotide polymorphism (SNP; rs7712562) with no identified influence on *TERT* activity. WRO cells had two additional SNPs (rs3215401, rs2853669).

Because recurrent *TERT* mutations were shown to create novel ETS binding sites on *TERT* (Bell et al., 2015; Horn et al., 2013; Li et al., 2015; Mancini et al., 2018) with a critical epigenetic effect on *TERT* activity, candidate epigenetic drugs were anticipated to target TC cells harboring *TERT* mutation. High co-occurrence of *TERT* and *BRAF*^{V600E} mutations were reported in aggressive forms of TC, such as poorly differentiated (PDT) and anaplastic (ATC) (Gandolfi et al., 2015; Hahn et al., 2017; Jin et al., 2016; Kim et al., 2016; Landa et al., 2016; Liu et al., 2014; Oishi et al., 2017; Ren et al., 2018; Shen et al., 2017; Shi et al., 2015; Sohn et al., 2016; Song et al., 2016; Vinagre et al., 2013; Xing et al., 2014). These reports prompted us to compare effects of an epigenetic drug library on cells harboring i. wild-type *TERT*, ii. mutant *TERT*, and iii. mutant *TERT*/*BRAF* (double mutant). *BRAF* mutation status of TC cell lines were previously investigated (Cahill et al., 2007; Landa et al., 2013; Ricarte-Filho et al., 2009) and conflicting results are present for WRO and FRO cells (Namba et al., 2003; Piscazzi et al., 2012; Ricarte-Filho et al., 2009; Saiselet et al., 2012; Schweppe et al., 2008). Accordingly, *BRAF*^{V600E} and *KRAS* codon 12/13 mutation status of FRO and WRO cells were investigated and anaplastic FRO cells were shown to carry *BRAF*^{V600E} mutation, whereas follicular WRO cells had wild-type genotype (Table 1). Neither FRO nor WRO cells carried *KRAS* codon 12/13 mutation.

Determination of KTC2-specific epigenetic drugs

To compare the effects of epigenetic drugs on growth of cells harboring i. wild-type *TERT*, ii. mutant *TERT*, and iii. mutant *TERT* and *BRAF* (double mutant), cells were treated with an epigenetic drug library. TPC1 (mutant), KTC2 (double mutant), and WRO (wild-type) cells were incubated with two doses. The effects of drugs on GI was evaluated by comparing cellular growth before (day 1) and after (48h—day 3 and 72h—day 4) treatment. TPC1 is the only cell line carrying *TERT* mutation along with RET/papillary TC (PTC) rearrangement but lacking the *BRAF*^{V600E} mutation (Jossart et al., 1995; Meireles et al., 2007). However, the majority of TC cells (5/8) carry both the *TERT* and *BRAF*^{V600E} mutations (Table 1). Therefore, drugs more potent on double-mutant KTC2 cells and least effective on WRO cells were investigated. Overall, seven drugs had cytotoxic effects on all cell lines either at single or both doses.

Out of the remaining 44 drugs, 12 drugs had specific effects on double-mutant KTC2 cells. Next, 3/12 drugs were eliminated as GI% of KTC2 cells was lower than 50%. One drug (1/12) was not used in further studies because it was not dose dependent. Finally, 8 drugs were selected as promising candidate drugs that specifically target KTC2 cells (Fig. 1A).

Details regarding the effects of these drugs are shown in Supplementary Table S2. The majority of these drugs (5/8) were HDAC inhibitors whereas 2/8 and 1/8 were Aurora kinase inhibitors and an activator of NAD⁺-dependent protein deacetylase (*SIRT1*), respectively. All selected drugs were more effective at 72 h. Highest drug cytotoxicity on KTC2 cells was detected following treatment with GSK1070916 and Belinostat, where cell growth was inhibited by greater than 80% (Fig. 1A). Interestingly, at higher drug concentrations growth inhibitory properties of Trichostatin A, Belinostat, and Pracinostat on TPC1 and/or WRO cells were decreased, possibly due to the inactivation of tumor suppressor genes or other growth inhibitory targets.

To investigate if growth inhibitory effects of the selected drugs continue after removal of the drug from the culture, KTC2, TPC1, and WRO cells were incubated with the selected drugs for 72 h first, and then with fresh media for additional 72 h. The effect of drug removal on GI% was determined by analyzing recovery after 72h+72h. After incubation with CUDC-101 and PF-03814735, cytotoxic effects of the drugs continued and less than 30% growth of KTC2 cells was recovered (Fig. 1B). In contrast, growth of TPC1 and WRO cells recovered by more than 50% and 90%, respectively. Since growth of KTC2 cells was recovered by more than 50% after incubation with the other six drugs (data not shown), they were not used in further experiments.

Determination of the optimal treatment time

Because CUDC-101 and PF-03814735 were more effective at 72 h; WRO, TPC1, and KTC2 cells were incubated with the selected drugs at the effective doses for 48 h, 72 h, and 96 h. In addition, as growth of KTC2 cells were not recovered after culturing with fresh media (RpT), the effects of RpT on GI% were also investigated. Accordingly, following 72 h treatment, culture media were removed and cells were incubated with fresh drugs for 72 more hours (Fig. 2A,B). The effect of drugs on GI% at 72 h were decreased at 96 h suggesting drug inactivation after 72 h. When compared with 72 h treatment, RpT of CUDC-101 had the greatest effect on all cell types (Fig. 2A) with the greatest impact on KTC2 cells, where growth was inhibited by more than 80%. Under similar conditions, growth of WRO and TPC1 cells was inhibited by ~50% (Fig. 2A). In contrast, RpT of PF-03814735 was more effective on cells with *TERT* mutation (KTC2 and TPC1) but not in wild-type *TERT* (WRO) (Fig. 2B). The effect of PF-03814735 in RpT was highly detrimental on KTC2 cells with ~80% GI, whereas it was lower than 50% for both TPC1 and WRO cells. Interestingly, growth of WRO cells was increased after RpT, suggesting that the growth inhibitory effects of PF-03814735 were highly specific for KTC2 cells, making PF-03814735 a more potent inhibitor.

Determination of the optimal dose of PF-03814735

To determine the optimum dose of PF-03814735 for GI of KTC2 (but not WRO), WRO and KTC2 cells were treated

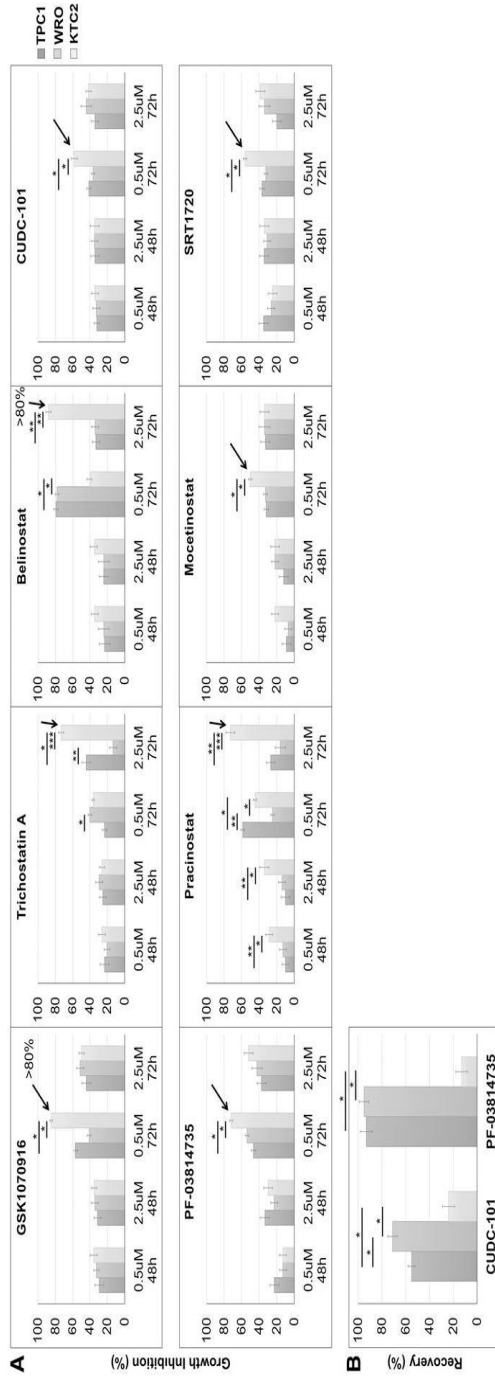


FIG. 1. Eight epigenetic drugs effectively limit growth of KTC2 cells. (A) KTC2, TPC1, and WRO cells were incubated with two different doses of an epigenetic drug library for 48 and 72 h and the cytotoxicity of drugs were determined by the SRB assay. Following data analysis, drugs with specific growth inhibitory effects on KTC2 cells were selected. Optimum dose and time of selected drugs are indicated with *arrows*. GSK1070916 and Belinostat inhibited cell growth by more than 80%. Growth inhibitory properties of Trichostatin A, Belinostat, and Pracinostat on WRO and/or TPC1 cells but not KTC2 cells were decreased upon incubation with the higher dose of the drugs. (B) KTC2, TPC1, and WRO cells were incubated with the selected drugs for 72 h, culture supernatant was replaced with fresh media and after 72 more hours, cellular cytotoxicity was evaluated by the SRB assay. Recovery was determined by normalizing % GI after addition of media (72h+72h) with respect to % GI at 72h. After 72 h incubation with CUDC-101 or PF-03814735, only the recovery of KTC2 cells was lower than 30%. Statistically significant differences are indicated with one or more *asterisk(s)* ($^{*}p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$). GI, growth inhibition; SRB, sulforhodamine B.

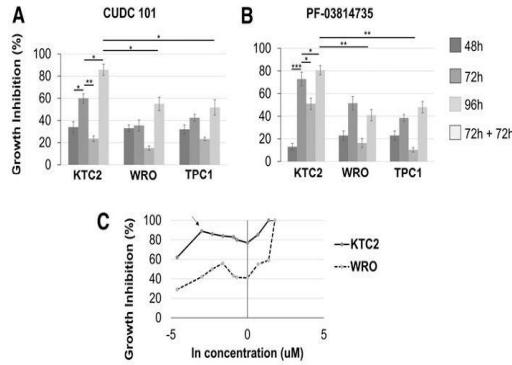


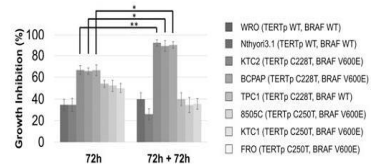
FIG. 2. RpT with PF-03814735 specifically inhibits growth of TC cells harboring *TERT*_p^{C228T} mutation. WRO, TPC1, and KTC2 cells were incubated with 1 µM CUDC-101 (A) or PF-03814735 (B) for 48 h, 72 h, 96 h as well as 72 h+72 h (RpT) and the effects of drug treatments on cell growth were evaluated by the SRB assay. RpT with both drugs was more effective than treatment for only 72 h for KTC2 cells. Statistically significant differences are indicated with one or more asterisk(s) (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001). (C) KTC2 and WRO cells were incubated with increasing doses of PF-03814735 for RpT. Due to nonlinear (sigmoidal) relationship between drug concentration and percent GI, natural logarithm (ln) of the concentrations were calculated and linearized versions of the concentrations were plotted on the horizontal axis. Arrow shows the most effective dose for targeting KTC2 cells. RpT, repeated treatment; TC, thyroid cancer; *TERT*_p, telomerase reverse transcriptase gene promoter.

with increasing doses (0.01–6 µM) for RpT (Fig. 2C). The most effective drug concentration was anticipated to be the dose effective on KTC2 but not on WRO cells. At nanomolar range, GI% of KTC2 cells reached its maximum value (89%) after incubation with 50 nM of PF-03814735, which is 5% of the dose used for determination of optimal treatment time. GI% of WRO cells at this concentration was lower than 50%, indicating that the drug is more potent on KTC2 cells. Following incubation with 4 µM of the drug, GI% of KTC2 cells reached 100%. At this dose, GI% of WRO exceeded 50% reaching its optimum value, suggesting that the specificity of the drug decreases at higher doses. Furthermore, PF-03814735 is cytotoxic at 6 µM since GI% for both cell types reached 100%. Overall, it was shown that 50 nM PF-

03814735 is the optimum dose for targeting KTC2 but not WRO cells.

Confirmation of the cytotoxic effects of PF-03814735 in all thyroid cell lines

To confirm the cytotoxic effects of PF-03814735 on all TC cell lines carrying *TERT*_p mutation, eight thyroid cell lines (cancer cell lines as well as immortalized cells) were treated with 50 nM PF-03814735 for 72 h and RpT (Fig. 2D). Consistent with the previous results, RpT of PF-03814735 was the most effective treatment on 3/8 cell lines (BCPAP, KTC2, and TPC1) harboring *TERT*_p^{C228T} mutation. Importantly, GI% of cells at RpT was significantly higher than GI% at 72 h. Because 1/3 of cell lines carrying *TERT*_p^{C228T} lacked *BRAF* mutation and all three cell lines had similar GI% (>80%), these findings suggest that GI of PF-03814735 is dependent on the presence of *TERT*_p^{C228T} but not *BRAF* mutation. Interestingly, greatest GI of PF-03814735 on cell lines carrying *TERT*_p^{C250T} (3/8) mutation was observed at 72 h (<60%), which was still lower than GI% observed after RpT of cells with *TERT*_p^{C228T} (>80%). Importantly, no statistically significant difference was observed between 72 h and RpT of *TERT*_p^{C250T} cells. Moreover, at RpT, GI% of cells were not statistically different (*p* > 0.05) between wild-type and *TERT*_p^{C250T}, suggesting that RpT is not an effective treatment option for *TERT*_p^{C250T} cells.



PF-03814735 Specifically Targets Thyroid Cells Carrying *TERT*_p^{C228T} Mutation. Eight thyroid cell lines were incubated with 50 nM of PF-03814735 for 72 h as well as RpT and percent GI was evaluated by the SRB assay. The greatest GI effect (>80%) of the drug was at 72 h+72 h on cells carrying C228T mutation, irrespective of *BRAF* mutation status. In contrast, GI of cells harboring C250T mutation were slightly greater than 60% at 72 h and decreased after RpT. Statistically significant differences are indicated with one or more asterisk(s) (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

Discussion

These new findings offer specific guidance on dose and time course selection to design novel therapeutic interventions against TC using PF-03814735, and specifically target cells carrying the *TERT*_p^{C228T} mutation. In a larger context of drug discovery science, these findings inform new strategies

PF-03814735: AN EPIGENETIC DRUG CANDIDATE

7

to forecast optimal treatment regimens for TC, particularly with Aurora kinase inhibitors and in ways guided by epigenetic drug design.

Recent reports show high co-occurrence of *TERT*p and *BRAF*^{V600E} mutations in aggressive forms of TC such as PDC and ATC (Gandolfi et al., 2015; Hahn et al., 2017; Jin et al., 2016; Kim et al., 2016; Landa et al., 2016; Liu et al., 2014; Oishi et al., 2017; Ren et al., 2018; Shen et al., 2017; Shi et al., 2015; Sohn et al., 2016; Song et al., 2016; Vinagre et al., 2013; Xing et al., 2014). These studies prompted us to compare the effects of an epigenetic drug library on cells harboring i. wild-type *TERT*p (WRO), ii. mutant *TERT*p (TPC1), and iii. mutant *TERT*p/*BRAF* (KTC2). *BRAF* mutation status of TC cell lines was previously investigated with conflicting results for WRO and FRO cells (Namba et al., 2003; Piscazzi et al., 2012; Ricarte-Filho et al., 2009; Saiselet et al., 2012; Schweppe et al., 2008). Therefore, *BRAF*^{V600E} and *KRAS* codon 12/13 mutation status were checked and anaplastic FRO cells (but not follicular WRO cells) were shown to carry the *BRAF*^{V600E} mutation. Neither FRO nor WRO cells carried *KRAS* mutation at codon 12/13. Activating mutations in *BRAF* and *RAS* genes are detected in the majority of PTC (Kimura et al., 2003; Soares et al., 2003) and follicular TC (FTC) (Nikiforova et al., 2003) cases, respectively. It is therefore interesting that WRO cells (FTC) lack either *BRAF* or *KRAS* mutations. According to a recent report (Song et al., 2017), no mutation was detected at codon 12/13 of *KRAS* in FTCs. In contrast, highest frequency of *RAS* mutations was detected at codon 61 of *NRAS* and *HRAS*. Therefore, WRO cells may possibly harbor these mutations.

In this study, *TERT*p mutation profile of eight thyroid cell lines were determined, where Nthyori3.1 was immortalized normal thyroid cells and the rest were derived from PTC, FTC, or more aggressive ATC. Consistent with literature, TPC1, KTC2, and BCPAP cells harbored C228T mutation, whereas KTC1, 8505C, and FRO carried the less common C250T mutation (Landa et al., 2013; Liu et al., 2013). Neither of the hotspot mutations was detected in WRO or Nthyori3.1 cells. Liu et al. (2013) also showed that WRO cells were wild-type for *TERT*p. Although many studies reported that C228T and C250T are the most frequently observed hotspot mutations within the *TERT*p in TC (Liu and Xing, 2016), *TERT*p mutations are not restricted to these two sites. Single point mutations as well as double-strand breaks at different locations on the *TERT*p were found to be common in melanomas (Egberts et al., 2014; Hayward et al., 2017; Heidenreich et al., 2014; Hom et al., 2013).

In addition, rare substitutions were detected in bladder cancers (Borah et al., 2015; Descotes et al., 2017; Ward et al., 2016). Accordingly, to investigate the presence of possible novel *TERT*p mutations and/or SNPs, the full-length *TERT*p of WRO and Nthyori3.1 cells were amplified using two overlapping PCR products and sequenced. Unexpectedly, no novel hotspot mutation was detected in either cell line. Current studies on TCs demonstrated that *TERT*p mutation is detected frequently in advanced TCs (Liu and Xing, 2016). Therefore, it is reasonable that more differentiated WRO (FTC) and Nthyori3.1 (immortalized) cells lacked any *TERT*p mutation.

A common SNP (rs712562) was identified at *TERT*p of both WRO and Nthyori3.1 cells, with no reported effect on *TERT* activity. It is unclear whether the presence of this variant provides a growth advantage for these cells. Furthermore,

WRO cells carried two additional SNPs (rs3215401, rs2853669) where the latter SNP was shown to destroy an *ETS2*-binding site in non-small cell lung cancer (Hsu et al., 2006). Xu et al. (2008) also demonstrated that rs2853669 blocks not only *ETS2* but also *MYC* binding to the *TERT*p in breast cancer cells, causing decreased *TERT* mRNA expression. In contrast, no association was reported between the presence of *TERT*p mutation and survival of TC cells (George et al., 2015; Muzza et al., 2015). The presence of rs2853669 (as detected for WRO cells in this study) was shown to reduce telomerase activity, increase telomere length, and enhance survival rate in wild-type *TERT*p (Spiegel-Kreinecker et al., 2015). In contrast, highly aggressive *TERT*p mutant tumors had higher telomerase activity as well as short and uniform telomeres (Mason and Perdigones, 2013). Because WRO cells are not very aggressive and lack recurrent *TERT*p mutations that increase telomerase activity, it is plausible that this variant causes WRO cells to express even lower telomerase activity and reduces their tumorigenic potential.

In this study, TPC1 is the only cell type carrying *TERT*p mutation along with *RET*/*PTC1* rearrangement, lacking *BRAF*^{V600E} mutation. Since the majority of TC cells (5/8) carry both *TERT*p and *BRAF*^{V600E} mutations, drugs most effective on KTC2 (double mutant) and least effective on WRO (*TERT*p WT) were selected. For the initial screening, TC cell lines harboring mutant *TERT*p (TPC1), wild-type *TERT*p (WRO), and double mutant (KTC2) were treated with an epigenetic drug library and KTC2-specific drugs were selected. The majority of the selected drugs (5/8) were HDAC inhibitors, whereas 2/8 were Aurora kinase inhibitors, known to be involved in cell division, and 1/8 was an activator of NAD⁺ dependent protein deacetylase (*SIRT1*) which has critical roles in regulating cell metabolism. Cytotoxicity of all the selected drugs was higher at 72 h, which is reasonable since time is needed for cells to complete epigenetic modifications. Some of the drugs were more effective at higher doses, whereas others were more effective at lower doses. Because epigenetic drugs may affect expression of both tumor suppressors and growth-promoting genes, it is plausible that some drugs inhibit tumor suppressors and induce growth-promoting effects at higher doses.

PF-03814735 and CUDC-101 were determined to specifically target KTC2 cells. The cytotoxic effect of both drugs, not recovering even after growth in the presence of fresh media, was maximal at RpT and decreased at 96 h. Reduced cytotoxicity at 96 h was anticipated to be related to drug inactivation. Following RpT of CUDC-101, GI% of WRO cells was higher than 50%. Because it has been proposed to find an epigenetic drug specifically targeting cells with *TERT*p mutation, CUDC-101 was eliminated from the proceeding assays. In contrast, after treatment with PF-03814735, GI% was higher and lower than 50% for KTC2 and WRO cells, respectively. Furthermore, WRO cells had lower GI% at RpT, suggesting that growth-promoting gene(s) may be activated in these cells following RpT, increasing their resistance to PF-03814735.

After determination of optimum dose, all cell lines were incubated with PF-03814735 for 72 h and RpT. Some recent reports demonstrated that tumor aggressiveness is higher in patients exhibiting double mutations (*TERT*p mutation + *BRAF*^{V600E}) (Gandolfi et al., 2015; Hahn et al., 2017; Jin et al., 2016; Kim et al., 2016; Landa et al., 2013, 2016; Liu et al., 2014; Oishi et al., 2017; Ren et al., 2018; Shen et al.,

2017; Shi et al., 2015; Sohn et al., 2016; Song et al., 2016; Vinagre et al., 2013; Xing et al., 2014), whereas others showed that the presence of only *TERTp* mutation is critical for recurrence and distant metastatic potential (George et al., 2015; Melo et al., 2017; Muzza et al., 2015; Sun et al., 2016; Xu et al., 2017). In this study, the effectiveness of PF-03814735 was shown to be independent of *BRAF* mutation but dependent on *TERTp*^{C228T}, which is consistent with the studies showing an association of *TERTp* mutation with tumor aggressiveness.

Importantly, at both time points, PF-03814735 was more effective on *TERTp*^{C228T} than *TERTp*^{C250T} cells, possibly due to the different action mechanisms of these mutations (Bae et al., 2016; Bell et al., 2015; Gandolfi et al., 2015; Horn et al., 2013; Huang et al., 2013; Jin et al., 2016; Landa et al., 2013, 2016; Li et al., 2015; Liu et al., 2014; Mancini et al., 2018; Shi et al., 2015; Song et al., 2016). Briefly, C228T mutation was shown to create a novel ETS-binding site (Bell et al., 2015; Horn et al., 2013; Mancini et al., 2018; Song et al., 2019; Vallarelli et al., 2016), whereas noncanonical NF- κ B signaling is also required for driving TERT transcription for C250T mutation (Li et al., 2015). Cytotoxicity of PF-03814735 on cell lines (3/8) carrying C250T mutation reached its optimum value at 72 h and decreased after RpT, suggesting an increased resistance of TC cells against this drug. It is noteworthy that, WRO cells were slightly more sensitive to RpT (40% at RpT vs. 32% at 72 h). In contrast, GI% of Nthyori3.1 cells decreased after RpT, suggesting that immortalized thyroid cells may be more resistant to the effects of PF-03814735 than WRO.

The impact of PF-03814735 therapy on *TERT* mRNA expression level was also examined in our laboratory by quantitative RT-PCR (Supplementary Fig. S2). As a result, *TERT* mRNA of KTC2 cells did not change following RpT but increased by four-fold after drug recovery (72-72R). In contrast, *TERT* mRNA of WRO cells decreased by 0.8-fold after both RpT and 72-72R. These findings support specific growth inhibitory effects of PF-03814735 on KTC2 cells, which should be validated in future studies.

PF-03814735 is an Aurora kinase A and B inhibitor, which functions as a modulator for epigenetic events and an inhibitor of cell proliferation. Incubation of breast cancer cells with PF-03814735 was shown to block histone H3 phosphorylation along with inhibition of cytokinesis and induction of apoptosis (Jani et al., 2010). In our study, PF-03814735 was shown to specifically target TC cells carrying C228T mutation (irrespective of *BRAF* mutation status). Future studies are required to understand whether PF-03814735 is also effective on patient tumor samples, as well as mouse xenograft models of human TC.

Although PF-03814735 was shown to be specific for TCs with *TERTp*^{C228T}, future studies targeting other cancer types, such as melanoma, glioblastoma, and bladder cancer harboring high frequency of *TERTp* mutations (Huang et al., 2013; Vinagre et al., 2013) are required. In our study, CUDC-101 was also detected as a promising target for TC cells harboring *TERTp*^{C228T}, but was not investigated further since KTC2 and WRO cells exhibited greater than 50% GI after treatment.

Drug resistance is a common problem in cancer treatment and targeted therapy using therapeutic drug combinations shows promising results for curing cancers with a different origin (Holoohan et al., 2014). CUDC-101, a multitargeted

inhibitor of HDAC/HER2/EGFR, was shown to inhibit cell proliferation (Cai et al., 2010; Lai et al., 2010) and induce apoptosis (Lai et al., 2010) in several cancer cell lines. Furthermore, it has been shown to promote tumor regression in different xenograft models (Cai et al., 2010; Lai et al., 2010). Since the targets of PF-03814735 and CUDC-101 are different, the possible synergistic effect of this drug combination on GI may be investigated in proceeding scientific researches.

Conclusions

In this study, *TERTp* and secondary activating mutation profiles of TC cell lines were determined. Three representative cell lines (KTC2, TPC1, WRO) were screened with an epigenetic drug library and a potential drug (PF-03814735) was identified that targets cells harboring *TERTp*^{C228T}, independent of *BRAF* mutation status. This drug was less effective on cells harboring *TERTp*^{C250T}. Moreover, immortalized thyroid and TC cells with wild-type *TERTp* were resistant against the cytotoxic effect of PF-03814735. Overall, our results suggest that new optimal therapy regimens based on Aurora kinase inhibitors offer promise for applying epigenetic drug design and development for TC treatment.

Acknowledgments

All authors made significant intellectual contribution to the study and drafting/revising the article. The authors are also grateful for the constructive comments of referees and the editor.

Author Disclosure Statement

The authors declare they have no competing financial interests.

Funding Information

This work was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK), cofunded by Marie Curie Actions under FP7, project no. 114C029 and Acibadem Mehmet Ali Aydinlar University Scientific Research Project ABAPKO-2018-64 (to S.D.-A.).

Supplementary Material

Supplementary Figure S1
Supplementary Figure S2
Supplementary Table S1
Supplementary Table S2

References

- Bae JS, Kim Y, Jeon S, et al. (2016). Clinical utility of TERT promoter mutations and ALK rearrangement in thyroid cancer patients with a high prevalence of the BRAF V600E mutation. *Diagn Pathol* 11, 21.
- Bell RJ, Rube HT, Kreig A, et al. (2015). Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* 348, 1036–1039.
- Borah S, Xi L, Zaug AJ, et al. (2015). Cancer. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science* 347, 1006–1010.
- Cahill S, Smyth P, Denning K, et al. (2007). Effect of BRAFV600E mutation on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer* 6, 21.

OMICS: A Journal of Integrative Biology - Decision on Manuscript ID OMI-2019-0050.R2

17-Aug-2019

Dear Professor Yakicier:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Towards In Vitro Epigenetic Drug Design for Thyroid Cancer: The Promise of PF-03814735, an Aurora Kinase Inhibitor" in its current form for publication in OMICS: A Journal of Integrative Biology.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

Your paper can now be cited as OMICS: A Journal of Integrative Biology 2019 (in press).

All authors will receive a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement.

**The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright. The corresponding author will receive notification when all copyright forms have been submitted.

Consider Liebert Open Option to have your paper made free online immediately upon publication for a one-time fee. Benefits of Liebert Open Option include: accelerated e-pub ahead of print publication; email message highlighting the article; increased readers, citations and downloads; an identifying icon in the table of contents showing that the paper is permanently available for free to all readers; and immediate deposition into PubMed Central®. Please contact OpenAccess@liebertpub.com, or call (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf) to your Librarian.

Thank you for your excellent contribution. On behalf of the Editors of OMICS: A Journal of Integrative Biology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

With best regards,
Vural Özdemir, MD, PhD, DABCP
Editor-in-Chief, OMICS: A Journal of Integrative Biology

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sevim	Soyadı	Dalva Aydemir
Doğum Yeri	İzmir	Doğum Tarihi	22/04/1986
Uyruğu	T.C.	Telefonu	
E-mail	sevim.dalva@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Purdue Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü	Aralık 2011
Lisans	Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	Mayıs 2007
Lise	TED Ankara Koleji	Haziran 2003

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
1.	Moleküler Biyolog	VKV Amerikan Hastanesi, Nükleer Tıp ve Moleküler Görüntüleme Bölümü	2017-2018
2.	Proje Yürütücüsü	ACIBADEM Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2014-2016
3.	Araştırma Teknolojisti 3	Robert H. Lurie Kapsamlı Kanser Merkezi	2013
4.	Araştırma Teknolojisti 1	Robert H. Lurie Kapsamlı Kanser Merkezi	2012
5.	ÖğRETİM Elemanı	Purdue Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü	2007-2011
6.	Lisans Öğrencisi (senyör proje)	Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2006-2007
7.	Yaz Stajyeri	Tel Aviv Üniversitesi, Hücre Araştırmaları ve İmmünoloji Bölümü	2006
8.	Yaz Stajyeri	Georg-August Üniversitesi, Mikrobiyoloji ve Genetik Enstitüsü	2005

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Almanca	Orta	Orta	Orta
İspanyolca	Zayıf	Zayıf	Zayıf

Yabancı Dil Sınav Notu									
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL İBT	TO EFL PBT	TOEF L CBT	F C E	C A E	C P E	DİĞER
	85/100 (2016)		105/120 (2014) 106/120 (2006)						

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2014)	71,89803	71,47034	63,74593
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office 2010 Word	Çok iyi
Microsoft Office 2010 Excel	Çok iyi
Microsoft Office 2010 Powerpoint	Çok iyi
EndNote	Çok iyi
GraphPad Prism	İyi
Adobe Photoshop	İyi

Uluslararası Yayınlar

	Yayın
1.	Dalva-Aydemir, S., Akyerli, C.B., Yüksel, S.K., Keskin, H & Yakicier, M.C. (2019-basım aşamasında). Towards In Vitro Epigenetic Drug Design for Thyroid Cancer: The Promise of PF-03814735, an Aurora Kinase Inhibitor.
2.	Oktay, Y., Ağırbaşı, D., Dalva-Aydemir, S., Akyerli C.B., Muftuoğlu, M., & Yakicier, M.C. (2015) Chapter 19- Medical Genetics. M. Dündar ve ark. (Editörler), <i>Current Applications of Biotechnology</i> (pp 299-317) Kayseri, Türkiye: Kayseri Üniversitesi Baskı (Erciyes Üniversitesi Yayınları; No. 199)
3.	Dalva-Aydemir, S., Bajpai, R., Martinez, M., Adekola, K.U.A., Kandela, I., Wei, C., Singhai, S., Koblinski, J.E., Raje N., Rosen, S.T. & Shanmugam, M. (2015). Targeting the Metabolic Plasticity of Multiple Myeloma with FDA-Approved Ritonavir and Metformin. <i>Clin Cancer Research</i> 21 (5); 1161–71.
4.	Adekola, K.U.A., Dalva-Aydemir, S., Rosen, S.T. & Shanmugam, M. (2015). Investigating and targeting chronic lymphocytic leukemia metabolism with the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and metformin. <i>Leukemia and Lymphoma</i> 56 (2): 450–459.
5.	Cheng, J.C., Coarfa, C., McBrayer, S.K., Dalva-Aydemir, S., Gunaratne, P.H., Rosen, S.T. & Shanmugam, M. (2013). AS160 Variant 2 Expression Enables Constitutive GLUT4 Plasma Membrane Localization and Elevated Glucose Consumption in Multiple Myeloma. <i>Cancer and Metabolism</i> 1:14.

Ulusal ve Uluslararası Bildiriler

	Bildiri (Poster)
1.	Dalva-Aydemir, S., Çirimi, B., Erdemgil, Y., Serteser, M., Ünsal, İ., Özpınar, A. & Serdar, M. (2015). Anemiler Hemoglobin A1c (HbA1c) Düzeylerini Etkiler Mi? Bir Veri Madenciliği Çalışması. <i>XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Susesi Luxury Resort, Antalya.</i>
2.	Dalva-Aydemir, S., Adekola K.U.A., Martinez, M., Rosen, S.T. & Shanmugam, M. (03/2013). Targeting Metabolic Plasticity of Myeloma with FDA Approved Ritonavir and Metformin. <i>Uluslararası Miyelom Çalıştayı, Kyoto, JAPONYA.</i>
3.	Dalva-Aydemir, S., Adekola, K.U.A., Martinez, M., Chandel, N., Rosen, S.T. & Shanmugam, M. (02/2013) Targeting Metabolic Plasticity of Myeloma with FDA Approved Ritonavir and Metformin via Chemical Synthetic Lethality. <i>Keystone Metabolizma Toplantısı, Denver, A. B. D.</i>

Ulusal ve Uluslararası Ödüller

	Ödülün Adı	Destek Veren Kurum	Destek	Süre (Yıl-Yıl)
1.	TÜBİTAK 2236 - Uluslararası Deneyimli Araştırmacı Dolaşım Programı Bursu	TÜBİTAK ve AB 7. Çerçeve Programı, Marie Curie Aksiyon CO-FUND	€114,400	2014-2016
2.	Tam Başarı Bursu	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilkent Üniversitesi	Lisans eğitimi	2004-2007

Eğitim Tecrübesi

	Görevi	Kurum	Verilen Eğitim	Süre (Yıl-Yıl)
1.	Okutman	ACIBADEM Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü	BES 207-Tıbbi Biyoloji	2015-2016
2.	Öğretim Elemanı	Purdue Üniversitesi, Biyoloji Bilimleri Bölümü	BIOL 232- Biyoloji Laboratuvarı III- Hücre Yapısı ve Fonksiyonu (laboratuvar)	2007-2008
3.	Öğretim Elemanı	Purdue Üniversitesi, Biyoloji Bilimleri Bölümü	BIOL 242- Biyoloji Laboratuvarı IV- Genetik ve Moleküler Biyoloji (laboratuvar)	2008-2009
4.	Öğretim Elemanı	Purdue Üniversitesi, Biyoloji Bilimleri Bölümü	BIOL 221- Mikrobiyoloji'ye Giriş (laboratuvar ve sınav okuma)	2009-2011
5.	Bire-bir laboratuvar teknikleri eğitimi	Purdue Üniversitesi, Biyoloji Bilimleri Bölümü	Bakteri kültürü ve DH5 α bakteri suşundan protein purifikasyonu	2010
6.	Bire-bir laboratuvar teknikleri eğitimi	Robert H. Lurie Kapsamlı Kanser Merkezi	Hücre Kültürü (MM hücre hatları)	2012-2013

Aktiviteler

Üyelik	Görev	Görevin Detayları
Purdue Üniversitesi Biyolojik Bilimler Lisansüstü Öğrenciler Kurulu (BGSC) Üyesi	2010 BGSC Kongresi organizatörü	Kongrenin organizasyonu Purdue Üniversitesi mezununun kongreye misafir konuşmacı olarak davet edilmesi