

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

**PROGESTERONUN ANTI-PROLİFERATİF ve APOPTOTİK
ETKİSİNİN U87MG VE A172 GLİOBLASTOMA
HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK ANALİZİ**

MUAZZEZ CEREN YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

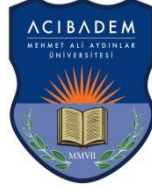
BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEZLİ

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN

PROF. DR. AYSEL ÖZPINAR

İSTANBUL – 2018



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

**PROGESTERONUN ANTI-PROLİFERATİF ve APOPTOTİK
ETKİSİNİN U87MG VE A172 GLİOBLASTOMA
HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI PROTEOMİK ANALİZİ**

MUAZZEZ CEREN YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEZLİ

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

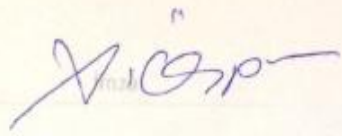



DANIŞMAN

PROF. DR. AYSEL ÖZPINAR

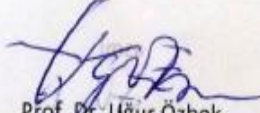
İSTANBUL – 2018

Anabilim Dalı: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Tez Başlığı: PROGESTERONUN ANTI-PROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİSİNİN
U87MG VE A172 GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE KARŞILAŞTIRMALI
PROTEOMİK ANALİZİ
Öğrencinin Adı-Soyadı: Muazzez Ceren Yılmaz
Savunma Sınavı Tarihi: 07 / 06 / 2018

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

| | | |
|---------------|---|---|
| Jüri Başkanı | Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi |  |
| Tez Danışmanı | Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi |  |
| Üye | Dr. Öğr. Üyesi Saime BATIREL Marmara Üniversitesi |  |
| Üye | Yasemin UÇAL Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi |  |

Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez yukarıdaki jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Uğur Özbek

Enstitü Müdürü

İTHAF

Değerli aileme ve biricik yeğenim Doğa Yılmaz'a ithaf ediyorum.



İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| BEYAN | ii |
| ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR..... | iii |
| KISALTMALAR ve SİMGELER..... | iv |
| TABLolar LİSTESİ..... | vi |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | vii |
| EKLER LİSTESİ | ix |
| ÖZET | 1 |
| SUMMARY | 2 |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ | 3 |
| 2.GENEL BİLGİLER..... | 6 |
| 2.1.Progesteron | 6 |
| 2.1.1.Etki mekanizması..... | 8 |
| 2.1.1.1.Genomik etkiler | 8 |
| 2.1.1.2.Genomik olmayan etkiler | 10 |
| 2.1.2.Progesteronun uterus ve ovaryumdaki faaliyeti | 12 |
| 2.1.3.Progesteronun meme dokusunda faaliyeti..... | 12 |
| 2.1.4.Progesteronun beyine etkisi | 14 |
| 2.2.Progesteron ve Kanseri İlişkisi..... | 15 |
| 2.2.1.Endometriyal kanseri ve progesteron | 16 |
| 2.2.2.Meme kanseri ve progesterone | 18 |
| 2.2.3.Beyin kanseri ve progesterone | 19 |
| 2.3.Glioblastoma Multiforme | 20 |
| 2.4.Glioblastoma ve Progesteron İlişkisi | 21 |
| 2.5.Proteomik Yaklaşımlar | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5.1.İki boyutlu jel elektroforezi..... | 23 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM..... | 25 |
| 3.1.Gereç..... | 25 |
| 3.3.Yöntem | 28 |
| 3.3.1.Araştırma düzeni..... | 28 |
| 3.3.2.Hücre kültürü çalışmaları | 28 |
| 3.3.2.1.Hücrelerin uygun koşullarda büyütülmesi | 29 |
| 3.3.2.2.Hücrelerin büyütülmesi, pasajlanması ve sayılması | 29 |
| 3.3.2.3.xCELLigence Deneyleeri..... | 30 |
| 3.3.3. <i>In vitro</i> çalışma dizaynı | 32 |
| 3.3.3.1.Hücre kültürü ve ilaç uygulaması..... | 32 |
| 3.3.4.Proteomik çalışmalar | 32 |
| 3.3.4.1.Hücrelerin 2D analizi için hazırlanması | 32 |
| 3.3.4.2.Protein konsantrasyonu ölçme yöntemi..... | 32 |
| 3.3.4.3.İki boyutlu jel elektroforezi..... | 33 |
| 4.BULGULAR | 38 |
| 4.1.xCELLigence Bulguları..... | 38 |
| 4.2.İki Boyutlu Jel Elektroforezi Bulguları | 39 |
| 4.3.Tanımlanan proteinlerin Gene Ontology veri bankasında analizi..... | 46 |
| 4.4. <i>In silico</i> Biyobelirteç Tespiti..... | 47 |
| 4.4.1.Nükleofosmin (NPM1) proteini yolak analizleri | 48 |
| 5.TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 50 |
| 6.KAYNAKLAR..... | 53 |
| 7.EKLER..... | 63 |
| 8.ÖZGEÇMİŞ..... | 69 |

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.

24.05.2018

Muazzez Ceren YILMAZ

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Günümüzde kanser araştırmaları, artan hasta profili ile bilimsel araştırmaların en önemli parçasını oluşturmaktadır. Kemoterapötik ilaçların yan etkileri kanser hastalarının tedavisindeki en zor kısımlardan biridir. Yeni ve daha az yan etkili tedavi stratejilerinin gerekliliği bu aşamada çok önem kazanmaktadır. Bu çalışmada; vücudumuzda bulunan ve normal hücrelere yan etkisi olmayan progesteronun glioblastoma multiforme gibi tedavisi limitli bir kanser tipindeki antiproliferatif ve apoptotik etkisinin proteomik profili üzerindeki değişimi saptamayı amaçladık.

Bilgi birikimi ve tecrübeleri ile bu çalışmanın hayata geçmesini sağlayan, iş disiplini ve yaşam değerleriyle örnek aldığım ve yanında çalışmaktan gurur duyduğum değerli tez danışmanım Prof. Dr. Aysel Özpınar'a,

Laboratuvar deneyimlerimi geliştirmemde ve tezimin her aşamasında destek olan Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Uçal'a,

Yüksek lisans eğitimimiz boyunca yol arkadaşım olan, deneylerimizde ve görevlerimizde birbirimize hep destek olduğumuz İrep Uras'a,

xCELLigence ve hücre kültürü deneylerindeki desteği için İrem Kırış'a,

Bruker Rapiflex cihazındaki destekleri için Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal ve ekibine,

Yüksek lisans eğitimimde bana katkı sağlayan Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyelerine,

Hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği benden esirgemeyen, hayallerimi gerçekleştirmem için beni cesaretlendiren annem Mualla Yılmaz, babam Cafer Yılmaz'a ve yüksek lisans eğitimim boyunca beni motive eden arkadaşım Süleyman Selim ınaroğlu'na en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Muazzez Ceren YILMAZ

KISALTMALAR ve SİMGELER

ATCC American Type Culture Colection

BBB Kan Beyin Bariyeri

cAMP Siklik AMP

CDK1 Siklin Bağımlı Kinaz-1

CDK2 Siklin Bağımlı Kinaz-2

CNS Merkezi Sinir Sistemi

DBD DNA Bağlama Alanını

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA Deoksiribonükleik asit

DPBS Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

EDTA Etilendiamin Tetra Asetik Asit

FBS Fetal Bovin Serum

GBM Glioblastoma Multiforme

GTP Guanozin Trifosfat

IEF İzoelektrik fokuslama

LBD Ligand Bağlanma Alanı

mPRs Progesteron Reseptörü

MSS Merkezi Sinir Sistemi

nER Nükleer Östrojen Reseptörü

nGR Nükleer Glukokortikoid Reseptörü

NPM Nükleofosmin

nPR Nükleer progesteron reseptörü

P4 Progesteron

PR Progesteron Reseptörü

SDS Sodyum Dodesil Sülfat

TBI Travmatik Beyin Hasarı

TM Transmembran

TMZ Temozolamide

WHO World Health Organization

α Alfa

β Beta

γ Gamma

μ Mikro

CO₂ Karbon dioksit

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1 Kullanılan cihaz ve malzemeler | 25 |
| Tablo 2 Kullanılan kimyasal malzemeler | 26 |
| Tablo 3 IEF Parametreleri | 34 |
| Tablo 4 Jel yürütme parametreleri | 35 |
| Tablo 5 U87MG 100 μ M P4 uygulanan örnek ile kontrol karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların listesi | 63 |
| Tablo 6 U87MG 300 μ M P4 uygulanan örnek ile kontrol karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların listesi | 64 |
| Tablo 7 A172 100 μ M P4 uygulanan örnek ile kontrol karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların listesi | 66 |
| Tablo 8 A172 300 μ M P4 uygulanan örnek ile kontrol karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların listesi | 67 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1 Progesteron molekülünün kimyasal yapısının iki boyutlu gösterimi. | 6 |
| Şekil 2 Steroit hormon sentezi. | 8 |
| Şekil 3 Progesteron reseptörü (PR) majör alt tipleri. | 9 |
| Şekil 4 G (guanin nükleotid bağlayıcı) protein-çifti transmembran (TM) reseptörleri. | 11 |
| Şekil 5 Genomik ve genomik olmayan etkilere aracılık eden nükleer ve transmembran bağlı progesteron reseptörleri. | 11 |
| Şekil 6 Normal ve neoplastik endometriyum. | 17 |
| Şekil 7 Normal ve kanserli meme epitelinde progesterone etkisi. | 19 |
| Şekil 8 xCELLigence Sistemi. Hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi araştırmak için deneysel iş akışı. | 28 |
| Şekil 9 İlaç uygulaması ve örneklerin toplanması iş akışı. | 28 |
| Şekil 10 Hüresel empedans aparatına genel bakış. | 31 |
| Şekil 11 U87MG hücre hattında RTCA yazılımı ile elde edilen grafik. | 38 |
| Şekil 12 A172 hücre hücre hattında RTCA yazılımı ile elde edilen grafik. | 39 |
| Şekil 13 U87MG örnek jel görüntüleri. | 40 |
| Şekil 14 A172 örnek jel görüntüleri. | 41 |
| Şekil 15 U87MG hücre hattında 100 µM P4 uygulanan ve kontrol örnekleri spotlarının saçılım grafiği. | 42 |
| Şekil 16 U87MG hücre hattında 300 µM P4 uygulanan ve kontrol örnekleri spotlarının saçılım grafiği. | 43 |
| Şekil 17 A172 hücre hattında 100 µM P4 uygulanan ve kontrol örnekleri spotlarının saçılım grafiği. | 43 |
| Şekil 18 A172 hücre hattında 300 µM P4 uygulanan ve kontrol örnekleri spotlarının saçılım grafiği. | 44 |
| Şekil 19 U87MG hücre hattında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların P4 dozlarına göre sayıları. | 45 |
| Şekil 20 A172 hücre hattında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların P4 dozlarına göre sayıları. | 45 |

| | |
|---|----|
| Şekil 21 U87MG Hücre hattında progesteron (P4) uygulaması ile artan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımı | 46 |
| Şekil 22 A172 Hücre hattında progesteron (P4) uygulaması ile artan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımı | 47 |
| Şekil 23 Nükleofosmin proteininin protein-protein etkileşimi ve sinyal yolağının şematik gösterimi | 48 |
| Şekil 24 CDK1 proteini ve inhibitör kompleksi | 49 |
| Şekil 25 CDK2 proteini ve inhibitör kompleksi | 49 |



EKLER LİSTESİ

| | |
|--|-------|
| Ek 1. Tanımlanan spotların tabloları..... | 63-68 |
|--|-------|



ÖZET

Progesteron (P4) rahim duvarını, meme bezlerini ve merkezi sinir sistemini (CNS) etkileyen ve hafıza, cinsel davranış, bilişsel işlevler gibi CNS'deki fonksiyonları düzenleyen bir steroid hormondur. Yapılan çalışmalar P4'ün meme, endometriyal, yumurtalık, kolon ve tükürük bezi tümörlerinde antiproliferatif ve apoptotik etkisini desteklemektedir. Glioblastoma multiforme (GBM), cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapilere rağmen ortalama sağ kalım süresi 13-15 ay arasında değişen agresif beyin tümörüdür. Bu tez çalışmasında P4'ün iki farklı GBM hücre hattı (U87MG ve A172) üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkilerini araştırmayı ve iki boyutlu jel elektroforezi kullanarak farklı P4 dozlarındaki proteomik profil farklılıklarını belirlemek amaçlanmıştır. Bu hücre hatlarında xCELLigence RTCA cihazı ile yapılan gerçek zamanlı ölçümlere dayalı teknikte logaritmik fazdaki hücrelere farklı dozlarda ilaç uygulaması yapılmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak U87MG ve A172 hücre hatlarında ileri analizler için canlılığın en düşük olduğu ve sitotoksik etkinin en iyi gözlemlendiği saatte yüksek dozlarda P4 uygulanmış hücreler toplanmış ve örnekler karşılaştırmalı olarak 2D gel elektroforezi ile spot analizi yapılmıştır. xCELLigence sonuçlarına göre kontrol ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında dozlara bağımlı olarak azalma gözlemlenmiştir. U87MG ve A172 için sırasıyla, yaklaşık 130 ve 60 protein spotu kontrol ile karşılaştırıldığında 2 kat farklılık göstermektedir ($p < 0.05$). Çalışma sonuçlarına göre P4'ün antiproliferatif ve apoptotik etkisi moleküler fonksiyon proteinlerinde önemli değişimlere neden olmaktadır. Böylece P4'ün GBM üzerinde yeni tedavi stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği söylenebilir.

Anahtar sözcükler: glioblastoma multiforme, progesteron, proteomiks, iki boyutlu jel elektroforezi

SUMMARY

Comparative Proteomic Analysis of Antiproliferative and Apoptotic Effect of Progesterone in U87MG and A172 Glioblastoma Cells

Glioblastoma multiforme (GBM) is an aggressive primary brain tumor with an average survival rate of 13-15 months despite surgical operation, radiotherapy and standard chemotherapy. In addition, studies show that P4 promotes antiproliferative and apoptotic effects in breast, endometrial, ovarian, colon and salivary gland tumors. Aim of this study is to investigate *in vitro* the antiproliferative and apoptotic effect of P4 on two different GBM cell lines and to carry out proteomic analysis. In these cell lines, drug treatment was performed at different doses to cells in the logarithmic phase using a technique based on real-time measurements with the xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) device. Based on this result, cells subjected to P4 treatment at specific doses were collected for further analysis. Afterward, spot analysis of these cells is investigated by using two dimensional gel electrophoresis. According to the results of xCELLigence, a decrease in cell viability due to doses was observed when compared with the control. Approximately 300 protein spots were observed according to 2D gel electrophoresis results. Among them, about 130 and 60 protein spots have the intensity with >2 fold difference between control and drug treated samples, U87MG and A172 respectively ($p < 0.05$). These results suggest that the antiproliferative and apoptotic effect of P4 cause significant changes in molecular function proteins. Thus, it can be said that P4 may contribute to the development of new treatment strategies on GBM.

Key words: glioblastoma multiforme, progesterone, proteomics, two dimensional gel electrophoresis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Progesteron (P4), normal dişi üreme fizyolojisini koordine etmek için gerekli bir hormondur. Öncelikle, yumurtlamadan sonra yumurtalıkta gelişen corpus luteum tarafından salgılanır. Progesteron, Graham ve Clarke (1) tarafından ayrıntılı olarak açıklandığı gibi rahim, yumurtalık, serviks, meme, beyin de dahil olmak üzere birçok doku ve organı etkiler. Progesteronun aynı dokudaki farklı hücre tiplerinin yanı sıra üreme dokularında da farklı etkileri vardır. Ayrıca, progesterona verilen yanıt normal ve hastalıklı hedef doku ve hücrelerde çok farklıdır. Örneğin, klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, hayvan modellerinden elde edilen verilerle birlikte, progesteronun ve reseptörünün (PR), meme kanseri ve rahim fibroidlerinin gelişimini ve büyümesini desteklediğini, öte yandan progesteron etkisinin, östrojenle çalışan endometriyal kanserin gelişimine karşı koruyucu olduğunu ileri sürmektedir (2-5). Progesteronun normal ve hastalıklı dokulardaki etkilerinde bu çarpıcı karşıtlıktan sorumlu mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Makul bir açıklama, lokal salgılanan faktörler, ifade edilen reseptörler ve parakrin ve otokrin iletişimi dahil olmak üzere hedef dokulardaki spesifik mikro-ortamın, progesteronun genel etkisini belirleyebileceği olabilir (6).

P4 kan beyin bariyerini (BBB) hızlıca geçer ve ana etkilerinden biri de genellikle travmatik beyin hasarına (TBI) eşlik eden inflamasyonu ve serebral ödemi azaltmaktır (7). Ayrıca literatür P4'ün meme, endometriyal, yumurtalık, kolon ve tükürük bezi tümörlerinde antiproliferatif ve apoptotik etkisini desteklemektedir (8,9).

Glioblastoma multiforme (GBM) yetişkinlerde çok yaygın ve en ölümcül malignant beyin tümörüdür. Ortalama sağ kalım süresi yaklaşık 13-15 aydır. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü verilerine göre 2017 yılında 23.800 yeni vaka görüleceği ve bunlardan yaklaşık 16.700 kişinin beyin ve sinir sistemi kanserinden dolayı hayatını kaybedeceği öngörülmektedir. Primer GBM erkeklerde 3:1 oranında daha fazla gözlenmekte iken sekonder GBM kadınlarda daha fazla gözlenir ve bu da

hastalıkta cinsiyet farklılığı oluşturmaktadır (10). GBM için henüz güvenli ve etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Standart tedavi beyin cerrahisini takiben radyoterapi ile temozolamide (TMZ) tedavisidir. GBM tümörleri %100 oranında nükseder ve bu nükseden tümörlerin tedavisi özellikle cerrahi işlem görmüş, radyoterapi ve kemoterapi almış hastalarda çok daha zordur. Sadece iki ilaç şu anki standart tedavilerde kemoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır: Gliadel ve TMZ, her biri ayrı ayrı sağ kalımı yaklaşık 2 ay artırmaktadır (10–12), fakat ikisi de birçok yan etkiye sebep olmaktadır. Dahası şu anki standart tedavilerin birçok limitasyonu vardır: 1) GBM komşu beyin parankimasına sızar, bu nedenle tümörün cerrahi yöntemle tamamen çıkarılması pratik olarak imkansızdır; 2) tümör kalıntıları çok agresif, kötü huylu davranabilir ve GBM hastalarında morbidite ve mortaliteye katkıda bulunan önemli negatif faktör olan peri-tümöral beyin ödemi üretirler (13); 3) beyne uygulanabilen maksimum radyasyon dozu nadiren tümörü tamamen ortadan kaldırmak için yeterlidir (14); 4) cerrahi operasyondan sonra kazanılan motor, dil ve kavrama ile ilgili eksiklikler GBM hastasının yaşam kalitesi üzerinde açık bir olumsuz etki yapabilir (15,16); 5) beyin; tümör yerleşimi, ameliyat için erişilebilirlik ve kan beyin bariyeri (BBB) gibi tedaviye birçok engel koyar. Böylece GBM için optimal bir ilaç tedavisi: BBB'yi kolayca geçebilmeli, peri-tümöral beyin ödemi azaltmalı, tümör büyümesinde ve metastazındaki birçok mekanizmayı hedeflemeli, seçici bir şekilde sadece tümör hücrelerini öldürmeli ve sağlıklı dokuya herhangi bir yan etki göstermemelidir. Yapılan çalışmalarda progesteronun GBM için umut verici bir tedavi yöntemi olabileceği gösterilmiştir. Bununla ilgili *in vivo* ve *in vitro* birçok çalışma yapılmıştır (9,17,18). Bu çalışmalarda P4'ün anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin, hücre hatlarının proteomik profilleri üzerindeki değişimini inceleyen bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında P4'ün hücre hatlarına anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin proteomik analizlerinin yapılması hedeflenmiştir.

Tez çalışması için iki farklı GBM hücre hattı seçilmiştir. Literatürdeki çalışmalarda örnek hücre hattı olarak kullanılan U87MG (ATCC HTB-14); GBM kökenli, agresif seyreden, tümörojenik hücre hattıdır. U87MG hücrelerine ek olarak yine GBM kökenli tümörojenik olmayan A172 (ATCC CRL-1620) çalışmaya dahil edilmiştir. Bu iki hücre hattının seçilmesinin temel nedeni kökeni aynı olup genetik açıdan farklı özellik gösteren hücre hatlarında P4'ün antiproliferatif ve apoptotik

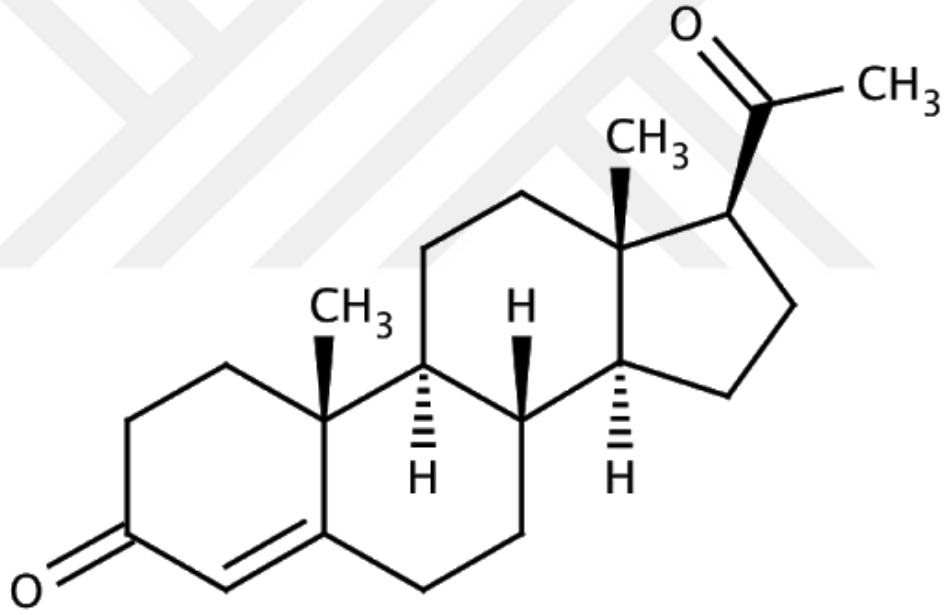
etkisinin karşılaştırılmasıdır. Proteomik analizler için logaritmik fazda bulunan hücrelere belli dozlarda P4 uygulaması yapılarak belirlenen zaman aralığında hücreler toplanmıştır. Toplanan hücrelere total proteomik analizi için iki boyutlu (two dimensional, 2D) jel elektroforezi yapılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilecek veriler ile P4'un GBM üzerindeki anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin daha iyi anlaşılacağı, potansiyel yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesine katkı sağlanacağı düşünülmüştür. Yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesi, yeni tedavi stratejilerinin ortaya çıkmasına neden olacaktır. Böylece bu hastalığın sağ kalım süresi üzerine pozitif bir etkisinin olması muhtemeldir. Bu çalışmanın hastaların sağ kalım sürelerinin artmasına bağlı olarak ile sosyoekonomik anlamda topluma pozitif katkısı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Progesteron

Progesteron ilk olarak Allen ve ark. tarafından 1933 yılında keşfedilmiş, progestasyonel steroidal ketondan kökenlenen progesteron adı verilmiştir (19) (Şekil 1).



Şekil 1 Progesteron molekülünün kimyasal yapısının iki boyutlu gösterimi.

(National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5994, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5994> Erişim tarihi: 06 Mayıs 2018)

Progesteron, normal dişi üreme fonksiyonunun karmaşık düzenlenmesinde anahtar bir bileşendir. Genel olarak, progesteronun memelideki başlıca fizyolojik rolleri 1) rahim ve yumurtalıkta: rahim büyümesi ve miyometriyal kasılmanın

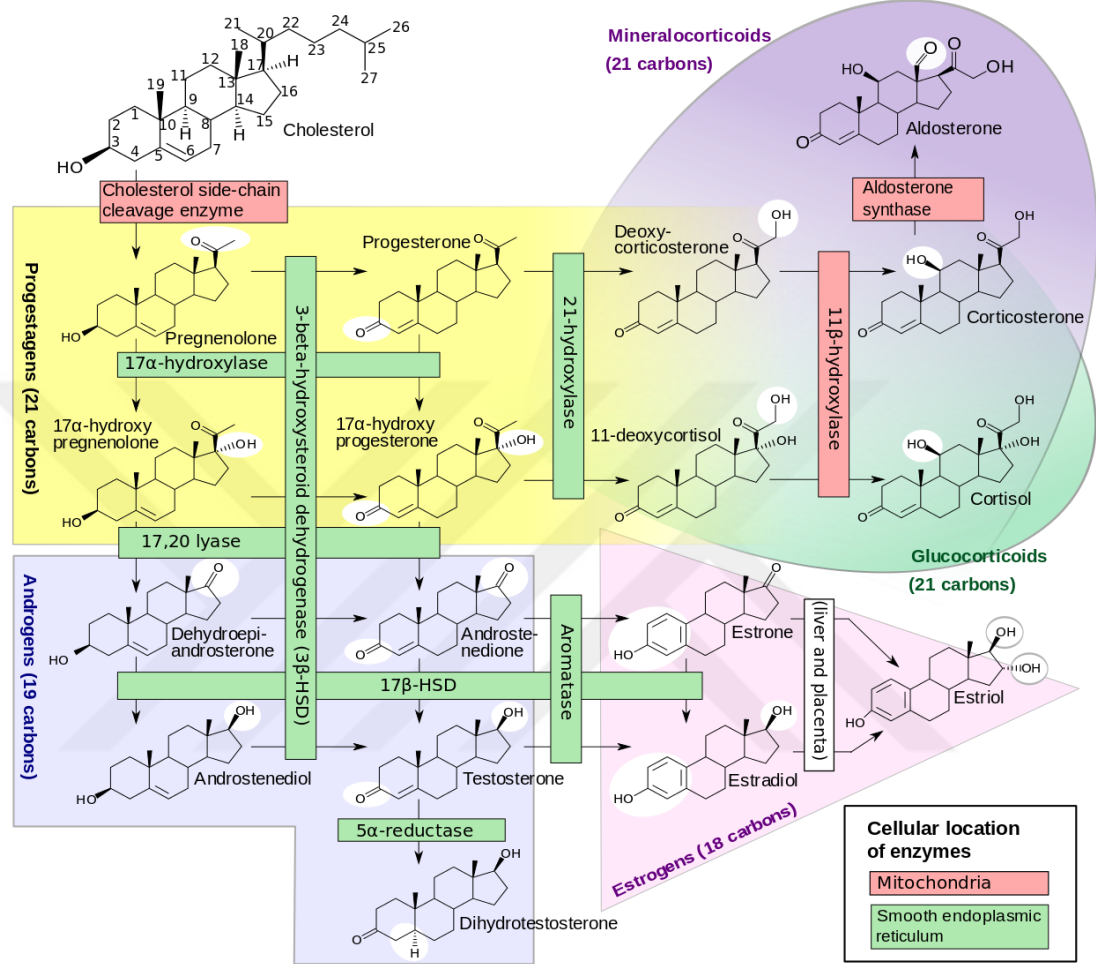
bastırılmasının teşvik edilmesi ile olgun oositlerin serbest bırakılması, implantasyonun kolaylaştırılması ve hamileliğin sürdürülmesi; 2) meme bezinde: süt salgılanmasına hazırlık olarak lobular-alveoler gelişimini ve süt salgılanmasının doğumdan önce bastırılması; ve 3) beyinde: cinsel olarak duyarlı davranış için gerekli olan sinyallere aracılık etmesidir.

Progesteron evrimsel açıdan en korunmuş üreme steroid hormonudur (Şekil 2). Yumurtalık, memelide östrojen ve progesteronun sentez ve salgılanmasının ana yeridir ve bu hormonların dolaşımdaki seviyelerinde döngüsel dalgalanmalara yol açar (20). Birincil foliküller, her iki hormonu salgılamanın yanı sıra normal döngü sırasında yumurtanın salınmasından da sorumludur. Yumurtlamadan önce, foliküllerdeki granüloza hücrelerde östrojen biyosentezi ve salgılanması gerçekleşir. Folikül rüptürü ve ovumun serbest bırakılmasından sonra, bu granüloza hücreleri, döngünün ikinci bölümünde progesteron ve östrojen salgılanmasından sorumlu olan corpus luteum'u oluşturmak üzere olgunlaşır. İnsanda, fertilizasyon 1 ila 2 gün içinde gerçekleşmezse, corpus luteum 10-12 gün boyunca genişler (21). Daha sonra salgı bezinin gerilemesi, östrojen ve progesteron salınımının sona ermesi ile devam eder. Döllenme gerçekleşirse, corpus luteum, insan koryonik gonadotropinin (hCG) salgılanmasıyla desteklenir ve yaklaşık olarak 10. gebelik haftasına kadar progesteron üretir. 7-10 gestasyonel haftalar arasında bir geçiş döneminden sonra plasenta, progesteronun ana maddesi olarak dolaşımdaki kolesterolü kullanan ana progesteron kaynağı haline gelir ve bundan sonra progesteronun maternal serum seviyeleri belirgin şekilde artar (22).

Progesteronun corpus luteumdan salınması bir dizi hormondan etkilenir. Bunlar arasında, siklik adenosin monofosfat (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) aktivitesinin hücre içi etkileri üzerinde aracılık edilen Luteinizan Hormon (LH) birincil etkiye sahiptir (23,24). Folikül uyarıcı hormon (Follicle stimulating hormone, FSH), Prolaktin (Prolactin, PRL), prostaglandinler ve b-adrenerjik ajanlar da progesteron sekresyonunun kontrolünde rol oynar (20).

Salgılanma olduktan sonra, progesteron insanlarda dahil olmak üzere birçok türde transkortin (kortikosteroid bağlayıcı globulin) ile kanda taşınır. Özel bir progesteron bağlayıcı plazma proteini, aynı zamanda, kortikosteroid bağlayıcı

globülinden daha yüksek bir progesteron afinitesine sahip olan gebe domuzda tanımlanmıştır ve gebeliğin 15 ila 20 günden itibaren kuvvetli bir şekilde indüklenir ardından yaklaşık 65. günde doğuma kadar salınımı yükselir (25–27).



Şekil 2 Steroit hormon sentezi.

Maternal dolaşımdan gelen öncül kolesterol, 21 karbon (C21), progestajene dönüştürülür. Progestajenler C21 glukokortikoidlere veya C19 androjenlere dönüştürülebilir. Androjenler, C18 östrojenleri için öncüler olarak görev yaparlar. (28)

2.1.1. Etki mekanizması

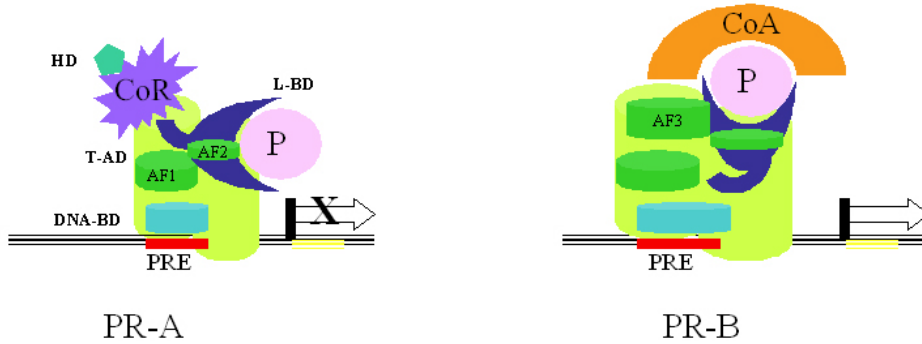
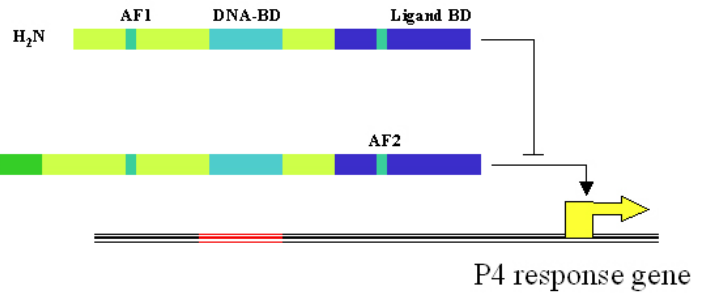
2.1.1.1.Genomik etkiler

Nükleer progesteron reseptörü (nPR), transkripsiyon faktör proteinlerinin steroid üst grubuna aittir (29). Tüm steroid reseptör proteinleri, gen

transkripsiyonunu ve protein-protein etkileşimlerini aktive eden, steroidin biyolojik tepkisini belirleyen, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş bir DNA bağlama bölgesi, esnek bir bağlanma bölgesi ve bir C-terminal ligand-bağlama bölgesi içeren değişken bir N-terminal bölgesinden oluşur. mRNA ve protein sentezini içeren klasik steroid hareketinin genomik mekanizması yavaş olup, saatler ve günler arasında değişmektedir.

nPR, progesterona ve kortizole daha az afinite ile bağlanır (30). Progesterona verilen biyolojik yanıt, nPR izoformlarının düzeylerine ve oranlarına bağlıdır. nPR izoformları A (nPR-A) (94 kDa) ve nPR-B (116 kDa), farklı promoterler tarafından aktive edilen aynı gen den kopyalanır. nPR-B izoformu, N-terminalinde ek 164 aminoasit içerir ve progesterona yanıt veren genleri aktive eder. nPR-A izoformu, nPR-B'den daha zayıf bir transkripsiyon aktivatörüdür (Şekil 3). nPR-B, nükleer östrojen (nER) ve nükleer glukokortikoid (nGR) reseptörleri gibi diğer steroid reseptörlerinin bir inhibitörü olarak işlev görebilir (31,32). İnsan miyometriyumunda üçüncü bir nPR-C izoformu tanımlanmıştır (33). nPR-C, N terminalinin büyük bir bölümünü ve DNA bağlama alanının büyük bir bölümünü içermez, bu nedenle DNA'ya bağlanamaz.

PR-A: Repressor



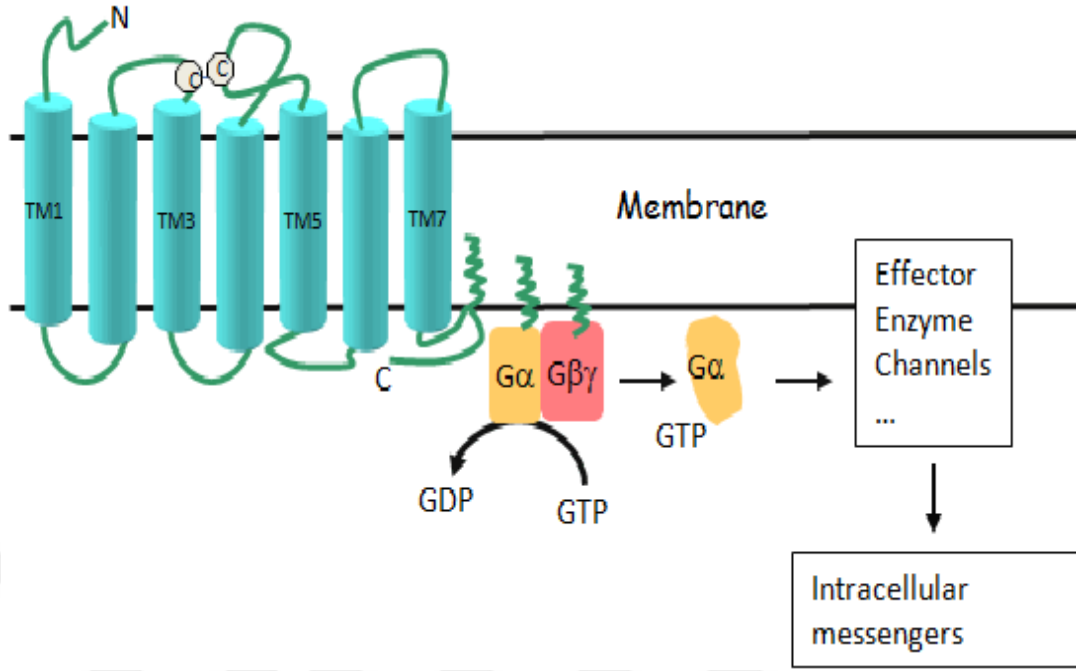
Şekil 3 Progesteron reseptörü (PR) majör alt tipleri.

PR-B, DNA bağlanma bölgesi (DBD) yoluyla promoter üzerindeki progesteron yanıt elemanına (PRE) bağlanır ve progesteron yanıt geninin aktivatörü olarak işlev görür. PR-A, ilk 164 N-terminalinden kesilmiş formdadır ve transkripsiyonel aktif değildir. Aynı zamanda konformasyonunda farklılık gösteren PR-A'nın, kesilmiş alanda bulunan üçüncü transaktivasyon alanlarından (AF3) yokluğu, PR-B ve diğer bazı steroidlerin aracılık ettiği transkripsiyonel aktiviteyi baskıladığı bilinmektedir (34).

PR, steroidler, retinoidler, tiroid hormonları ve D vitamini için reseptörleri içeren geniş bir ligandla aktive edilmiş nükleer transkripsiyon düzenleyicileri ailesinin bir üyesidir. Genler, türler ve aile üyeleri arasında farklı derecelerde korunan spesifik fonksiyonel alanlara organizasyonla karakterize edilir. Reseptör genleri arasındaki en fazla korunan bölge, iki “çinko parmak” DNA-bağlama motifini kodlayan genin merkezinde bir bölgedir (35).

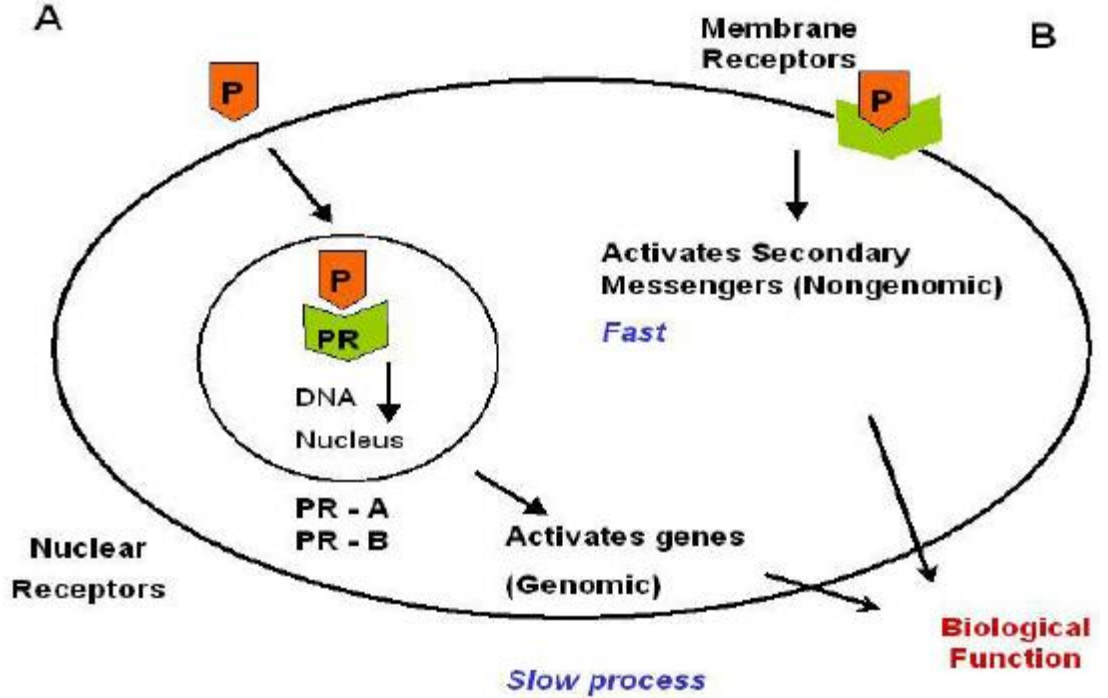
2.1.1.2.Genomik olmayan etkiler

Steroid hormonlarının, yavaş genomik mekanizmalarla açıklanamayan hızlı hareketleri başlattığı gösterilmiştir. Bu tür hızlı hareketler, iyon akışları ve hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonlarında (36) değişikliklerle sonuçlanan hücre içi sinyalleme yollarının aktivasyonu yoluyla saniyeler içinde ve siklik nükleotidler, hücre dışı düzenlenmiş kinaz (ERK) 1-2 gibi diğer ikinci mesajcılarının aktivasyonundan birkaç dakika sonra meydana gelir (37). Son zamanlarda, insanlarda üç yeni kabul edilen membran progesteron reseptörü (mPRs); mPR α , mPR β ve mPR γ tanımlanmıştır (38).



Şekil 4 G (guanin nükleotid bağlayıcı) protein-çifti transmembran (TM) reseptörleri.

Hormonlardan ve diğer sinyal faktörlerinden hücreler arası haberciye sinyal iletmektedir. Bunlar $G\alpha$ ve sıkıca birleşmiş $G\beta\gamma$ alt birimlerinden oluşmaktadır. Burada guanozin trifosfat (GTP), $G\alpha$ alt birimi tarafından guanozin difosfata hidrolize edilir (21).



Şekil 5 Genomik ve genomik olmayan etkilere aracılık eden nükleer ve transmembran bağlı progesteron reseptörleri.

Progesteron (P) A'yı aktive eder. Nükleer reseptör proteinleri (PR-A, PR-B) ve/veya B ile gen aktivasyonu (yavaş süreç) sonuçlanan genomik yollar. İkincil habercileri harekete geçiren zara bağlı reseptörler aracılığıyla genomik olmayan yollar (hızlı süreç) (21).

Progesteron reseptörü (PR) geninin null mutasyonunu taşıyan bir fare modeli, in vivo progesteron eyleminin karmaşık sorularının birçoğuna cevap vermiş normal kadın gelişimi ve reproduksiyonunda progesteronun rollerinin önemini ve çeşitliliğini doğrulamıştır (39).

2.1.2. Progesteronun uterus ve ovaryumdaki faaliyeti

Progesteronun üremede, yumurta gelişiminde, implantasyon ve hamilelikte merkezi bir rolü vardır. Bu önemli rolleri çoğalma ve desidualizasyondaki (hamilelik sırasında plasenta maternal kısmını oluşturan uterus astarı) döngüsel değişikliklerin kontrolü ile menstruasyon döngüsü sırasında rahim fonksiyonunun düzenlenmesidir. Progesteron, desidual dokuların gelişimi için gereklidir ve fertilizasyon meydana gelirse, dolaşımdaki yüksek progesteron seviyeleri sadece implantasyonu kolaylaştırmak için değil, aynı zamanda rahim büyümesini uyararak ve miyometriyal kasılmaya dahil olan faktörlerin etkilerine karşı gebeliği korumak için de önemlidir. Progesteronun bu farklı ve karmaşık etkilerinin altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak tanımlanamamıştır, ancak progesteronun hücre tipine ve fizyolojik içeriğe bağlı olarak uterusu hem hücre proliferasyonunu uyarıp hem de inhibe edebileceği, farklılaşmış bir işlevde rol oynadığı açıktır. Progesteronun moleküler mekanizmaları da tam olarak bilinmiyor olmasına rağmen, etkilediği bazı fonksiyonlar; glikojenez (40,41), siklik nükleotid metabolizması (42), protein sentezinin, sekresyonu (42) ve hücre döngüsü regülasyonunun (43) uyarılmasıdır.

2.1.3. Progesteronun meme dokusunda faaliyeti

Progesteronun normal meme dokusundaki önemli gelişimsel rolü, hamilelik sırasında globular-alveolar yapıların oluşumu olarak kabul edilmiştir. Bu, PR null farelerde meme bezlerinin, vahşi tiple nispeten benzer olan, ancak östrojen ve

progesterona maruz kaldıktan sonra intraductal lobular-alveoler yapı oluşturmada başarısız duktal yapıları geliştirmesiyle desteklenmektedir (39). Progesteronun etkisinin proliferatif olması, hücre döngüsü genlerinin progesteron regülasyonu, büyüme faktörleri ve büyüme faktörü reseptörlerinin aracılık ettiği bir durumdur. Progesteron ayrıca emzirme rolüyle memede farklılaşmada etki gösterir. Diğer farklı işlevlerde progesteronun rolü kapsamlı olarak araştırılmamıştır.

Rahim ile karşılaştırıldığında, progesteronun meme içinde etkisini gösterdiği mekanizmalar daha az bilinmektedir. Bunun nedeni, normal meme dokusunun elde edilmesinin zorluğu ve normal memede progesteron hareketinin modellerinin nispeten azlığıdır. Meme kanseri hücreleri; progesteronun etkilerini gözlemlemek büyüme faktörleri ve büyüme faktörü reseptörlerinin rolünü incelemek için yaygın şekilde kullanılmıştır.

Progesteronun meme dokusundaki proliferatif etkilerinin altında yatan mekanizmalara yönelik analizler, progestinlerin, esas olarak kültürdeki meme kanseri hücrelerinde, hücre döngüsü üzerindeki etkilerini inceleyerek elde edilmiştir. Hücre döngüsü ilerlemesi ile ilişkili genlerin kısa ömürlü indüksiyonuyla ilişkili progesteron uygulamasından sonra PR-pozitif T-47D meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü ilerlemesinde geçici bir artış görülür (44). Bu artış, serum yoksunluğuyla G1 fazında tutuklanan hücrelerin progestin tedavisi ile gösterilebilir. Daha sonra bu hücrelerde güçlü bir mitojen olan insülin ile tedavi ile serbest bırakılabilir. Bu koşullar altında, hücreler, hücre döngüsü boyunca tek bir senkronize ilerleme döngüsüne uyarılır. Bu, siklinler ve sikline bağımlı kinazlar gibi hücre döngüsü düzenleyici genlerin ve proliferatif ile bağlantılı c-myc ve c-fos gibi protoonkogenlerin ekspresyonunda geçici artışların eşlik ettiği bir etkidir (45). Hücre döngüsü ilerlemesinin progestin indüksiyonu, S fazına giren hücrelerin sayısının artması yerine, döngü boyunca geçiş halindeki hücrelerin artan ilerleme oranını yansıtır. Ayrıca, progestinler, siklin D1 mRNA seviyelerinde insülin aracılı artışı artırırken, siklin D1 indüksiyonunun zamanlaması, tek başına insülin ile görülenle aynı kalmaktadır (46). Bu nedenle, progestin tedavisinden kaynaklanan siklin D1 ve c-myc ekspresyonundaki artışlar, progestin etkilerinin PR aracılı olduğunu göstererek RU 38468 tarafından bloke edilebilmesine rağmen, hücre döngüsü genlerinin progesteron eyleminin doğrudan hedefleri olma ihtimali yoktur. Hücre döngüsü

ilerlemesi ile ilişkili genlerin ekspresyonunu uyarmaya ek olarak, progesterinler, hücre büyümesinin bastırılmasından sorumlu genlerin ekspresyonunu inhibe ederek etki edebilir. Tümör baskılayıcı protein p53'ün ekspresyonu, T-47D meme kanseri hücrelerinde progesterinlerle azalır (47). Bu azalma da progesterinlerin, p53'ün tümör baskılayıcı etkilerini ortadan kaldırarak bu hücrelerin proliferasyonunu uyarabileceğini gösterir. Dahası, p53'ün down-regülasyonu ile sonuçlanan progesterin tepkisinin kaybı: artan ve düzensiz proliferasyona sebep olabilir.

2.1.4. Progesteronun beyine etkisi

Östrojen ve progesteron, üreme davranışıyla ilgili beyin fonksiyonlarını kontrol eder. Gine domuzlarında ve sıçanlarda, östrojen döngüsü sırasında östrojen ve progesteronun ardışık salgılanması, ovülasyonla çakışan cinsel olarak alıcı lordoz duruşunu (kemirgenler, filler ve kedigiller de dahil olmak üzere çoğu memelilerde bulunan çiftleşmeye karşı cinsel alıcılık için doğal olarak ortaya çıkan vücut duruşu) indükler. Ventromedial hipotalamus ve preoptik alanda PR ekspresyonunun, yalnızca östrojen veya östrojen ve progesterona ardışık olarak maruziyetiyle indüklenmesi, lordoz duruşunda gözlenen artışın eşlik ettiği bir zaman sürecini takip eder (48). Dahası, östrojen ve progesteron ile ardışık tedavi, başlangıçta PR'nin tek başına östrojenden daha fazla indüklenmesi ile sonuçlanır (49), reseptör seviyelerinin down-regülasyonuna lordoz davranışında paralel bir azalma eşlik eder (50). Bu veriler PR ve progesteronun cinsel davranışların düzenlenmesinde doğrudan rol oynadığını düşündürmektedir. Bu, cinsel davranışın, antisens PR oligonükleotidlerinin sıçan beyninin serebral ventrikülüne doğrudan teslimi ile ortadan kaldırılabilceği bulgusuyla desteklenir (39). Bu hayvanlara östrojen ve progesteronun sıralı olarak uygulanması, azaltılmış veya yok olan bir lordoz yanıtı sağlar ancak bu baskılama oligonükleotid dozuna bağlıdır. Ayrıca, PR bu hayvanların hipotalamusunda önemli ölçüde daha düşüktür. PR null fareler, hormon uygulamasından sonra (39) tam bir lordoz yanıtı olmaması ile hormon cevap için PR ekspresyonunun mutlak gerekliliği gösterir.

Progesteronun beyinde etki gösterdiği mekanizmalar tam olarak tanımlanmamıştır; ancak, progesteronun bir dizi proteinin ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir. Progesteron, beyin belirli bölgelerindeki gama-aminobutirik asit (GABA) sinyal yollarını uyarır. PR ekspresyonunun düşük olduğu veya olmadığı bazı bölgeler dahil olmak üzere, beyin birkaç bölgesinde GABA-A reseptör bağlanma bölgelerindeki progesteron aracılı artışlar gözlenmektedir. Bu artışlar sıçanlarda ve hamsterlerde lordoz davranışının uyarılmasına katkıda bulunur, agresif davranışların bastırılmasında, ve Gonodotropin salgılayıcı hormonun (Gonodotropin-releasing hormone, GnRH) salınımının indüksiyonunda rol oynar (51).

Progesteron, beyinde cinsel olarak duyarlı davranışları içeren sinyalleri düzenler. Progesteronun bu süreç üzerindeki en iyi tanımlanmış yönü, hipotalamus ve preoptik alanda PR-aracılı etkileridir. Ayrıca progesteronun beyindeki etkilerine, progesteron metabolitlerinin GABA-A reseptörleri gibi diğer reseptörlerle doğrudan etkileşimi gibi klasik olmayan etki mekanizmaları tarafından da aracılık edilebilir. Ayrıca, PR-A ve B'nin nispi ekspresyonu, beyindeki spesifik bölgelerdeki progesteron etkilerini belirlemede önemli olabilmektedir (1).

2.2. Progesteron ve Kanseri İlişkisi

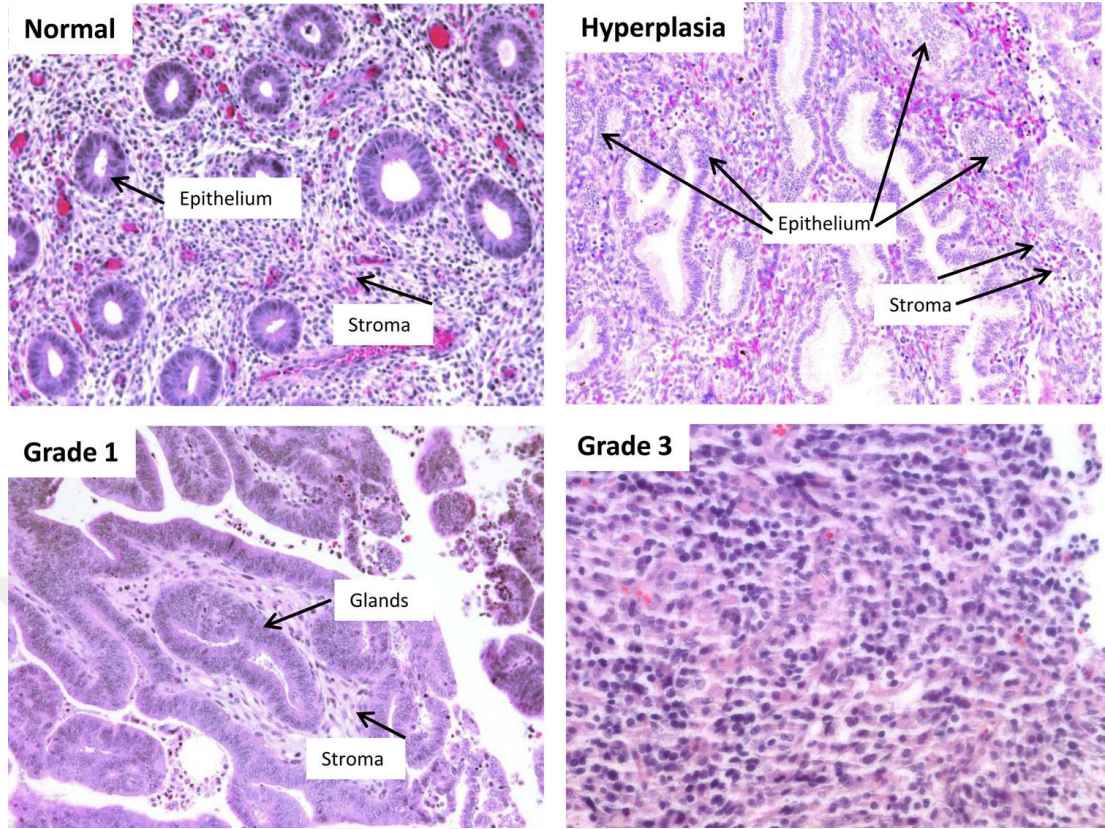
Progesteron reseptörü (PR), östradiol ile birlikte gonadotropin sekresyonunu düzenleyen, implantasyon için endometriyumu hazırlayan, gebeliği koruyan ve meme dokusunu farklılaştıran ovarian steroid progesteronun etkilerine aracılık eder. Hormonlara yanıt veren dokularda östrojen ve progesteron eylemlerinin ayrılması bir sorun olmaya devam etmektedir. Endometriyum kanseri, endometriyozis, rahim fibroidleri ve meme kanseri dahil olmak üzere uterus ve meme patolojileri, mitojenik faktör olarak kabul edilen östrojen ile yüksek oranda ilişkilidir. Ortaya çıkan kanıtlar, progesteronun farklı rollerini ve bu hastalıkların patogenezi üzerindeki etkisini desteklemektedir. Progesteron, endometriyumda östrojen güdümlü büyümeyi antagonize eder ve yetersiz progesteron etkisi, endometriyum kanseri riskini çarpıcı biçimde artırır. Endometrioziste, ektopik ve ektopik dokular progesterona yeterince cevap vermez ve sağ kalmaya katkıda bulunan progesterona dirençli olarak kabul

edilir. Uterus fibroidlerinde progesteron, proliferasyonu, hücrel hipertrofiyi ve hücre dışı matriks birikimini artırarak büyümeyi teşvik eder. Normal meme dokusu ve meme kanserinde progesteron proliferatif ve kanserojendir. Progesteronun çeşitli etkilerini açıklayabilen bu dokular arasındaki temel fark, PR-ifade eden stroma ve epitelyumun parakrin etkileşimleridir. Normal endometriyum, epitelyal hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını etkileyen ve karsinojenik transformasyona karşı koruyan bol miktarda PR ile çok sayıda farklı stromal hücreleri içeren bir mukozadır. Buna karşılık, meme ve fibroidlerdeki progesteronun birincil hedef hücreleri, belirgin bir PR ekspresyonuna sahip spesifik olarak organize stromal bileşenlerden yoksun olan meme epitel hücreleri ve leiomyoma hücreleridir (6).

2.2.1. Endometriyal kanser ve progesteron

Endometrium, vücuttaki hormonallara en çok yanıt veren dokulardan biridir ve hormonlara anormal maruziyet, hiperplazi, adenokarsinom dahil olmak üzere neoplastik değişikliklere yol açabilir. Endometriyal hiperplazi ve adenokarsinom, endometrium bezlerinden kaynaklanır, normal endometriuma göre belirgin histolojik farklılıklar gösterir (Şekil 6).

Endometriyal kanser iki şekilde ortaya çıkabilir: tip 1, östrojene bağımlı olarak sınıflandırılan en sık görülen kanser tipidir, oysa tip 2, asterojen stimülasyonu ile ilişkili değildir ve genellikle daha kötü prognoza sahip daha yüksek dereceli bir kanser olarak ortaya çıkar (52).



Şekil 6 Normal ve neoplastik endometriyum.

Normal proliferatif faz endometriyum, hiperplazi, derece 1 ve derece 3 endometriyal adenokarsinom gösterilmektedir. Endometriyal hiperplazi, epitel-stroma oranındaki artış, bez şeklindeki düzensizlikler, çoklu epitelyal hücre tabakaları ve bez büyüklüğündeki varyasyon ile karakterizedir. Endometriyal adenokarsinom, tek tek bezlerin değiştirilmiş fibroblastik stroma (desmoplastik stromal yanıt) ile “arka arkaya” görüldüğü konfluan glandüler epitelyal patern tarafından sergilenir. Derece 3 endometrial kanser, bez benzeri mimaride bir kayıpla daha fazla katı büyüme gösterir. Sadece malign epitelyal hücreler mevcut (6).

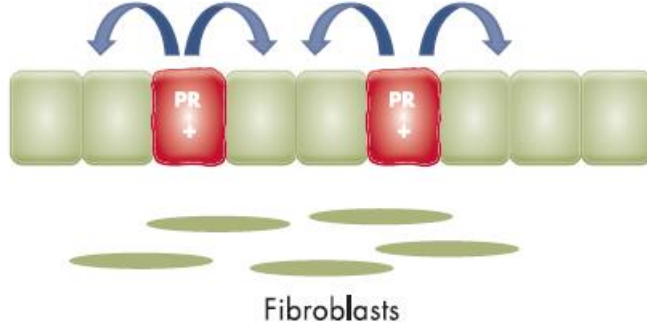
Progesteronun östrojene karşı antagonistik rolüne dayanarak, progestinler, endometriyal neoplazileri tedavi etmek için klinik olarak kullanılmıştır. Endometriyal hiperplazi ve iyi diferansiye endometriyal adenokarsinomlu kadınlar progestin tedavisine tam bir cevap verebilirler; bununla birlikte, hastalığın şiddeti arttıkça, progestinlerin etkinliği azalır. Bunun nedenleri bilinmemektedir. Kemoterapi ile karşılaştırıldığında progestinlerin nispeten hafif yan etkileri göz önüne alındığında, endometriyal kanseri tedavi etmek için progestinlerin etkinliğini arttırmaya yönelik stratejiler, özellikle tedaviden sonra ya da zayıf cerrahi

adaylarından olan fertliliteyi korumak isteyen hastaların tedavisi için büyük ilgi görmektedir (6).

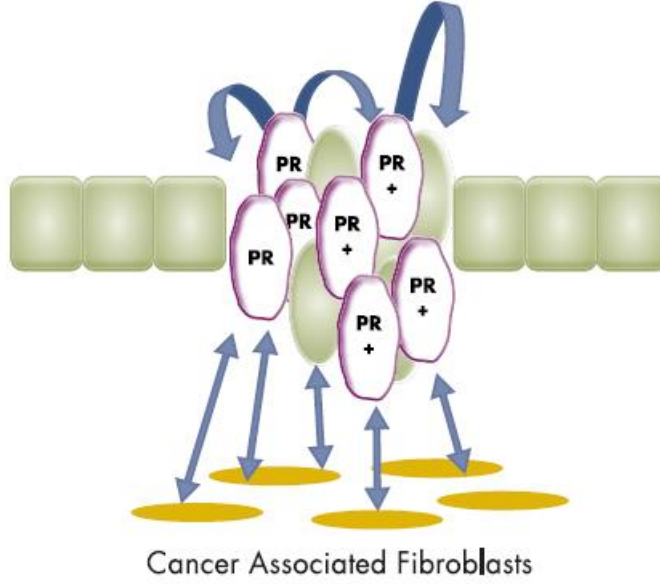
2.2.2. Meme kanseri ve progesterone

İnsan meme bezi, lümen epitelyal hücrelerden oluşan, merkezi zemini ve temel zarın bitişiğindeki miyoepitelyal hücrelerin altında yatan bir dizi dallanma kanalından oluşur. Bu epitelyumu çevreleyen kollajenöz bir stroma ve adipoz dokudur. Östrojen ve progesteron, memenin gelişimi için gereklidir ve duktal gelişim ve hamilelik sırasında hücre proliferasyonunu aktif olarak desteklemektedir. Uterus fibroidleri için olduğu gibi, östrojen, meme bezinde birincil mitojenik faktör olarak kabul edilmiştir. Göğüste östrojen rolünü ve meme kanseri patogenezindeki rolünü desteklemek için çok sayıda kanıt vardır (53). Karşılaştırmalı olarak, insan erişkin meme bezi ve kanserde, progesteronun rolü daha az açıktır. Bununla birlikte, prelinik ve klinik kanıtlar, PR-pozitif ve PR-negatif meme hücreleri arasındaki otokrin ve parakrin eylemleri yoluyla yetişkin meme ve meme kanserinde progesteronun proliferatif ve antiproliferatif rollerini ortaya koymuştur (Şekil 7). Son çalışmalar, progesteronun, transformasyona duyarlı bir kök hücre popülasyonunu genişlettiğini de göstermiştir (54–56).

Normal Mammary Epithelial Cells



Breast Cancer Cells



Şekil 7 Normal ve kanserli meme epitelinde progesterone etkisi.

Normal meme dokusu ve meme kanserinde, progesteron eyleminin birincil hedef hücresi, PR'yi eksprese eden spesifik olarak organize edilmiş stromal bileşenlere dair bir kanıt olmaksızın, bezlerde veya malign epitelyal hücrelerde bulunur. Sadece küçük bir normal epitel hücreleri popülasyonu PR eksprese eder. PR-eksprese eden hücreler çoğalmazken, PR için negatif olan hücrelerde progesterona yanıt olarak çoğalma meydana gelir. Meme kanseri hücrelerinde, progesteron doğrudan PR-eksprese eden hücreler üzerinde hareket eder ve proliferasyonu artırır. Progesteron-sürücü proliferasyonuna aracılık etmede çevre stromal fibroblastların rolü açık değildir (6).

2.2.3. Beyin kanseri ve progesterone

İlk olarak 1984'te Haas ve ark. tarafından yeni tanı konmuş kanserde gestasyonla ilişkili olarak beyin tümörlerinin sıklığının azaldığı bildirilmiştir (57). İki yıl sonraki

çalışmalarında 1961'den 1979'a kadar German Democratic Republic (GDR) 'in National Cancer Registry (NCR)'e bildirilen, gebelikle ilişkili beyin tümörlerinin alt tiplerini araştırmışlar, hastanın tanı anında gebe olduğu primer serebral kanserler, 106 doğumda 3.6'lık bir sıklıkta, Uluslararası hastalık sınıflandırılmasına (International Classification of Diseases, ICD) 191'e göre gruplandırılmış ve GDR'deki gebe hastalarda histolojik olarak doğrulanmış toplam 17 beyin kanseri (dokuz astrositom, altı GBM, bir ependiyom ve bir sarkom) tespit etmişler. Diğer tümörlerin aksine, gözlenen akustik nörinom vakaları, astrositom ve GBM'lerin azalmasının spesifik bir bulgu olduğunu göstermişler (58).

2.3.Glioblastoma Multiforme

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO), 2016'daki merkezi sinir sistemi (MSS) tümörlerini sınıflandırması, 2007'deki sınıflandırmaya göre kavramsal ve pratik anlamda değişmiştir. Yenilenen sınıflandırmaya göre 16 ana tipe ayrılan tümörlerin ilk bölümü dağılmış oligodendrogial ve astrositik tümörlerden oluşmaktadır. Glioblastoma bu grubun içinde yer almaktadır (59).

Glioblastomlar, 2016'da WHO MSS tümörleri sınıflandırmasına göre 1) Glioblastoma IDH-yabani tip (vakaların yaklaşık %90'ı), klinik olarak en sık primer olarak tanımlanmış veya de novo glioblastomaya karşılık gelen, 55 yaş üstü hastalarda baskın olan; 2) Glioblastoma IDH-mutant (vakaların yaklaşık %10'u), daha az bir geçmişe sahip olan sözde ikincil glioblastomaya karşılık gelen ve çoğunlukla daha genç hastalarda ortaya çıkan glioblastom ve 3) tam IDH değerlendirmesinin yapılamadığı tümörler için ayrılan bir tanı olan, aksi belirtilmeyen (not otherwise specified designations, NOS) glioblastoma (60).

Glioblastom cerrahi operasyon, radyoterapi ve standart kemoterapilere rağmen ortalama sağ kalım süresi 13-15 ay arasında değişen agresif primer beyin tümörüdür (10). GBM için henüz güvenli ve etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Standart tedavi beyin cerrahisini takiben radyoterapi ile temozolamide (TMZ)

tedavisidir. GBM tümörleri %100 oranında nükseder ve bu nükseden tümörlerin tedavisi özellikle cerrahi işlem görmüş, radyoterapi ve kemoterapi almış hastalarda çok daha zordur. Sadece iki ilaç şu anki standart tedavilerde kemoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır: Gliadel ve TMZ, her biri ayrı ayrı sağ kalımı yaklaşık 2 ay artırmaktadır (10–12), fakat ikisi de birçok yan etkiye sebep olmaktadır.

2.4. Glioblastoma ve Progesteron İlişkisi

Erişkinlerde gliomanın insidans oranı erkeklerde kadınlardan% 50 daha fazladır (61). Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki yaşa göre düzeltilmiş yıllık insidans oranı erkeklerde 100.000 iken 7.6 ve kadınlarda 100,000'de, erkek-kadın fazlalığı zamanla sabit kalmıştır ve uluslararası alanda belirgin bir şekilde görülmektedir.

Ayrıca, erkeklerle karşılaştırıldığında GBM'in kadınlar için oranı menopoza öncesi yıllarda azalmaya başlayıp ve 50-54 yaş aralığında 0.51'e ulaşmaktadır. Daha sonra, bu oran artmış ve kadın hormonlarının azalan seviyelerine paralel olarak yaklaşık 0.65 sabit bir seviyede kalmıştır (62).

Bu bulgular, kadın hormonlarının gliomagenез üzerinde bazı önleyici etkilere sahip olduklarını güçlü bir şekilde göstermektedir. 2011 yılında Cowppli-Bony ve ark. beyin tümörlerinde steroid hormonlarının rolüne ilişkin gözden geçirme çalışmasını yayınladılar. Sonuçları tutarlı bir şekilde, gebe kadınlarda veya postmenopozal hormon değişim tedavisi (hormone replacement therapy, HRT) ve kontraseptiflerle tedavi edilen kadınlarda glioma riskinde bir azalma olduğunu ortaya koymuşlardır. Diğer tutarlı sonuçlar geç ergenlik veya menopoza dönemindeki kadınlarda glioma riskinde artış ve gliomaların aksine HRT ile meningiom riskinde artış içermektedir (63).

Bu konuda en çarpıcı çalışmalardan biri; Atif ve ark. tarafından 2015'te yapılan yüksek doz P4'ün GBM tümör büyümesini büyük ölçüde düşürdüğünü ve fibroblast ile sağlıklı primer kortikol nöronlarda apoptoz başlatmadığını rapor ettikleri çalışmadır. Bu çalışmada, bağışıklığı baskılanmış fare modeli kullanarak P4 ile 8

günlük tedavi sonrasında tümörlerin büyümesini yarı yarıya inhibe ettiğini, angiogenezi durdurduğunu ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmanın bir diğer sonucu olarak, bağışıklığı baskılanmış farelerde P4'e bağılı herhangi bir doku toksisitesi gözlenmemiştir. Bağışıklığı baskılanmış fare modellerinde, P4 sadece 8 günlük tedavi sonrası nöroblastomaların büyümesini yaklaşık %50 inhibe etmiş ve ayrıca tümör büyümesini ile angiogenezi durdurmuş, apoptozu indüklemiş ve hiç normal doku toksisitesi göstermemiştir (17).

Altınöz ve ark. derlemesinde de progesterone gibi antiprogesterinlerin veya yüksek doz progestinlerin yüksek dereceli glial tümörlerin tedavisinde etkili olabileceğı ve bu yönde yapılan çalışmaların önemi vurgulanmıştır (64).

Tüm bu araştırmaların ışığında çalışmanın amacı P4'ün anti-proliferatif ve apoptotik etkisinin, hücre hatlarının proteomik profilleri üzerindeki değişimini incelemektir.

2.5. Proteomik Yaklaşımlar

Protein ve genom sözcüklerinin birleştirilmesi ile oluşturulan proteom; yaşayan bir sistemdeki proteinlerin tümüdür. Proteomik ise proteinlerin analizini yani proteinlerin yapısal, kimyasal özelliklerinin belirlenmesini, işlevlerinin aydınlatılmasını kapsar.

Canlı sistemlerde proteom dinamikdir, hücresel işlevlerle ve zamanla değişir. Proteomik çalışmalarının temel amacı proteinlerin birbirinden ayrılması ve tanımlanmasıdır. Proteomik, genellikle biyokimyasal yöntemlerle proteinlerin büyük ölçekli bir çalışmasıdır (65).

Proteomik kelimesi geleneksel olarak iki boyutlu poliakrilamid jelleri üzerinde belirli bir hücre hattından veya organizmadan çok sayıda proteinin gösterilmesiyle ilişkilendirilmiştir (66–68). Bu anlamda proteomik, 1970'lerin sonlarına doğru, araştırmacılar, yeni geliştirilen iki boyutlu jel elektroforezi tekniğini kullanarak protein veri tabanları oluştırmaya başladıkları zamana kadar uzanmaktadır (69). Bu,

ifade edilen tüm proteinlerin veri tabanlarını oluşturmak için, iki boyutlu jellerdeki spotların kapsamlı bir şekilde kataloglanmasıyla sonuçlanmıştır.

Veritabanlarında çok miktarda DNA dizi analizlerinin birikmesiyle birlikte, araştırmacılar, sadece tam bir genom dizisine sahip olmanın biyolojik işlevi açıklamak için yeterli olmadığını anladılar. Bir hücrenin normal olarak hayatta kalabilmesi, çok sayıda metabolik ve düzenleyici yola bağlıdır. Genler ve tamamlayıcı proteini ile bir hücrenin proteomu arasında katı bir doğrusal ilişki yoktur. Proteomik, genomiğe tamamlayıcıdır çünkü hücrelerdeki aktif ajanlar olan gen ürünlerine odaklanır. Böylece hemen hemen tüm ilaçlar proteinlere karşı yöneltildiği için proteomik doğrudan ilaç geliştirilmesine katkıda bulunur (65).

Proteomik, gen işlevinin doğrudan protein düzeyinde geniş çaplı çalışması için güçlü bir araç seti, biyolojik bilimler üzerinde en önemli ve doğrudan etkisi olacak zengin protein-protein etkileşim verileri sağlar. Proteinler, genlerden ziyade fonksiyona bir adım daha yakın oldukları için, bu çalışmalar sıklıkla biyolojik keşiflere ya da hipotezlere yol açar. Birçok insan geninin tam uzunluktaki hazır klonları, birçok proteomik stratejiyi mümkün kılacak genom projelerinin çok önemli bir uzantısıdır (65).

2.5.1. İki boyutlu jel elektroforezi

Patrick O'Farrel tarafından 1975 yılında geliştirilen iki boyutlu jel elektroforezi metodunda yıllar içinde çeşitli iyileştirmeler yapılmıştır (69). Yöntem; birinci boyutta izoelektrik odaklanma ve ikinci boyutta poliakrilamid jel elektroforezinden oluşmaktadır. Öncelikle birinci boyutta bir şerit jel üzerinde izoelektrik noktalarına göre ayrılan proteinler, ikinci boyutta moleküler ağırlıklarına göre poliakrilamid jelde yürütülürler. Yöntemin en ilk basamağı proteinlerin denatürasyonu ve jeldeki çözünürlüğüdür. Rehidrasyon tamponunda kullanılan üre ve tiyoüre gibi kimyasallar ile proteinlerin kovalent olmayan bağları zayıflatılır ve açılır. İkinci boyutta jelde ayırmada ise iyon içeren deterjanlardan biri olan "Sodyum Dodesil Sülfat, SDS" ile proteinlerin içindeki aminoasitler etkileşime girerek denatürasyonu artırmaktadır. İki boyutlu jel elektroforezinde teknoloji ile yapılan iyileştirmeler daha iyi odaklanma sağlayan immobilize şerit jeller, yüksek bağlanma

duyarlılığına sahip boyalar, jel görüntüleme ve analizindeki gelişmeler yöntemin gelişmesine destek olmuştur (70).

İki boyutlu jel elektroforezinin jeller laboratuvarlar arasında tekrarlanabilir bir şekilde yürütülebildiklerinde bile proteinlerin kimliğinin saptanması, protein karakterizasyonu için hassas ve hızlı analitik metotların eksikliği nedeniyle zor bir tekniktir. Buna rağmen jelle ayrılmış proteinlerin kütle spektrometrik çalışması, protein fonksiyonuna biyokimyasal yaklaşımlarda bir rönesansa yol açmıştır (65).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereç

Kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1 Kullanılan cihaz ve malzemeler

| Kullanılan Cihaz ve Malzemeler | Marka/Model |
|---|--|
| MALDI TOF/TOF Kütle Spektrometresi | RapifleX MALDI Tissue typer Bruker Daltonics |
| Jel Görüntüleme Cihazı | Chemidoc Imaging System Biorad |
| Izoelektrik Fokuslama Cihazı | Protean i12 IEF Cell Biorad |
| İkinci Boyutta Ayrım Cihazı | Serva Electrophoresis GmbH |
| Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler | Thermo Scientific |
| Santrifüj | MicroL17 Thermo Fischer Scientific |
| Derin Dondurucu Buzdolabı (+40C ve -200C) | Kirsch Medical |
| Derin dondurucu (-800C) | Haier Biomedical |
| Hassas Analitik Terazı | Kern ABJ |
| Etüv (370C) | Hera Term Oven Thermo Scientific |
| Otoklav | Nüve SteamArt |
| pH Metre | Thermo Scientific |
| Vorteks | VWR VV3 |
| Mikro Hacimli Spektrofotometre | Hitachi U-1900 |
| Çalkalayıcı Isı Bloğu | Witeg Wisd Laboratory Instruments |
| Azot Tankı | Thermo 30 Thermo Scientific |
| 0,5, 1,5 ve 5 mL Hacimli kapaklı Tüpler | Axygen ve Eppendorf |
| Çeşitli Hacimlerde Pipet Uçları (0.1-1000 µL) | Axygen |
| 5, 10 ve 25 mL hacimli Steril Serolojik Pipetler | Isolab |
| Çeşitli Cam Malzemeler | Isolab |
| Spot Kesme Aleti | 2D Spot Picker Gel Company |
| xCELLigence® RTCA DP | Acea Biosciences,Inc. |
| Biyogüvenlik Kabini | Safe 2020 Thermo Scientific |

| | |
|-------------------------|--|
| Etüv | Steri-Cycle, CO ₂ Incubator Thermo Scientific |
| Santrifüj | Labofuge 400 Thermo Scientific |
| Invert Mikroskop | Primo vert Zeizz |
| Su Banyosu | St 30 Nüve |

Kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 2 Kullanılan kimyasal malzemeler

| Kullanılan Kimyasal Maddeler | Firma/Kodu |
|--|---------------------------------|
| Sodyum klorür (NaCl) | Sigma, 433209 |
| (Hidroksimetil)aminometan (Tris) | Sigma, 252859 |
| Sodyum dodesil sülfat (SDS) | Sigma, 862010 |
| Üre (CH₄N₂O) | SERVA Electrophoresis, 24525.01 |
| Tiyüre (CH₄N₂S) | Merck, 107979 |
| 3-((3-kolamidopropil) dimetilamonyo)-1-propansülfonat (CHAPS) | SERVA Electrophoresis, 17038.03 |
| Bromofenol mavisi | Sigma, B0126 |
| pH 3-10 Amfolit | SERVA Electrophoresis, 43368.01 |
| DL-Dithiothreitol (DTT) (C₄H₁₀O₂S₂) | GE Healthcare, 17-1318-02 |
| Gliserol | Sigma, G5516 |
| Benzonase | Merck, 70746-3 |
| Kloroform (CHCL₃) | Sigma, 288306 |
| 2D Quant Kit | GE Healthcare, 80648356 |
| Lightning Red Floresans Boya | SERVA Electrophoresis, 43400.01 |
| İyodoasetamit (C₂H₄INO) | GE Healthcare, RPN6302 |
| Asetonitril (C₂H₃N) | Merck, 100029 |
| Amonyum bikarbonat (NH₄HCO₃) | Merck, 5.33005 |
| Tripsin | Promega, V5111 |
| Trifloro asetik asit (TFA) (C₂HF₃O₂) | Sigma, T6508 |
| A-siyano-4-hidroksisinamik asit (α-CHCA) | Proteochem, p9100 |
| Bovin serum albumin (BSA) | Bruker Daltonics, 8217498 |
| Peptid Standartı | Bruker Daltonics, 8222570 |
| Dmem W/Glutamax-I PYR-IG/L-GLU | Thermo Fisher, 21885025 |
| DPBS, calcium, magnesium | Thermo Fisher, 14040091 |
| 100 mm Tc-Treated culture dish | Corning, 430167 |
| Cell Lifter | Corning, 3008 |
| Etanol (C₂H₆O) | Merck, 111727 |

| | |
|--|-------------------------|
| Trypsin Gold | Promega, V5280 |
| Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) | Thermo Fisher,15140122 |
| Trypan Blue Solution, 0.4% | Thermo Fisher, 15250061 |
| Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red | Thermo Fisher, 25200056 |
| Fetal Bovine Serum | Thermo Fisher, 10270106 |
| Progesterone \geq99% | Sigma, P0130-25G |

Bu tez çalışması Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi araştırma laboratuvarında, 2016-2018 yılları içinde yapılmıştır. Araştırma hücre kültürü (xCELLigence) çalışmalarını takiben iki boyutlu jel elektroforezi ve jelden protein tanımlanmasını içeren proteomik çalışmalar ile devam etmiştir.

Çalışmada glioblastoma örnek hücre hatları U87MG ve A172 kullanılmıştır. xCELLigence deneyleri ve iki boyutlu jeller her örnek için 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Araştırmanın hipotezi; yüksek doz P4'ün, GBM hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkisi, hücre yaşamında önemli yollarda görevli proteinleri etkilemesi gerekmektedir.

İki boyutlu jel elektroforezinin, birinci boyutta proteinlerin şerit jel üzerinde ayrılmasının düzgün olabilmesi için optimizasyon çalışmalarının zaman ve maddi destek gerektiren bir işlem olması, total proteomu ayırmada limitli bilgi sağlaması, jel yüzeyinde görüntülenebilen ve yazılımda analiz edilebilen her spotun yeterli protein konsantrasyonunda olmadığı için tanımlanmasının yapılamaması, keratin kontaminasyonuna açık bir deney düzeninin bulunması gibi limitasyonları bulunmaktadır.

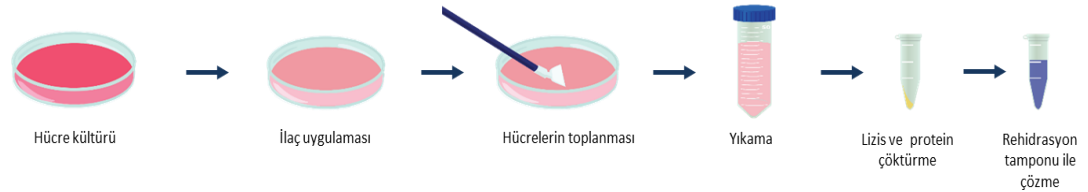
3.3.Yöntem

3.3.1. Araştırma düzeni

Öncelikle hücre hatları üzerinde xCELLigence deneyleri yapılmıştır (Şekil 7). xCELLigence deneyleri sonucuna göre belirli dozlarda ilaç uygulanan hücre kültürü örneklerinin uygun şekilde proteinleri izole edilerek iki boyutlu jel elektroforezinde yürütülmesi ile devam etmiştir (Şekil 8).



Şekil 8 xCELLigence Sistemi. Hücre canlılığını ve sitotoksiteyi araştırmak için deneysel iş akışı



Şekil 9 İlaç uygulaması ve örneklerin toplanması iş akışı

3.3.2. Hücre kültürü çalışmaları

Tüm hücre kültürü çalışmaları Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı hücre kültürü odasında bulunan hücre kültürü kabinlerinde, steril ortamda gerçekleştirildi. Her çalışma öncesi ve sonrası kabin UV ışık kullanılarak, kabin ve kabinde kullanılacak malzemeler çalışma öncesi %70 etanol ile silinerek sterilize edildi.

3.3.2.1.Hücrelerin uygun koşullarda büyütülmesi

Çalışmada ATCC (American Type Culture Colection) firmasından temin edilen glioblastoma multiforme kökenli U87MG (ATCC HTB-14) ve A172(ATCC CRL-1620) hücre hatları kullanılmıştır.

Temel Besiyeri: Gibco DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) GlutaMax (500 mL) içerisine %1 (5 mL) Penicillin-Streptomycin (10000 U/mL) eklendi ve iyice karıştırıldı. 50 mL'lik steril falkonlara 45'er mL olarak bölündü.

Tamamlanmış Besiyeri: Hazırlanan besiyeri içerisine (45 mL), %10 (5 mL) Fetal Bovin Serum (FBS) eklendi. Besi yerlerinin kapakları parafilm ile sarılarak +4°C'de saklandı.

PBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) 50 mL'lik falconlara bölünerek +4°C'de saklandı.

Kriyovial tüplerde -150°C'de saklanan hücre hatları stokları 37°C su banyosunda 3 dakika bekletilerek tamamen çözüldü.

Hücre hatları ilk ekim için iki kez %20 FBS'li tamamlanmış besiyerinde çözülüp 200 g'de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları atıldı, pelle 6 mL tamamlanmış besiyerinde pipetaj ile çözülerek 100 mm'lik platelere ekildi.

3.3.2.2.Hücrelerin büyütülmesi, pasajlanması ve sayılması

Hücre ekilen plateler; steril 37°C, %5 CO₂'li inkübatörlere kaldırıldı. Hücreler plate yüzeyinin %70-%80'lik kısmını kapladıktan sonra pasajlanma yapıldı.

Pasaj için önce platelerdeki besiyeri uzaklaştırıldı. Plateler 6 mL DPBS ile yıkandı ve her bir plate 1 mL Tripsin-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) eklendikten sonra yaklaşık 2 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyondan sonra 5 mL tamamlanmış besiyeri eklendi ve hücreler yavaşça pipetlenerek plate yüzeyinden kaldırıldı, 15 mL'lik falkonlarda toplandı. 200 g'de 8 dakika santrifüjlendi. Santrifüj

sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pelle 5 mL tamamlanmış besiyeri içerisinde iyice pipetlenerek çözüldü. Hücre süspansiyonundan 10 µL alınıp bir ependorf tüpünün içerisinde 10 µL tripan blue (Thermo Fisher) ile pipetajarak karıştırıldı. Karışımdan 10 µL alınıp thoma hemositometre (Isolab) lamına yüklendi.

Tripan blue (Thermo Fisher) ile sayım yönteminde; ölü hücreler işlevsiz Na⁺/K⁺ ATPaz pompaları nedeniyle boyayı içine çekmekte ve dışarı atamamakta, bu yüzden ölü hücreler mavi renkte, canlı hücreler sarı-yeşil renkte gözükmektedirler (71). Thoma lamı (Isolab) invert mikroskopta her iki tarafındaki kare içindeki canlı hücreler sayılarak canlı hücre sayısı; “sayılan karedeki hücrelerin ortalaması x seyreltme oranı x 10⁴” formülü ile hesaplandı. Sayılan ve miktarı belirlenen hücreler, içerisinde 8 mL tamamlanmış besiyeri bulunan 100 mm’lik platalere 1x10⁶ hücre olacak şekilde ekildi ve kültürleme sürecine devam edildi.

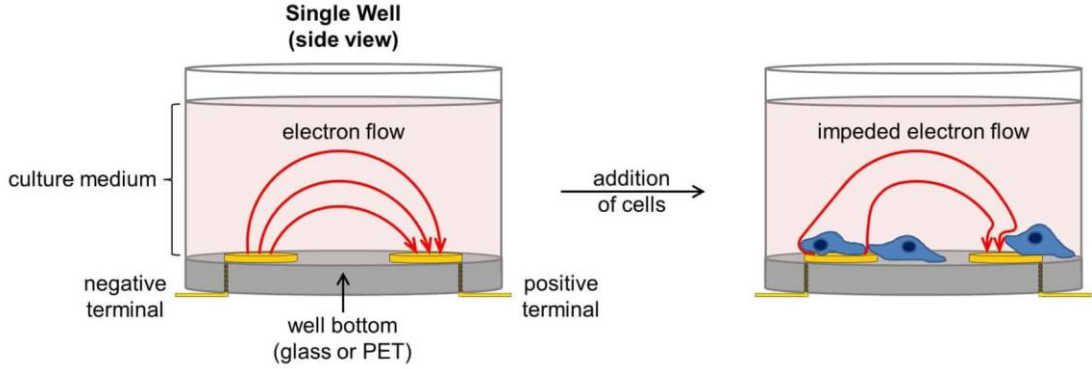
3.3.2.3.xCELLigence Deneyleri

xCELLigence sistemi

xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analyzer) DP (dual purpose) cihazı, işaretlenmeye gerek duymadan, gerçek zamanlı bir şekilde hücre proliferasyonunu, morfolojisini ve bağlanma kalitesini ölçmek için non-invaziv elektriksel empedans izlemesini kullanır. Cihaz standart bir CO₂’li hücre kültürü inkubatorüne yerleştirilir ve inkubatörün dışında bulunan kontrol ünitesine (dizüstü bilgisayar) bir kablo ile bağlanıp, kontrol edilir. RTCA yazılımı, gerçek zamanlı veri görüntüleme ve analiz fonksiyonlarını içermektedir.

Hüresel empedans ölçümünün fonksiyonel birimi, bir mikrotitre plakasının kuyu tabanına kaynaşmış bir dizi altın mikroelektrottur. Elektriksel olarak iletken bir solüsyon (tampon veya standart besiyeri gibi) eklendiğinde, elektrotlar boyunca bir elektrik potansiyelinin uygulanmasına, elektronların negatif terminalden çıkmasına, eklenen çözeltilerden geçmesine ve ardından devrenin tamamlanması için pozitif terminale göç etmesine neden olur. Bu eklenen çözeltilerle etkileşime giren elektrotlara bağlı olduğundan, elektrot çözeltileri ara yüzeyine yapışan hücrelerin varlığı elektron akışını engeller. Bu empedansın büyüklüğü hücre sayısına, hücrelerin büyüklüğüne, şekline ve hücre- substrat ilgisinin kalitesine bağlıdır. En önemlisi, ne

altın mikroelektrot yüzeylerinin ne de uygulanan elektrik potansiyelinin (22 mV), hücre sağlığı veya davranışı üzerinde bir etkisi yoktur (Şekil 8).



Şekil 10 Hücresel empedans aparatına genel bakış.

Hücreler eklendikten önce ve sonra tek bir kuyunun yandan görünümü gösterilmektedir. Ne elektrotlar ne de hücreler ölçeklidir (netlik için büyütülmüştür). Hücrelerin yokluğunda elektrik akımı serbestçe kültür ortamı boyunca akar, elektrotlar arasındaki devreyi tamamlanır. Hücreler elektrotlar üzerine yapıştıkça ve çoğaldıkça akım akışı engellenir, hücre sayısının, hücre boyutunun / morfolojisinin ve hücre-substrat bağlanma kalitesinin son derece hassas bir şekilde okunması sağlanır.

Hücrelerin E-Plate'e yüklenmesi ve cihaza konulması

E-Plate kuyucuklarına 100µl besiyeri eklenir ve arka plan taraması yapıldı. Daha sonra besiyeri alınarak hücreler U87MG ve A172 sırasıyla 200 µl besiyeri içerisinde 5000 hücre/kuyucuk, 7500 hücre/kuyucuk olacak şekilde hazırlandı, E-Plate'e ekildi. E-Plate oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, ardından inkübatörde bulunan RTCA cihazına yerleştirildi. Hücrelerin logaritmik çoğalması cihaz ile gözlemlendi.

İlaç hazırlanması ve uygulanması

Progesteron üretici firmanın verdiği yönergeler göre; 20mM için 0,001g (1mg), 1 mL etanol 49 mL DMEM içerisinde iyice çözüldü ve 0,22 mm filtereden geçirildi ve steril falkonlara bölündü. -20°C'de saklandı.

İlaç uygulaması için 20 mM stok progesteron ilaç çözeltisinden 100 µM ve 300 µM progesteron içeren 10'ar mL'lik besiyeri ve kontrol grubu için %30 filtre edilmiş EtOH içeren 10 mL besiyeri hazırlandı. Hücrelerin logaritmik fazlarının ortasında, U87MG ve A712 hücre hatları için sırasıyla 18. ve 22. saat sonunda besi

yerleri çekilerek 200 µl farklı konsantrasyonlardaki progesteron içeren besiyeri eklendi. E-Plate inkübatördeki cihaza yerleştirilir.

Hücrelerin takibi

Hücrelerin ilaca cevabı gerçek zamanlı olarak xCELLigence cihazından takip edildi. İlaç uygulamasından 72 saat sonra deney sonlandırıldı. Veriler RTCA 2.1.0 yazılımı ile analiz edildi.

3.3.3. *In vitro* çalışma dizaynı

U87MG ve A172 hücre hatları proteomik analizler için yeterli miktar hücre sayısına ulaşmaya kadar uygun kültür şartlarında büyütüldü.

3.3.3.1. Hücre kültürü ve ilaç uygulaması

Her analiz için üç biyolojik tekrar oluşturuldu. Kontrol grubu, 100uM ve 300uM ilaç uygulaması yapıldı. İlaç uygulamaları daha önce yapılan xCELLigence deneylerine göre U87MG ve A172 için sırasıyla hücre ekiminden itibaren 18. ve 22. saatte yapıldı. Daha sonra hücreler ilaç uygulamasından 72. saat sonra besiyerleri uzaklaştırılarak kazıyıcı yardımıyla toplandı ve proteomik analizler için pellet şeklinde donduruldu.

3.3.4. Proteomik çalışmalar

3.3.4.1. Hücrelerin 2D analizi için hazırlanması

Dondurulmuş pelletler protein ekstraksiyon tamponu (8 mol/L Üre, 4% (w/v) CHAPS, 40 mmol/L Tris, 0.2% (w/v) Bio-Lyte 4/7 Ampholyte, 1 mM DTT) ile homojenize edildi. Metanol/kloroform çöktürme yöntemiyle tuzlardan ve diğer kontaminantlardan arındırılması yapıldı. Bu aşamadan sonra çöktürülmüş protein pelleti 2D çalışması için uygun tamponda (7M üre, 2M tiyoüre, Proteaz inhibitörü, % 4 CHAPS, %0.1 Bromofenolblue) çözülüp analize hazır hale getirildi.

3.3.4.2. Protein konsantrasyonu ölçme yöntemi

Protein konsantrasyonu ölçme yöntemi olarak 2 farklı teknik kullanılmıştır.

Bradford protein konsantrasyonu ölçümü

Bovin Serum Albümin (BSA) protein standartları (0, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 900, 1000 µg/mL) hazırlanmış ve örneklerle eş zamanlı olarak 96 kuyucuklu tabaka içinde Bradford boyası ile karıştırılarak 595 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Standartlara göre örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir. (Bradford kit manueeli)

2-D Quant kit (GE Healthcare) ile protein konsantrasyonu ölçümü

Kit protokolüne uygun olarak protein konsantrasyonu ölçülmüştür. (72)

3.3.4.3.İki boyutlu jel elektroforezi

İki boyutlu jel elektroforezi; proteinlerin öncelikle birinci boyutta pH gradyanı belli bir şerit jel üzerinde yüklenip elektrik akımı verilerek izoelektrik noktalarına göre ayrılmasının sağlanması daha sonra bu şeritin SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi) üzerinde moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasının sağlanmasıyla oluşur.

Rehidrasyon aşaması

Çalışmada tüm protein örnekleri için 17 cm pH 3-10NL (non-lineer) IPG (immobilize PH gradyan) SERVA şerit jel kullanıldı. Öncelikle rehidrasyon tamponu içinde bulunan 100 µg protein, floresan boya (SERVA HPE lightning red dye) ile üretici firma protokolüne göre işaretlendi. Total hacim 300 µL olacak şekilde rehidrasyon tamponu ile tamamlandı. Hazırlanan örnek rehidrasyon tablası içine mikropipet yardımıyla yerleştirildi. Şerit jel, jel yüzeyi aşağı bakacak şekilde rehidrasyon tablasına yerleştirildi. Hava ile teması kesmek için üzerine mineral yağ dökülerek gece boyu 20°C’ de pasif rehidrasyona bırakıldı.

İzoelektrik fokuslama (IEF)

Gece boyu rehidrasyonda kalan şerit jel; jel yüzeyi üstte kalacak şekilde IEF Protean i12 IEF Cell (Biorad) cihazını tablasına artı (+) ucu pozitif tarafa denk gelecek şekilde yerleştirildi. Elektrotların altına H₂O ile ıslatılmış yaklaşık 0,5 cm

büyükluğündeki kağıt fitiller yerleştirildi ve cihazın elektrotları takıldı. Daha sonra hava ile temasın kesilmesi için şerit jel üzerine mineral yağ döküldü ve tabla cihaza yerleştirildi. Protokol tablo 3 deki parametrelere uygun olarak ayarlandı. Şerit jellerin 20°C’de toplamda en az 60000 voltu tamamlaması sağlandı.

Tablo 3 IEF Parametreleri

| Basamak | Voltaj | Gradyan | Akım | Zaman | Birim |
|---------|--------|---------|------|-------|--------|
| 1 | 100 | Rapid | 50 | 02:00 | HH:MM |
| 2 | 200 | Rapid | 50 | 01:00 | HH:MM |
| 3 | 500 | Rapid | 50 | 01:00 | HH:MM |
| 4 | 1000 | Rapid | 50 | 01:00 | HH:MM |
| 5 | 2000 | Rapid | 50 | 02:00 | HH:MM |
| 6 | 5000 | Gradual | 50 | 03:00 | HH:MM |
| 7 | 5000 | Rapid | 50 | 45000 | VoltHr |

Dengeleme

Birinci boyutta ayrımı tamamlanan şerit cihazdan çıkarıldı. Jelin ikinci boyutta ayrımına geçmeden önce SERVA 2DHPE™ Large Gel 12.5 % Kit protokolüne uygun olarak dengeleme solüsyonu içerisine ilk aşamada 1,8 gr üre, 120mg SDS, 50 mg DTT, ikinci aşamada 1,8 gr üre, 120mg SDS, 125 mg İAA eklenerek 15’er dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda muamele edildi.

İkinci boyutta ayrım, SDS-PAGE(Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi)

Dengeleme sonrası şerit jel solüsyondan çıkarılıp SERVA HPE™ yatay sistem BlueHorizon™ ve BlueTower (SERVA Electrophoresis GmbH) cihazına yerleştirilen poliakrilamid jel üzerindeki belirlenmiş alana jel yüzeyi aşağı bakacak şekilde yerleştirildi. Cihazın jel üzerindeki kapağı kapatılıp elektrotlar takıldı. Cihazın soğutucu sistemi 15°C’ye ayarlanıp, çalıştırıldı. Jel kitin protokolüne uygun olarak kısa zamanlı yürütme parametreleri tablo 4’deki gibi yürütüldü.

Tablo 4 Jel yürütme parametreleri

| Faz | Max Volt | Max mA | Max W | Zaman |
|------------------------------|----------|--------|-------|--------------|
| 1 | 100 V | 7 mA | 1 W | 30 dk |
| 2 | 200 V | 13 mA | 3W | 30 dk |
| 3 | 300 V | 20 mA | 5 W | 10 dk |
| Bu aşamada şerit jel alınır. | | | | |
| 4 | 1000 V | 40 mA | 30W | 3 saat 50 dk |
| 5 | 1500 V | 45 mA | 40 W | 40 dk |

Jellerin görüntülenmesi

Yürütülmesi tamamlanan jeller ChemiDoc MP Imaging System (Biorad Laboratories) ve Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) kullanılarak görüntülendi. Görüntüleme 100 µm çözünürlük derecesinde uyarım için 488 nm ve emisyon için 520 nm dalgaboyları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Görüntüledikten sonra jeller gece boyu fikse edilip ardından spot kesimine kadar %20 EtOH içerisinde +4°C’de saklanmıştır.

Jellerin Analizi:

Görüntüsü alınan jellerin PDQuest Advanced Software version 8.0.1 (Biorad Laboratories) yazılımında spot analizleri yapıldı. Tüm jel görüntüleri yazılıma yüklenip deney düzeneği oluşturuldu ardından jellerde spot seçimi duyarlılık, spot büyüklüğü, Gaussian dağılım seçilerek yapıldı. Yazılımın protokolü izlenerek jeller üzerindeki spotların analizleri master jel oluşturularak, gruplar içindeki farklılıklar en aza indirilerek tüm jellerde ortak olan spotlar belirlendi. Farklı yoğunluktaki spotların belirlenmesi için spotlara Student t-test uygulanıp ve p değeri $p < 0.05$ olanlar anlamlı kabul edildi.

Belirlenen spotların kesilmesi

PDQuest yazılımında anlamlı farklı olarak belirlenen spotlar spot kesme kalemi (2D Spot Picker, GelCompany) yardımıyla jelden kesilip protein Eppendorf LoBind

(Eppendorf) tüplere aktarıldı. Her kesimden sonra kalem %100 asetonitril (ACN) ile temizlendi.

Jel içinde proteinlerin parçalanması

Kesilen spotlar yıkama tamponu ile yıkandı (%50 asetonitril, %50 50 mM amonyum bikarbonat tamponu). Yıkamanın ardından, %100 asetonitril ile dehidrasyon sağlandı. Spotlara, 10 mM DTT ile redüksiyon yapıldı. Daha sonra, 55 mM iyodoasetamit ile alkilendi. Spotlar tekrar yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından %100 asetonitril ile dehidrasyon yapıldı. Spotlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Her bir örnek içine 125 ng tripsin olacak şekilde tripsin eklenip gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün tripsinizasyona uğramış proteinler jel parçaları içerisinde toplama tamponu ile yeni bir protein Eppendorf LoBind tüplere aktarılmıştır. Hazırlanan bu örnekler tamamen kurutulularak tuzdan arındırma işlemine hazır hale getirildi.

Peptit örneklerinin tuzdan arındırılması

Tuzlardan ve diğer kontaminant maddelerden temizleme işlemi Stage-Tip’ler ile gerçekleştirilmiştir. Stage-Tip pürifikasyonu için Rappsilber ve arkadaşlarının makalesindeki basamaklar takip edilmiştir (73).

Kütle spektrometrisi protein tanımlaması

Kütle spektrometrisi Bruker rapifleX™ MALDI Tissuetyper™ (Bruker Daltonics) cihazında MS ve MS/MS teknikleri kullanılarak AnchorChip tablası (Bruker Daltonics) ile analiz edildi. Örnekler analiz için 5 µL %60 ACN %0,1 TFA içeren tampon ile tekrar çözülerek analiz için hazırlandı. Matrix Uçal ve ark 2018’e göre hazırlandı (74). AnchorChip tabla yüzeyine öncelikle örnek 0,8 µL konuldu ve kuruması beklendi. Örnek kuruduktan sonra matrix 1 µL eklendi ve tekrar kuruması beklendi. Tabla cihaza yerleştirilip analiz edildi. 700-2600 Da kütle aralığında, lazer gücü tüm çalışma süresince sabit kalacak biçimde (%35-40 arasında), lazer vuruşu 300 olacak şekilde tamamlandı. Her bir çalışma öncesinde, metod kurulmadan önce üretici talimatına göre hazırlanmış peptid standartları (Peptid Std II, Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak kalibrasyon yapıldı. Elde edilen pik

listeleri FlexAnalysis yazılımı (Bruker Daltonics) kullanılarak MASCOT veritabanında (Matrix Science) tanımlanabilir formata dönüştürülmüş ve Uniprot insan referans proteom veritabanı kullanılarak tanımlama yapıldı.

Kütle spektrometrisi protein tanımlaması

Kütle spektrometrisi Bruker rapifleX™ MALDI TissueTyper™ (Bruker Daltonics) cihazında MS ve MS/MS teknikleri kullanılarak AnchorChip tablası (Bruker Daltonics) ile analiz edildi. Örnekler analiz için 5 µL %60 ACN %0,1 TFA içeren tampon ile tekrar çözülerek analiz için hazırlandı. Matrix Uçal ve ark 2018'e göre hazırlandı (74). AnchorChip tabla yüzeyine öncelikle örnek 0,8 µL konuldu ve kuruması beklendi. Örnek kuruduktan sonra matrix 1 µL eklendi ve tekrar kuruması beklendi. Tabla cihaza yerleştirilip analiz edildi. 700-2600 Da kütle aralığında, lazer gücü tüm çalışma süresince sabit kalacak biçimde (%35-40 arasında), lazer vuruşu 300 olacak şekilde tamamlandı. Her bir çalışma öncesinde, metod kurulmadan önce üretici talimatına göre hazırlanmış peptid standartları (Peptid Std II, Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak kalibrasyon yapıldı. Elde edilen pik listeleri FlexAnalysis yazılımı (Bruker Daltonics) kullanılarak MASCOT veritabanında (Matrix Science) tanımlanabilir formata dönüştürülmüş ve Uniprot insan referans proteom veritabanı kullanılarak tanımlama yapıldı.

Tanımlanan Proteinlerin Analizi

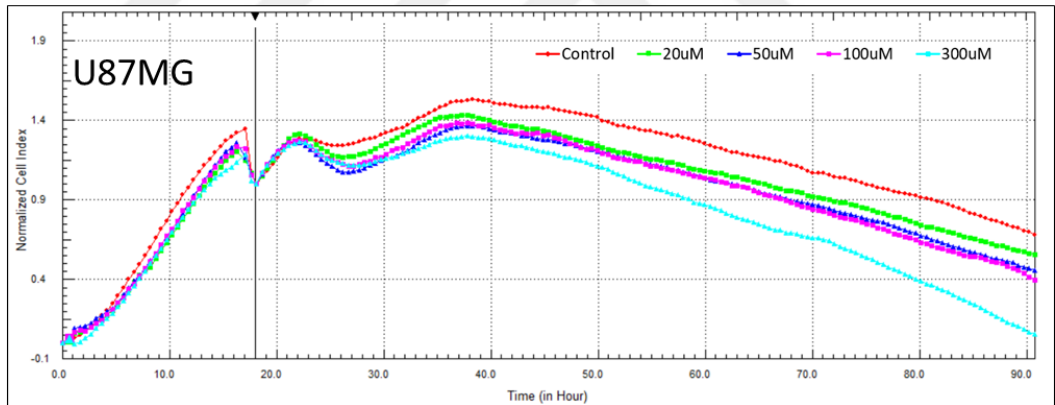
Tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyonlarını analizleri gene ontology, protein-protein etkileşimleri signor 2.0 veri bankaları kullanılarak gerçekleştirildi (75,76). Moleküler yerleştirme (Docking) ile progesteron, Siklin Bağımlı Kinaz-1 (CDK1) (PDB:5HQ0) ve Siklin Bağımlı Kinaz-2 (CDK2) (PDB:2EXM) proteinlerinin üç boyutlu yapıları protein veri bankasından (PDB) elde edildi (77). Yerleştirme analizi AutoDockTools (ADT) v1.5.4 ve Autodock Vina programları kullanılarak gerçekleştirildi (78,79). ADT programı moleküler yerleştirme öncesinde gerekli dosyaların hazırlanmasında kullanıldı. AutoDock Vina programı ile reseptör proteinlerin tüm yüzeyi için moleküler yerleştirme analizi yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. xCELLigence Bulguları

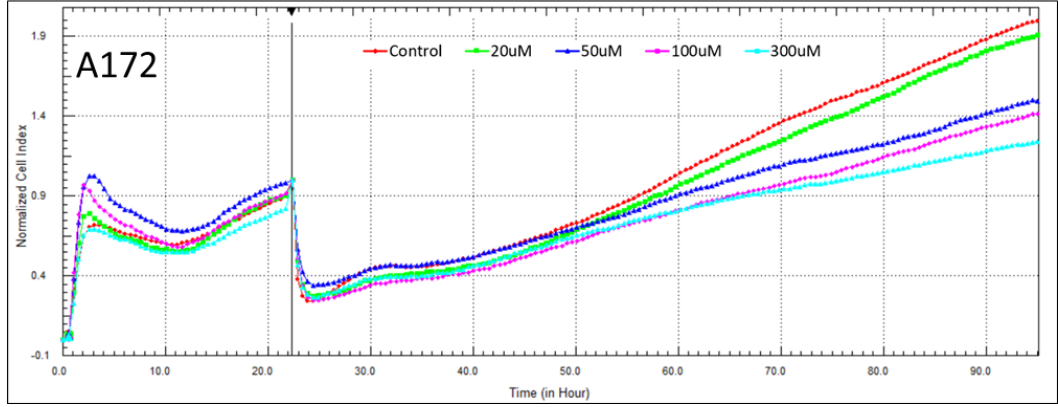
U87MG için 5000 hücre, A172 için 7500 hücre sayılarak e-plate'in kuyucuklarına ekildi. xCELLigence ölçümleri örnek başına 3 tekrar yapılarak tamamlandı. Hücre hatlarının dozlara cevap grafiği hücrelere P4 uygulamasının yapıldığı evrede normalize edilerek oluşturuldu.

xCELLigence cihazının oluşturduğu gerçek zamanlı ölçümlere dayalı veriler Şekil 11 ve Şekil 12 deki grafikler ile gösterilmektedir.



Şekil 11 U87MG hücre hattında RTCA yazılımı ile elde edilen grafik.

Kontrol: P4 verilmeyen, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 300 μ M konsantrasyonlarında P4 verilen hücreler isimlerine göre renklendirilmiştir. Grafik hücre hattına ilacın verildiği 18. saatte normalize edilmiştir.



Şekil 12 A172 hücre hücre hattında RTCA yazılımı ile elde edilen grafik.

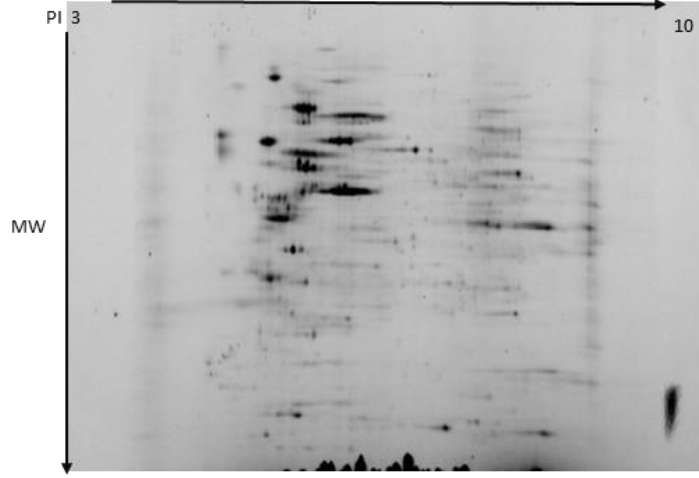
Kontrol: P4 verilmeyen, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 300 μ M konsantrasyonlarında P4 verilen hücreler isimlerine göre renklendirilmiştir. Grafik hücre hattına ilacın verildiği 22. saatte normalize edilmiştir.

Grafiklere göre hücre hatlarına P4 uygulaması yapılacak zaman ve P4'ün dozlara bağlı etkisi belirlenmiştir. En çok antiproliferatif etkinin görüldüğü 100 μ M ve 300 μ M dozları proteomik çalışma için seçilmiştir.

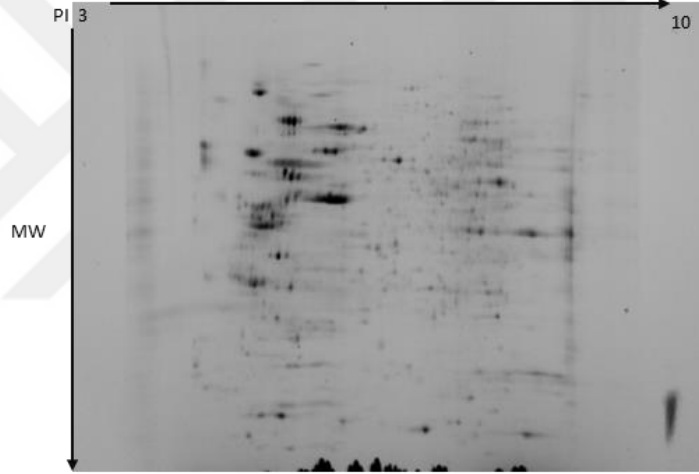
4.2. İki Boyutlu Jel Elektroforezi Bulguları

Her iki hücre hattı içinde kontrol (P4 uygulaması yapılmayan), 100 μ M ve 300 μ M konsantrasyonlarda ilaç uygulanan 3 deney grubu oluşturuldu. Genel proteomik profili görmek adına 17 cm, pH 3-10 şerit jeller kullanıldı. Jeller üçer tekrarlı olarak yürütüldü (Şekil 13 ve 14) ve PDQuest advanced yazılımı ile analiz edildi.

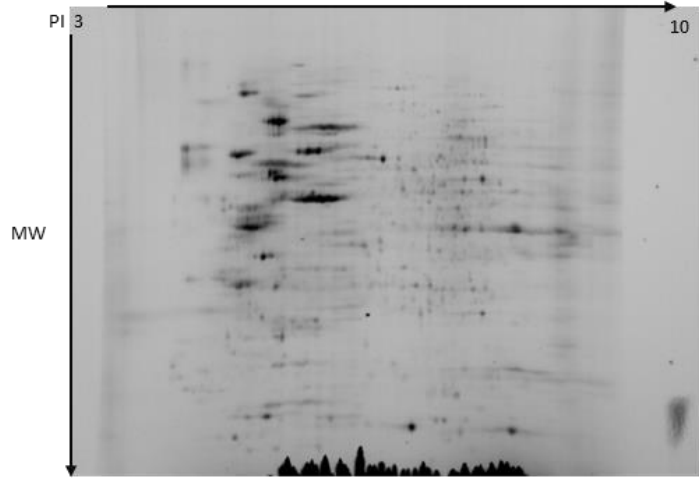
U87MG Kontrol



U87MG 100 μ M P4

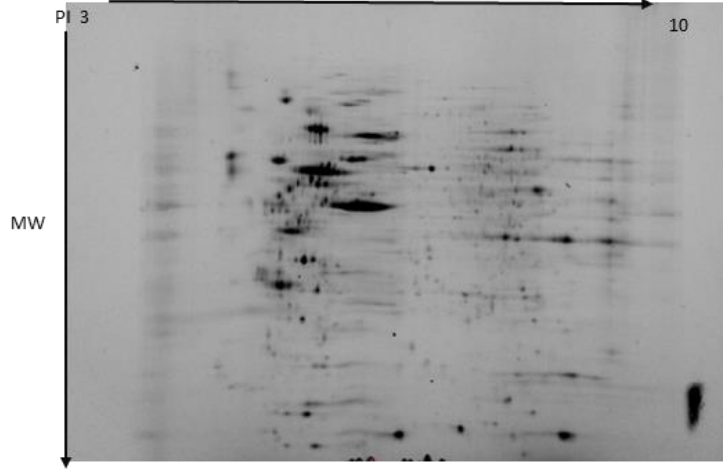


U87MG 300 μ M P4

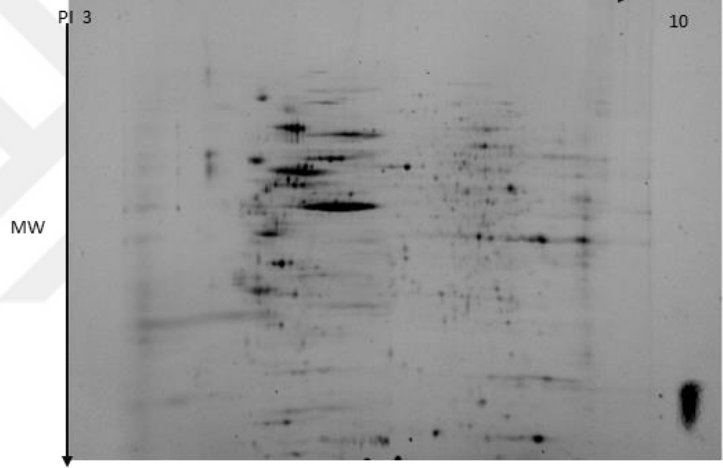


Şekil 13 U87MG örnek jel görüntüleri.

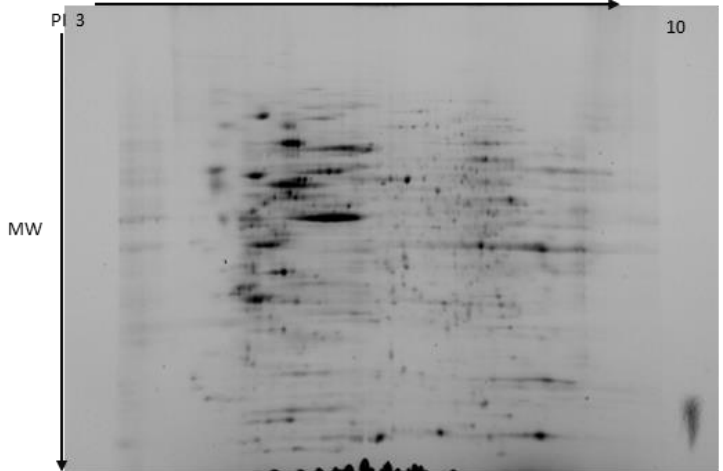
A172 Kontrol



A172 100 μ M P4

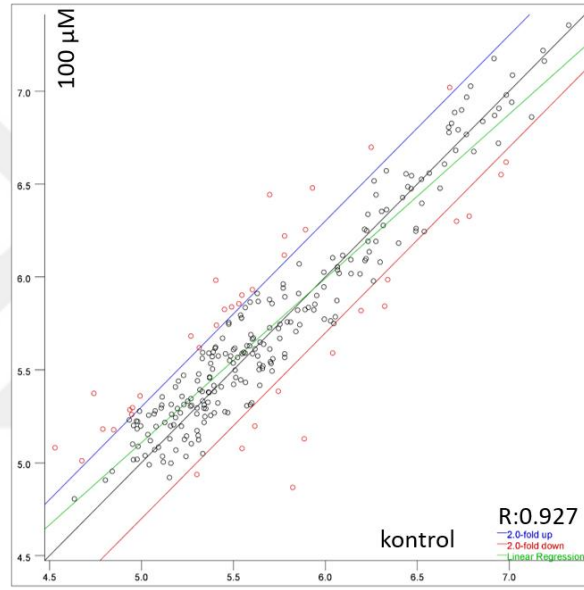


A172 300 μ M P4



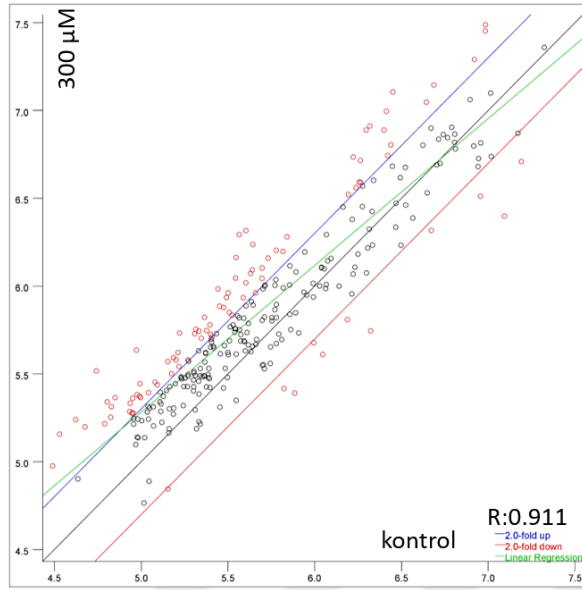
Şekil 14 A172 örnek jel görüntüleri.

U87MG ve A172 hücre hatlarından ayrı 2 deney grubu oluşturuldu jeller; kontrol, 100 μ M, 300 μ M şeklinde adlandırılıp 3'er tekrarlı şekilde programa yüklendi. PDQuest advanced software analizinde öncelikle aynı örneklerin tekrarlı jelleri arasındaki farklılıklar sıfırlandı, daha sonra protein spotları tek tek belirlenerek gruplar arası eşleşme yapıldı. Yazılımda lineer regresyon analizine göre; Kontrol-100 μ M ve Kontrol – 300 μ M arasındaki 2 kat farklılıkları gösteren saçılım grafikleri oluşturuldu (Şekil 15-18).



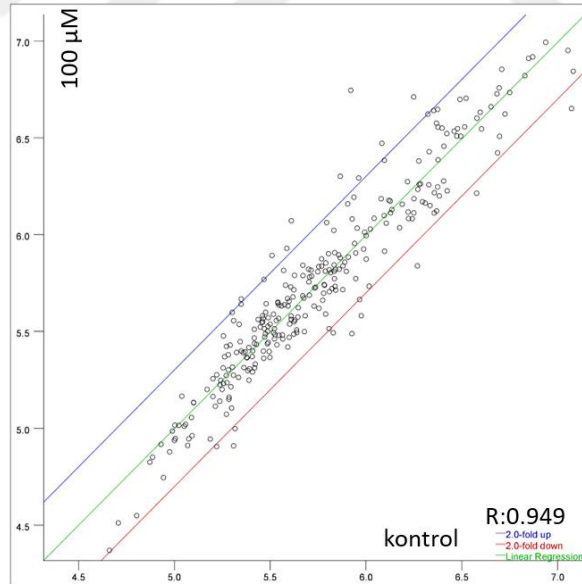
Şekil 15 U87MG hücre hattında 100 μ M P4 uygulanan ve kontrol örnekleri spotlarının saçılım grafiği

X eksenini Kontrol grubunu, Y eksenini 100 μ M ilaç verilen grubu göstermektedir. Kontrol ve 100 μ M arasında anlamlı farklılık gösteren spotlar 2.0 fold up ve down çizgileri üzerinde kalan noktalar tarafından temsil edilmektedir.



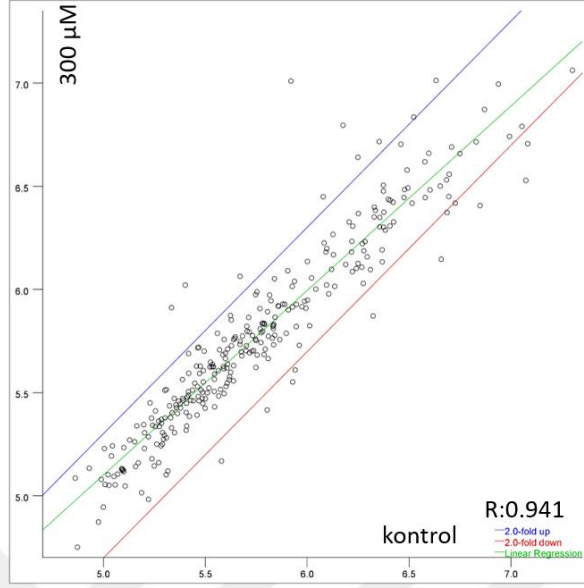
Şekil 16 U87MG hücre hattında 300 µM P4 uygulanan ve kontrol örnekleri spotlarının saçılım grafiği

X eksenini Kontrol grubunu, Y eksenini 300 µM ilaç verilen grubu göstermektedir. Kontrol ve 300 µM arasında anlamlı farklılık gösteren spotlar 2.0 fold up ve down çizgileri üzerinde kalan noktalar tarafından temsil edilmektedir.



Şekil 17 A172 hücre hattında 100 µM P4 uygulanan ve kontrol örnekleri spotlarının saçılım grafiği

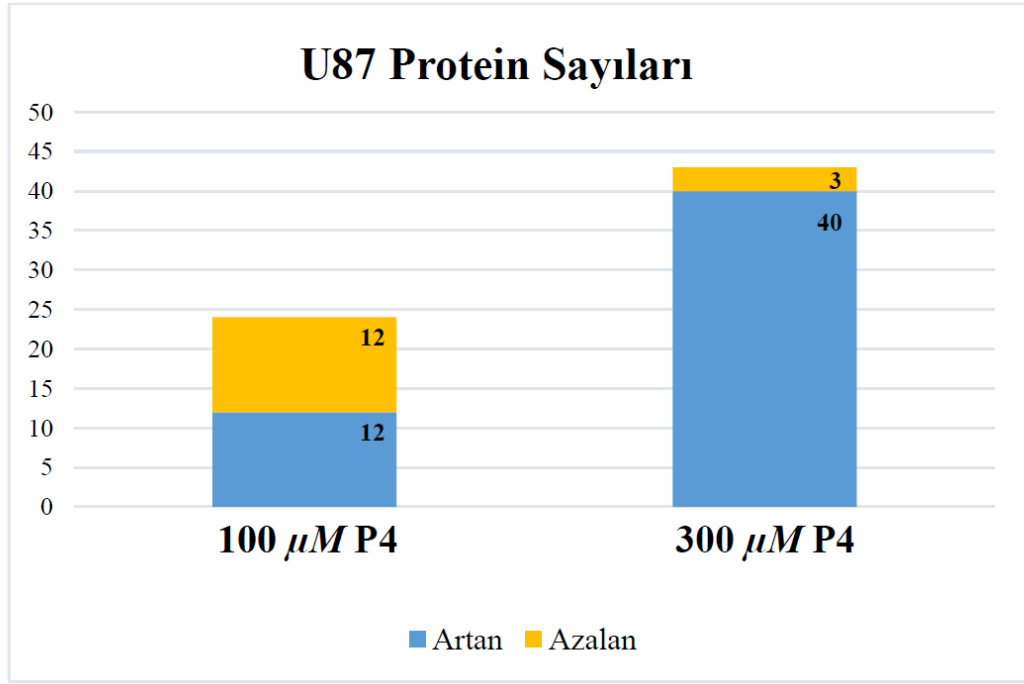
X eksenini Kontrol grubunu, Y eksenini 100 µM ilaç verilen grubu göstermektedir. Kontrol ve 100 µM arasında anlamlı farklılık gösteren spotlar 2.0 fold up ve down çizgileri üzerinde kalan noktalar tarafından temsil edilmektedir.



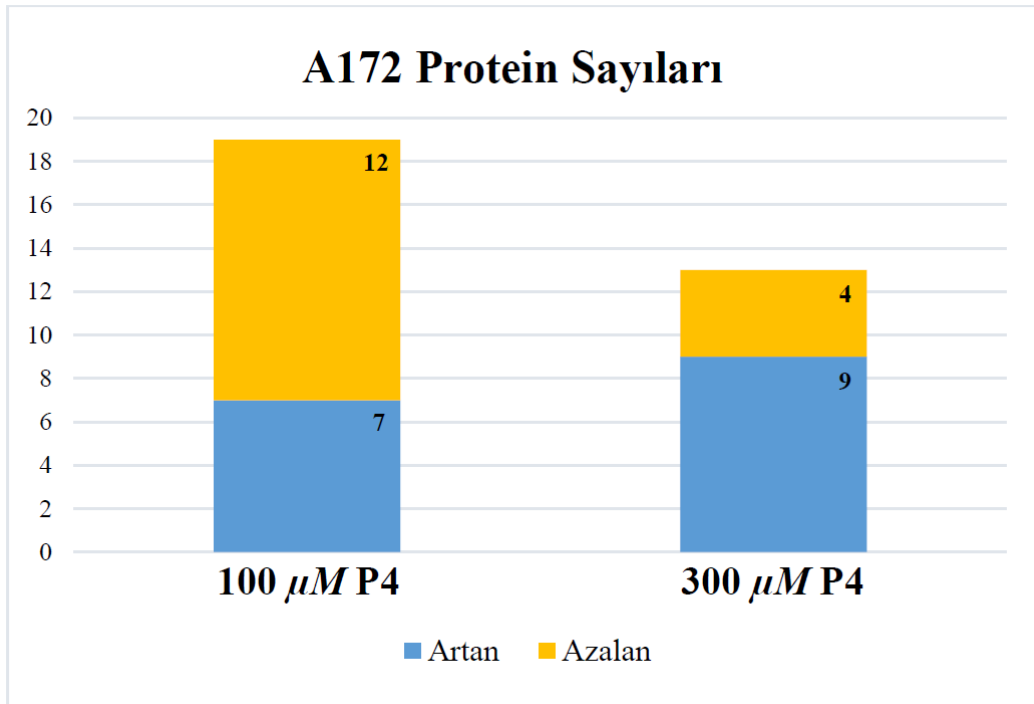
Şekil 18 A172 hücre hattında 300 µM P4 uygulanan ve kontrol örnekleri spotlarının saçılım grafiği

X eksenini Kontrol grubunu, Y eksenini 300 µM ilaç verilen grubu göstermektedir. Kontrol ve 300 µM arasında anlamlı farklılık gösteren spotlar 2.0 fold up ve down çizgileri üzerinde kalan noktalar tarafından temsil edilmektedir.

Bu grafiklere göre U87MG ve A172 jellerinden sırasıyla anlamlı farklılık gösteren 132 ve 66 spot yerleri tespit edilerek kesildi. Kesilen spotlardan U87MG’de 85, A172’de 40 tanesi tanımlandı (Ek 1). Tanımlanan spotların içerdiği protein sayıları Şekil 19 ve Şekil 20’de verilmiştir.



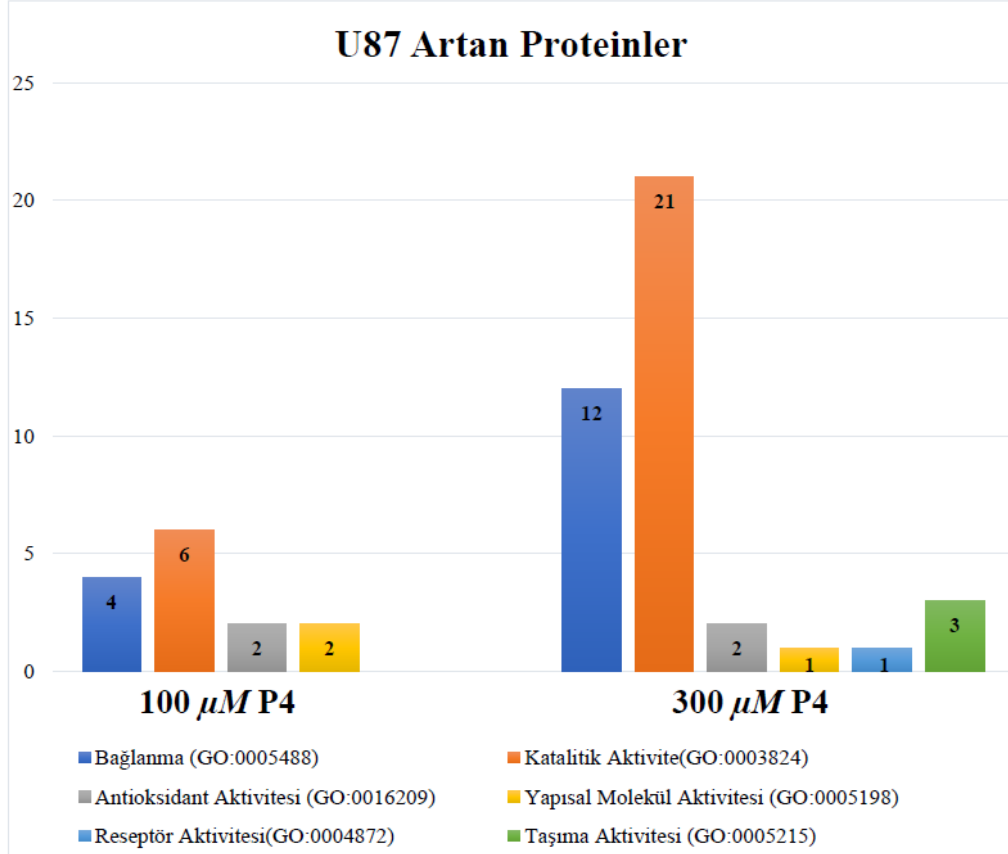
Şekil 19 U87MG hücre hattında anlamlı farklılık gösteren ve P4 dozlarına göre tanımlanan spotların sayıları



Şekil 20 A172 hücre hattında anlamlı farklılık gösteren ve P4 dozlarına göre tanımlanan spotların sayıları

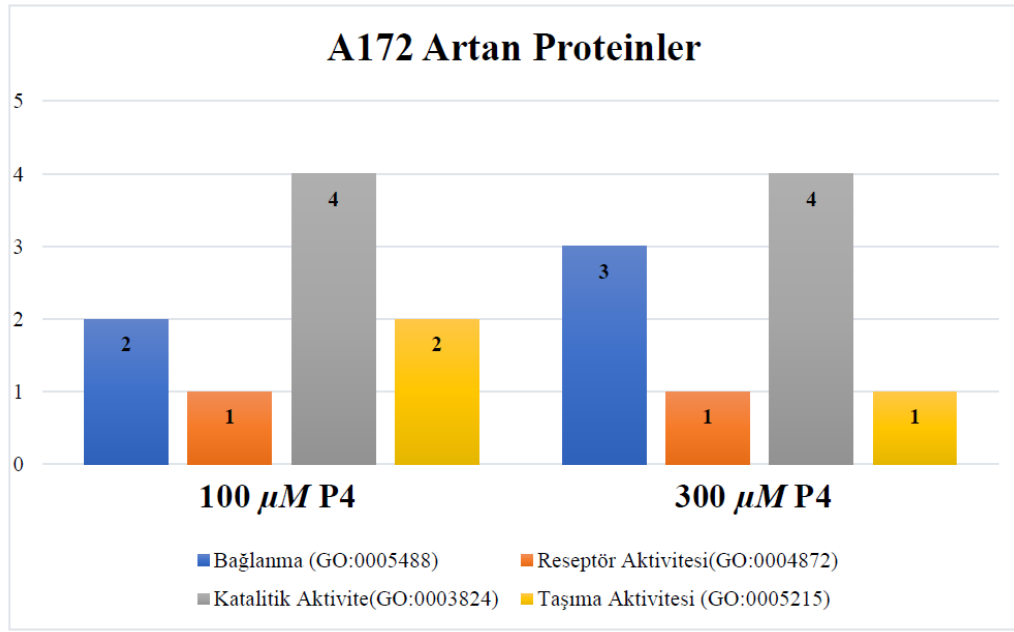
4.3. Tanımlanan proteinlerin Gene Ontology veri bankasında analizi

Gene Ontology veri bankasından elde edilen grafikler Şekil 21-22’de verilmiştir (75).



Şekil 21 U87MG Hücre hattında progesteron (P4) uygulaması ile artan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımı

U87MG hücre hattında P4 uygulaması ile anlatımı artan proteinlerin moleküler fonksiyon analizine göre; doza bağımlı olarak katalitik aktivite ve bağlanmanın payı yüksek oranda artarken, aynı zamanda taşıma aktivitesi, reseptör aktivitesi gibi protein grupları da ortaya çıkmıştır.

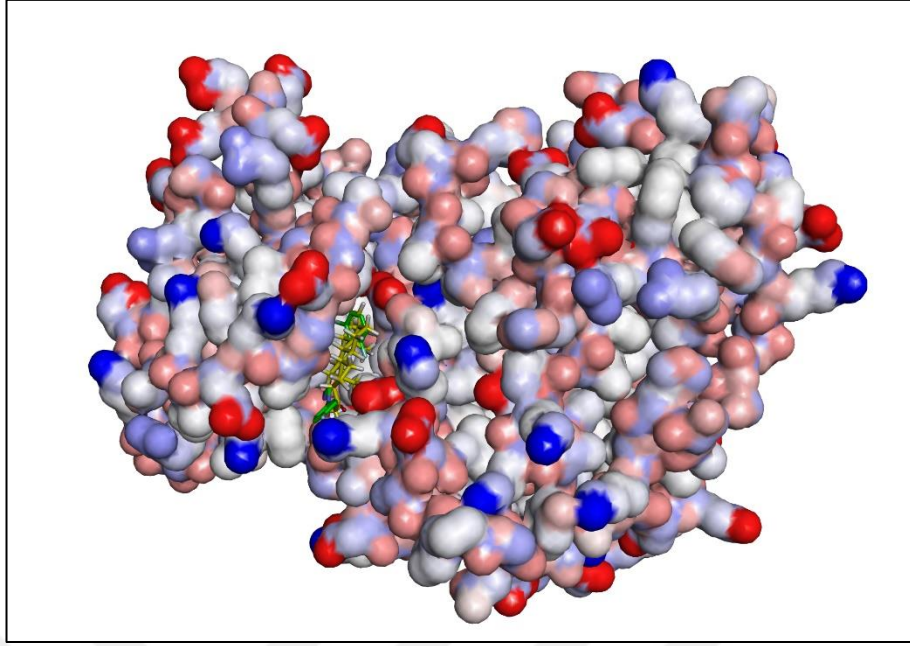


Şekil 22 A172 Hücre hattında progesteron (P4) uygulaması ile artan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımı

A172 hücre hattında P4 uygulaması ile anlatımı artan proteinlerin moleküler fonksiyon analizine göre; doza bağımlı olarak bağlanma fonksiyonuna ait proteinlerin payı artmıştır.

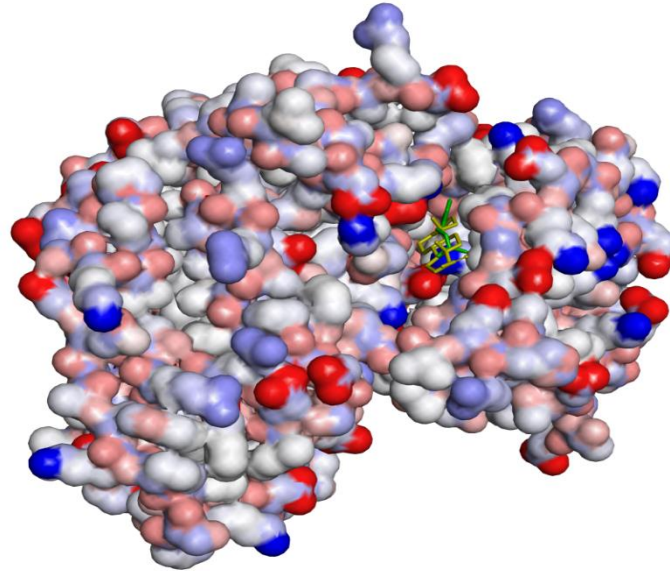
4.4. *In silico* Biyobelirteç Tespiti

Tanımlanan bütün proteinler moleküler fonksiyonları da baz alınarak incelendikten sonra progesteronla ilişkilerini belirlemeye yönelik, *in silico* olarak biyobelirteç potansiyelleri tespit edilmeye çalışıldı. Analizlerde protein-protein etkileşimleri detaylı incelenerek, hücre döngüsü düzenlenmesi gibi önemli görevlerdeki proteinlerin progesteron ile ilişkisi araştırıldı. Bu amaçla öncelikle tanımlanan tüm proteinler Signor veri bankasına yüklendi (76). Protein-protein etkileşimleri tek tek analiz edildi. Olası biyobelirteçler üzerine yoğunlaşarak progesteronun inhibe edebileceği proteinler belirlendi ve moleküler yerleştirme yoluyla, progesteronun bağlanma enerjisi proteinin inhibitörü ile karşılaştırmalı olarak tespit edildi.



Şekil 24 CDK1 proteini ve inhibitör kompleksi

Şekilde yeşil olarak renklendirilen inhibitör moleküldür. Sarı ile gösterilen inhibitör ile benzer bağlanma pozisyonuna sahip progesterone moleküldür. Protein atomik yük dağılımına göre vdW ile gösterilmiştir. (PDB ID: 5HQ0) (İnhibitör: -10,1 kcal/mol; P4: -4,5 kcal/mol)



Şekil 25 CDK2 proteini ve inhibitör kompleksi

Şekilde yeşil olarak renklendirilen inhibitör moleküldür. Sarı ile gösterilen inhibitör ile benzer bağlanma pozisyonuna sahip progesterone moleküldür. Protein atomik yük dağılımına göre vdW ile gösterilmiştir. (PDB ID:2EXM) (İnhibitör: -6,4 kcal/mol; P4: -8,3 kcal/mol)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Progesteron normal dişi üreme fizyolojisinde görevli, farklı doku ve organları da etkileyebilen evrimsel açıdan korunmuş steroid hormondur. Litaratürdeki çalışmalar progesteronun farklı doku ve organlarda farklı etkilerinin görüldüğünü desteklemektedir (1). Ayrıca progesterona normal ve hastalıklı hücrelerin verdiği yanıtlar da farklılık göstermektedir. Bu amaçla progesteronun birçok kanser tipi üzerinde etkisi araştırılmıştır. Özellikle rahim ve meme kanseri üzerindeki etkisinden yola çıkılarak farklı beyin kanserleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır (17,64,80). Glioblastoma örnek hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda düşük doz progesteronun hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi keşfedilmiştir (80,81). İlerleyen çalışmalarda progesteronun artan dozlarda hücre çoğalmasını arttıran etkinin aksine antiproliferatif etki ettiği bulunmuştur (9,17,18). Özellikle yüksek doz P4'ün nöroblastomada tümör büyümesini inhibe ettiği hücre kültürü ve hayvan modellerinde gösterilmiştir (9). Yine aynı grup tarafından yapılan bir başka çalışmada yüksek doz P4'ün GBM tümör büyümesini büyük ölçüde azalttığı rapor edilmiştir. Ancak litaratürde P4'ün hangi mekanizmalar üzerinden bu etkileri gösterdiği henüz bilinmemektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında P4'ün GBM hücre hatlarına antiproliferatif ve apoptotik etkisinin proteomik açıdan incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla öncelikle proteomik değişikliğin en iyi şekilde izlenebileceği dozlar xCELLigence deneyleri ile belirlenmiştir. Atif ve ark. 2015 yılında yaptığı *in vitro* TMZ ve P4 kombinasyon deneylerinde 80 µM dozdaki P4'ün tek başına daha etkili olduğu ve dermal fibroblast hücrelerinde TMZ'nin sitotoksik etkisini azalttığı gösterilmiştir (18). Proteomik etkinin en iyi gözlemlenebileceği doz çalışmaları için xCELLigence sistemi kullanılmıştır. xCELLigence sistemi diğer ölçüm deneylerine göre daha güvenilir, hızlı ve gerçek zamanlı gözlemlenebilir sonuçlar vermektedir (82). Hücrelerin çoğalmaları izlenerek, ilaç uygulamasının etkisinin en iyi gözlemlenebileceği evre, başka bir deyişle hücrelerin düzgün olarak çoğalmaya

başladıkları evre (logaritmik fazın başlangıcı) gözlemlenmiştir. Logaritmik fazın başlangıcındaki hücrelere 20 µM, 50 µM, 100 µM ve 300 µM dozlarında ilaç uygulaması yapılmış ve elde edilen verilere göre hücre canlılığında P4 dozuna bağımlı olarak azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın özellikle yüksek P4 dozu olan 100 µM ve 300 µM konsantrasyonlarında olduğu belirlenmiştir. Dozlara bağımlı azalma A172 hücre hattına kıyasla U87MG hücre hattında daha çok etkisini göstermektedir. Bu sonucun giriş ve amaçta bahsedildiği gibi bu iki hücre hatları arasındaki farklılığı gözlemlenmenin önemini kanıtlar nitelikte olduğu söylenebilir. Progesteronun canlılığı azaltıcı etkisinin proteomik profil üzerine yansımaları daha iyi anlaşılabilmesi için 100 µM ve 300 µM dozları seçilerek ilaç uygulaması yapılan hücre hattı örneklerine iki boyutlu jel elektroforezi yapılmıştır.

İki boyutlu jel elektroforezi total proteomu belirleme ilk kullanılan yöntemlerden biri olmasına rağmen farklı limitasyonları vardır. Bu limitasyonlar dikkate alındığında tanımlanan fakat tutarlı patern göstermeyen proteinler çalışma sonuçlarına dahil edilmemiştir. Bu sonuçlara göre P4'ün A172 hücre hattına kıyasla U87MG hücre hattında daha fazla proteinin değiştiği görülmektedir. Bu farklılığın, U87MG hücre hattının A172 hücre hattına göre daha agresif yapıda olmasından dolayı P4'e tepkisinin daha fazla proteinin miktarında değişime yol açtığı tanımlanan protein sayılarının değişim grafikleri (Şekil 19-20) ile söylenebilir. P4 dozlarına bağımlı olarak U87MG hücre hattında anlamlı değişim gösteren protein sayısı artarken, A172 hücre hattında azalmıştır, bu sonuçların da iki hücre hattı arasındaki farklı özelliklerinden kaynaklandığı söylenebilir.

Mitokondriyal ornitin aminotransferaz ve elongation faktör-tu proteinleri A172 hücre hattında, mitokondriyal alanin t-RNA ligaz U87MG hücre hattında yüksek doz P4 ile azalmıştır. Ayrıca kalsiyum-bağlayıcı mitokondriyal taşıyıcı protein ve mitokondriyal stres-70 proteini yüksek doz P4 ile artmıştır. Mitokondri ile ilişkili bu proteinlerin artışı ve yüksek doz progesteronun mitofajiyi indüklediği söylenebilir (83).

Tanımlanan proteinler ile Gene Ontology veri bankasında yapılan moleküler fonksiyon analizi grafiklerinde U87MG hücre hattında dozlara bağımlı olarak bağlanma ve katalitik aktivite proteinlerinde artış görülmektedir (Şekil 21). Ayrıca

100 µM P4 dozundan farklı olarak, 300 µM P4 dozunda reseptör ve taşıma aktivitesi proteinleri gibi grupların da ortaya çıktığı görülmüştür. A172 hücre hattında ise bağlanma aktivitesinin arttığını fakat P4 dozunun artışına U87MG hücre hattı kadar tepki göstermediği görülmüştür (Şekil 22).

Signor veri tabanına göre yapılan *in silico* biyobelirteç tespiti çalışmalarında, , ribozom biyogenez, sentrozom duplikasyon, protein chaperoning, histon düzeni, hücre proliferasyonu ve p53 / TP53 ve ARF tümör baskılayıcılarının regülasyonu gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer alan Nükleofosmin (NPM1) proteini dikkat çekmiştir (84). Nükleofosmin (NPM1) proteinin anlatımı U87MG hücre hattında hem 100 µM hem de 300 µM P4 uygulanan hücre hatlarında artış göstermiştir. Veriler detaylı şekilde protein-protein etkileşim analizleri için incelenirken tespit edilen NPM1 proteini, CDK1 ve CDK2 etkileşimi, progesteronun antiproliferatif etkisinin bir göstergesi olabilir. Şöyle ki NPM1'in anlatımının baskılanması siklin ve siklin bağımlı kinazlar tarafından kontrol edilmektedir. CDK1 ve CDK2 proteininin azalması ile NPM1 proteininin arttığı düşünülmektedir. CDK1 proteini hücre döngüsünde mitoz fazına ve CDK2 proteini DNA sentez fazına geçişte görevlidir (85). Dolayısıyla CDK1 ve CDK2'nin inhibisyonu hücrenin DNA sentez ve mitoz fazına geçişini etkilemekte, böylece hücrelerin çoğalması için olumsuz etki oluşturduğu düşünülmektedir.

Proteomik analizler için çok önemli bir metod olmasına rağmen sınırlı bilgi sağlamasından dolayı proteinlerin analizlerinde birbiriyle ilişkili tüm proteinlerin saptanamaması iki boyutlu jel elektroforezinin limitasyonlarından kaynaklanmaktadır. Sonuçların verilerin ileri proteomik metodları ile desteklenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Dinny Graham J, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* 1997;18(4):502–19.
2. Ishikawa H, Ishi K, Ann Serna V, Kakazu R, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology.* 2010;151(6):2433–42.
3. Poole AJ, Li Y, Kim Y, Lin SJ, Lee W. Prevention of Brca1 -Mediated Mammary Tumorigenesis in Mice by a Progesterone Antagonist. *Science (80-)*. 2006;66(March 2004):1467–71.
4. Heiss G, Wallace R, Anderson GL, Aragaki A, Beresford SAA, Brzyski R, et al. Health risks and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2008;299(9):1036–45.
5. Gass M, Aragaki AK, Ockene JK, Ph D, Lane DS, Sarto GE, et al. Breast Cancer after Use of Estrogen plus Progestin in Postmenopausal Women. 2009;573–87.
6. Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev.* 2013;34(1):130–62.
7. Bu SZ, Yin DL, Ren XH, Jiang LZ, Wu ZJ, Gao QR, et al. Progesterone induces apoptosis and up-regulation of p53 expression in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer.* 1997;79(10):1944–50. Available from:
8. Formby B, Wiley TS. Bcl-2, survivin and variant CD44 v7-v10 are downregulated and p53 is upregulated in breast cancer cells by progesterone : Inhibition of cell growth and induction of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 1999;202:53–61.
9. Atif F, Sayeed I. Progesterone Inhibits the Growth of Human Neuroblastoma:

in vitro and in vivo Evidence. *Mol Med* [Internet]. 2011;17(9–10):1. Available from: http://www.molmed.org/content/pdfstore/10_255_Atif.pdf

10. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2009;18(8):1061–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19555299>
11. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol* 2003;5(2):79–88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1920672&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2005;352(10):987–96. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043330>
13. Moroz MA, Huang R, Kochetkov T, Shi W, Thaler H, De Stanchina E, et al. Comparison of corticotropin-releasing factor, dexamethasone, and temozolomide: Treatment efficacy and toxicity in U87 and C6 intracranial gliomas. *Clin Cancer Res*. 2011;17(10):3282–92.
14. Jakola AS, Gulati S, Weber C, Unsgård G, Solheim O. Postoperative deterioration in health related quality of life as predictor for survival in patients with glioblastoma: A prospective study. *PLoS One*. 2011;6(12).
15. McGirt MJ, Mukherjee D, Chaichana KL, Than KD, Weingart JD, Quinones-Hinojosa A. Association of surgically acquired motor and language deficits on overall survival after resection of glioblastoma multiforme. *Neurosurgery*. 2009;65(3):463–9.
16. D.G. S. Is progesterone a worthy candidate as a novel therapy for traumatic brain injury? *Dialogues Clin Neurosci* [Internet]. 2011;13(3):352–9. Available from: <http://www.dialogues-cns.org/publication/dialoguesclinneurosci-13->

352-

xml/%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed10&NEWS=N&AN=2012480445

17. Atif F, Yousuf S, Stein DG. Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015;146:62–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.007>
18. Atif F, Patel NR, Yousuf S, Stein DG. The synergistic effect of combination progesterone and temozolomide on human glioblastoma cells. *PLoS One*. 2015;10(6):1–17.
19. Allen WM. American Association for the Advancement of Science. *Sci Ser*. 1935;82(2118):89-.
20. Norman AW. Receptors for $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: Past, Present, and Future. *J BONE Miner Res BONE Miner Res*. 1998;13(9).
21. Stjernholm YV, Department. Progesterone in Human Pregnancy and Parturition. In: *Sex Hormones*. 2012.
22. Speroff MAF;Leon. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Eighth Edi. © 2011 by LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins Two Commerce Square 2001 Market Street Philadelphia, PA 19103 USA; 2011. 1451 p.
23. Jordan AW, Caffrey JL, Niswender GD. Catecholamine-induced stimulation of progesterone and adenosine 3', 5'-monophosphate production by dispersed ovine luteal cells. *Endocrinology*. 1978;103(2):385–92.
24. Marsh JM, Butcher RW, Savard K, Sutherland EW. I-. 1966;(22).
25. Milgrom E, Atger M BE-E. Progesterone binding plasma protein (PBP). *Nature*. 1970;227:520–1.
26. Burton RM, Harding GB, Rust N, Westphal U. Steroid-protein interactions.

- XXIII. Nonidentity of cortisol-binding globulin and progesterone-binding globulin in guinea pig serum. *Steroids*. 1971;17(1–5):1–16.
27. Perrot M, Milgrom E. Immunochemical Studies of Guinea Pig Progesterone-Binding Plasma Protein*. 2015;103(May):1678–85.
 28. Häggström M, Richfield D. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *WikiJournal Med* [Internet]. 2014;1(1):2–6. Available from: https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Diagram_of_the_pathways_of_human_steroidogenesis
 29. O'Malley B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1990;4(3):363–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188115>
 30. Sanborn BM, Held B, Kuo HS. Hormonal action in human cervix—II specific progestogen binding proteins in human cervix. *J Steroid Biochem* [Internet]. 1976 Sep;7(9):665–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022473176900637>
 31. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1993;7(10):1244–55. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.7.10.8264658>
 32. Pieber D. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2001;7(9):875–9. Available from: <https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/7.9.875>
 33. Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Mendelson CR. Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004;101(14):4978–83. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0401124101>

34. Goldman S, Shalev E. Progesterone receptor profile in the decidua and fetal membrane. *Front Biosci.* 2007;12(February 2007):634–48.
35. Evans RE. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* (80-). 1988;240:889–95.
36. Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem.* 1991;266(28):18655–9.
37. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR. Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via *Trans* -Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2000;14(10):1649–60. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.14.10.0532>
38. Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2003;100(5):2237–42. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0436133100>
39. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 1995;9:2266–78.
40. Demers LM, Feil PD, Bardin CW. FACTORS THAT INFLUENCE STEROID INDUCTION OF ENDOMETRIAL GLYCOGENESIS IN ORGAN CULTURE *.
41. Shapiro SS, Dyer RD, Colás AE. Progesterone-induced glycogen accumulation in human endometrium during organ culture. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;136(4):419–25.
42. Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E. Molecular action of progesterone. *Int J Biochem.* 1990;22(6):579–94.

43. Clarke CL, Sutherland RL. Progesterone Regulation of Cellular Proliferation. *Endocr Rev.* 1990;11(2):266–301.
44. Wong MSJ, Murphy LC. Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T-47D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;39(1):39–44.
45. Musgrove EA, Lee CS, Sutherland RL. Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-fos, and c-myc genes. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1991;11(10):5032–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=361499&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Sutherland RL, Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CSL, Sweeney KJE, Watts CKW, et al. breast cancer cell cycle progression . Growth Factor , Steroid , and Steroid Antagonist Regulation of Cyclin Gene Expression Associated with Changes in T-47D Human Breast Cancer Cell Cycle Progression. *1993;13(6):3577–87.*
47. Hurd C, Khattree N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, et al. Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47D human breast carcinoma Cell Line. *J Biol Chem* [Internet]. 1995;270(48):28507–10. Available from: <http://www.jbc.org/content/270/48/28507.abstract>
48. Parsons B, Maclusky NJ, Krey L, Pfaff DW, McEwen BS. The temporal relationship between estrogen-inducible progesterone receptors in the female rat brain and the time course of estrogen activation of mating behavior. *Endocrinology.* 1980;107(3):774–9.
49. Doncurlos LL, Greene GL, Morrell JI. Estrogen plus progesterone increases progesterone receptor immunoreactivity in the brain of ovariectomized guinea pigs: (with 1 color plate). *Neuroendocrinology.* 1989;50(6):613–23.
50. Blaustein JD, Turcotte JC. Guinea Pig Brain: New Findings Using an Immunocytochemical Technique. 1970;

51. Maggi A, Perez E. Progesterone and Estrogens in Rat Brain: Modulation of Gaba (Gamma-Aminobutyric Acid) Receptor Activity. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 1984;103:165–8. Available from: https://ac.els-cdn.com/001429998490205X/1-s2.0-001429998490205X-main.pdf?_tid=fb9a61ea-d504-11e7-a8a8-00000aab0f6b&acdnat=1511960483_4b7e774dec501e495c5bf4a0879c8475
52. Saso S, Chatterjee J, Georgiou E, Ditri AM, Smith JR, Ghaem-Maghami S. Endometrial cancer. *Bmj*. 2011;343(7814):1–8.
53. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis SP, Renoir JM, Corbo L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev*. 2011;32(5):597–622.
54. Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM, Pal B, Wu D, Simpson ER, et al. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*. 2010;465(7299):798–802.
55. Graham JD, Mote PA, Salagame U, Van Dijk JH, Balleine RL, Huschtscha LI, et al. DNA replication licensing and progenitor numbers are increased by progesterone in normal human breast. *Endocrinology*. 2009;150(7):3318–26.
56. Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, Di Grappa MA, Mote PA, Clarke CL, et al. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* [Internet]. 2010;465(7299):803–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09091>
57. Haas JF. Pregnancy in association with a newly diagnosed cancer: a population- based epidemiologic assessment. *Int J Cancer*. 1984;34(2):229–35.
58. Haas JF, Janisch W, Staneczek W. Newly diagnosed primary intracranial neoplasms in pregnant women: a population-based assessment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1986;49(8):874–80.
59. Louis DN, Ohgaki H, Wiestier OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-branger D, et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous

System. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 2016. 80-88 p.

60. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764–72.
61. Inskip PD, Linet MS, Heineman EF. Etiology of brain tumors in adults. *Epidemiol Rev* 1995;17(2):382–414. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654518>
62. Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(10):2421–7.
63. Cowppli-Bony A, Bouvier G, Rué M, Loiseau H, Vital A, Lebailly P, et al. Brain tumors and hormonal factors: Review of the epidemiological literature. *Cancer Causes Control.* 2011;22(5):697–714.
64. Altinoz MA, Ozpinar A, Elmaci I. Reproductive epidemiology of glial tumors may reveal novel treatments: high-dose progestins or progesterone antagonists as endocrino-immune modifiers against glioma. *Neurosurg Rev.* 2018;
65. Pandey a, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 2000;405(6788):837–46.
66. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/Technology.* 1996;14(1):61–5.
67. Celis JE, Gromov P, Østergaard M, Madsen P, Honoré B, Dejgaard K, et al. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *FEBS Lett.* 1996;398(2–3):129–34.
68. Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: Past, present and future. *Electrophoresis.* 2000;17:443–53.
69. O’Farrell PH. High Resolution of Proteins * Electrophoresis. *J Biol Chem* [Internet]. 1975;250(10):4007–21. Available from: <http://www.jbc.org/content/250/10/4007.short>

70. Magdeldin S, Xu B, Yamamoto T, Zhang Y, Yoshida Y. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis - a practical perspective. *Gel Electrophor - Princ basics*. 2012;91–116.
71. Degenhardt K, Sundararajan R, Lindsten T, Thompson C, White E. Bax and Bak independently promote cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem*. 2002;277(16):14127–34.
72. Kit Q. 2-D Quant Kit. *Electrophoresis*. :2–5.
73. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*. 2007;2(8):1896–906.
74. Ucal Y, Ozpinar A. Improved Spectra for MALDI MSI of Peptides Using Ammonium Phosphate Monobasic in MALDI Matrix. *J Mass Spectrom* [Internet]. 2018 May 10;(32). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.4198>
75. Consortium TGO. Gene ontologie: Tool for the unification of biology. *Nat Genet*. 2000;25(1):25–9.
76. Perfetto L, Briganti L, Calderone A, Perpetuini AC, Iannuccelli M, Langone F, et al. SIGNOR: A database of causal relationships between biological entities. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D548–54.
77. Berman HM. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000;28(1):235–42. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/28.1.235>
78. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina. *J Comput Chem*. 2010;31:445–61.
79. El-Hachem N, Haibe-Kains B, Khalil A, Kobeissy FH, Nemer G. AutoDock and AutoDockTools for protein-ligand docking: Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1(BACE1) as a case study. In: *Methods in Molecular Biology*. 2017. p. 391–403.
80. González-Agüero G, Gutiérrez AA, González-Espinosa D, Solano JD,

- Morales R, González-Arenas A, et al. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*. 2007;32(2):129–35.
81. Gutiérrez-Rodríguez A, Hansberg-Pastor V, Camacho-Arroyo I. Proliferative and Invasive Effects of Progesterone-Induced Blocking Factor in Human Glioblastoma Cells. *Biomed Res Int*. 2017;2017.
 82. Ozdemir A, Ark M. xCELLigence Real Time Cell Analysis System: A new method for cell proliferation and cytotoxicity. *Niche J*. 2014;2:15–7.
 83. JAVED, R. et al. Temozolomide Effect on Mitophagy in Glioblastoma Chemoresistance Cell Lines. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;S305–S306.
 84. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. 2006;6(July):493–505.
 85. Duronio RJ, Xiong Y. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;5:a008904.

7. EKLER

Ek 1. Tanımlanan spotların tabloları sırasıyla U87MG veA172.

Tablo 5 U87MG 100 µM P4 uygulanan örnek ile kontrol karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların listesi

Saçılım grafiklere göre anlamlı farklılık gösteren spotların miktarında değişim artan-azalan şeklinde ifade edilmiştir.

| Uni Prot ID | Protein Gen Adı | Protein Adı | Mascot Skoru | Miktardaki Değişim |
|-------------|-----------------|---|--------------|--------------------|
| P47895 | AL1A3_HUMAN | Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3 | 61 | artan |
| P30084 | ECHM_HUMAN | Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial | 116 | artan |
| P09382 | LEG1_HUMAN | Galectin-1 | 43 | artan |
| P09211 | GSTP1_HUMAN | Glutathione S-transferase P | 170 | artan |
| P52597 | HNRPF_HUMAN | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F | 281 | artan |
| P06748 | NPM_HUMAN | Nucleophosmin | 220 | artan |
| P15531 | NDKA_HUMAN | Nucleoside diphosphate kinase A | 36 | artan |
| P62937 | PPIA_HUMAN | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | 116 | artan |
| P30041 | PRDX6_HUMAN | Peroxiredoxin-6 | 68 | artan |
| Q9UJZ1 | STML2_HUMAN | Stomatin-like protein 2, mitochondrial | 263 | artan |
| P38646 | GRP75_HUMAN | Stress-70 protein, mitochondrial | 180 | artan |
| P30048 | PRDX3_HUMAN | Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial | 93 | artan |
| P10809 | CH60_HUMAN | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | 119 | azalan |
| Q5JTZ9 | SYAM_HUMAN | Alanine--tRNA ligase, | 41 | azalan |

| | | | | |
|---------------|-------------|---|-----|--------|
| | | mitochondrial | | |
| P26641 | EF1G_HUMAN | Elongation factor 1-gamma | 41 | azalan |
| P11021 | BIP_HUMAN | Endoplasmic reticulum chaperone BiP | 104 | azalan |
| P15311 | EZRI_HUMAN | Ezrin | 46 | azalan |
| Q9UQ80 | PA2G4_HUMAN | Proliferation-associated protein 2G4 | 214 | azalan |
| Q99584 | S10AD_HUMAN | Protein S100-A13 | 43 | azalan |
| P49368 | TCPG_HUMAN | T-complex protein 1 subunit gamma | 53 | azalan |

Tablo 6 U87MG 300 μ M P4 uygulanan örnek ile kontrol karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların listesi

Saçılım grafiklere göre anlamlı farklılık gösteren spotların miktarında değişim artan-azalan şeklinde ifade edilmiştir.

| Uni Prot ID | Protein Gen Adı | Protein Adı | Mascot Skoru | Miktardaki Değişim |
|--------------------|------------------------|--|---------------------|---------------------------|
| P47895 | AL1A3_HUMAN | Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3 | 61 | artan |
| P06733 | ENOA_HUMAN | Alpha-enolase | 126 | artan |
| P12429 | ANXA3_HUMAN | Annexin A3 | 86 | artan |
| P08758 | ANXA5_HUMAN | Annexin A5 | 64 | artan |
| P00505 | AATM_HUMAN | Aspartate aminotransferase, mitochondrial | 140 | artan |
| P25705 | ATPA_HUMAN | ATP synthase subunit alpha, mitochondrial | 38 | artan |
| P06576 | ATPB_HUMAN | ATP synthase subunit beta, mitochondrial | 68 | artan |
| O00299 | CLIC1_HUMAN | Chloride intracellular channel protein 1 | 43 | artan |
| Q13185 | CBX3_HUMAN | Chromobox protein homolog 3 | 75 | artan |
| O75390 | CISY_HUMAN | Citrate synthase, mitochondrial | 49 | artan |
| P11021 | BIP_HUMAN | Endoplasmic reticulum chaperone BiP | 135 | artan |
| P30040 | ERP29_HUMAN | Endoplasmic reticulum resident protein | 62 | artan |

| | | | | |
|---------------|-------------|---|-----|-------|
| P30084 | ECHM_HUMAN | Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial | 116 | artan |
| P07954 | FUMH_HUMAN | Fumarate hydratase, mitochondrial | 59 | artan |
| P09382 | LEG1_HUMAN | Galectin-1 | 43 | artan |
| P09211 | GSTP1_HUMAN | Glutathione S-transferase P | 170 | artan |
| P04406 | G3P_HUMAN | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 186 | artan |
| P62826 | RAN_HUMAN | GTP-binding nuclear protein Ran | 215 | artan |
| P11142 | HSP7C_HUMAN | Heat shock cognate 71 kDa protein | 71 | artan |
| P07910 | HNRPC_HUMAN | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 | 83 | artan |
| P31943 | HNRH1_HUMAN | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H | 60 | artan |
| P14866 | HNRPL_HUMAN | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L | 140 | artan |
| Q32P51 | RA1L2_HUMAN | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2 | 46 | artan |
| P26440 | IVD_HUMAN | Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial | 52 | artan |
| Q03252 | LMNB2_HUMAN | Lamin-B2 | 118 | artan |
| Q10713 | MPPA_HUMAN | Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha | 66 | artan |
| O75489 | NDUS3_HUMAN | NADH dehydrogenase | 64 | artan |
| P06748 | NPM_HUMAN | Nucleophosmin | 206 | artan |
| P62937 | PPIA_HUMAN | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | 116 | artan |
| P30041 | PRDX6_HUMAN | Peroxiredoxin-6 | 54 | artan |
| P12004 | PCNA_HUMAN | Proliferating cell nuclear antigen | 58 | artan |
| P60903 | S10AA_HUMAN | Protein S100-A10 | 65 | artan |
| P50395 | GDIB_HUMAN | Rab GDP dissociation inhibitor beta | 44 | artan |
| Q96T23 | RSF1_HUMAN | Remodeling and spacing factor 1 | 35 | artan |
| Q9Y265 | RUVB1_HUMAN | RuvB-like 1 | 72 | artan |
| P38646 | GRP75_HUMAN | Stress-70 protein, mitochondrial | 180 | artan |
| Q9Y4G6 | TLN2_HUMAN | Talin-2 | 36 | artan |
| Q8NBS9 | TXND5_HUMAN | Thioredoxin domain-containing protein | 93 | artan |
| | | 5 | | |
| P30048 | PRDX3_HUMAN | Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial | 46 | artan |
| P06753 | TPM3_HUMAN | Tropomyosin alpha-3 chain | 62 | artan |

| | | | | |
|---------------|-------------|---|-----|--------|
| P10809 | CH60_HUMAN | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | 73 | azalan |
| P27797 | CALR_HUMAN | Calreticulin | 233 | azalan |
| P30101 | PDIA3_HUMAN | Protein disulfide-isomerase A3 | 112 | azalan |

Tablo 7 A172 100 μ M P4 uygulanan örnek ile kontrol karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların listesi

Saçılım grafiklere göre anlamlı farklılık gösteren spotların miktarında değişim artan-azalan şeklinde ifade edilmiştir.

| Uni Prot ID | Protein Adı | Gen | Protein Adı | Mascot Skoru | Miktadaki Değişim |
|--------------------|--------------------|------------|--|---------------------|--------------------------|
| P06576 | ATPB_HUM AN | | ATP synthase subunit beta, mitochondrial | 70 | artan |
| Q15084 | PDIA6_HUM AN | | Protein disulfide-isomerase A6 | 85 | artan |
| P06733 | ENOA_HUM AN | | Alpha-enolase | 58 | artan |
| P04406 | G3P_HUMA N | | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 61 | artan |
| P04075 | ALDOA_HU MAN | | Fructose-bisphosphate aldolase A | 83 | artan |
| P21796 | VDAC1_HU MAN | | Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 | 88 | artan |
| P11142 | HSP7C_HUM AN | | Heat shock cognate 71 kDa protein | 81 | artan |
| P61981 | 1433G_HUM AN | | 14-3-3 protein gamma | 57 | azalan |
| P63104 | 1433Z_HUM AN | | 14-3-3 protein zeta/delta | 61 | azalan |
| P08670 | VIME_HUM AN | | Vimentin | 90 | azalan |
| P55072 | TERA_HUM AN | | Transitional endoplasmic reticulum ATPase | 177 | azalan |
| P04181 | OAT_HUMA N | | Ornithine aminotransferase, mitochondrial | 64 | azalan |

| | | | | |
|---------------|-----------------|-------------------------------------|-----|--------|
| P04040 | CATA_HUM AN | Catalase | 70 | azalan |
| P14618 | KPYM_HUM AN | Pyruvate kinase PKM | 58 | azalan |
| P68104 | EF1A1_HUM AN | Elongation factor 1-alpha 1 | 43 | azalan |
| P49368 | TCPG_HUM AN | T-complex protein 1 subunit gamma | 69 | azalan |
| P02545 | LMNA_HUM AN | Prelamin-A/C | 37 | azalan |
| P61163 | ACTZ_HUM AN | Alpha-centractin | 117 | azalan |
| P49411 | EFTU_HUM AN | Elongation factor Tu, mitochondrial | 55 | azalan |

Tablo 8 A172 300 µM P4 uygulanan örnek ile kontrol karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösteren ve tanımlanan spotların listesi

Saçılım grafiklere göre anlamlı farklılık gösteren spotların miktarında değişim artan-azalan şeklinde ifade edilmiştir.

| Uni ID | Prot | Protein Adı | Gen | Protein Adı | Mascot Skoru | Miktadaki Değişim |
|---------------|-------------|--------------------|------------|---|---------------------|--------------------------|
| Q8NHM5 | | KDM2B_HUMAN | | Lysine-specific demethylase 2B | 58 | azalan |
| P11021 | | BIP_HUMAN | | Endoplasmic reticulum chaperone BiP | 80 | azalan |
| P04181 | | OAT_HUMAN | | Ornithine aminotransferase, mitochondrial | 64 | azalan |
| O14556 | | G3PT_HUMAN | | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 58 | azalan |
| P0DN37 | | PAL4G_HUMAN | | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4G | 58 | artan |
| P26440 | | IVD_HUMAN | | Isovaleryl-CoA dehydrogenase | 67 | artan |
| P06576 | | ATPB_HUMAN | | ATP synthase subunit beta, mitochondrial | 70 | artan |
| Q15084 | | PDIA6_HUMAN | | Protein disulfide-isomerase A6 | 85 | artan |

| | | | | |
|---------------|-----------------|---|-----|-------|
| P10809 | CH60_HUMA N | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial | 144 | artan |
| P06733 | ENOA_HUM AN | Alpha-enolase | 58 | artan |
| P11142 | HSP7C_HUM AN | Heat shock cognate 71 kDa protein | 81 | artan |
| P09211 | GSTP1_HUM AN | Glutathione S-transferase P | 78 | artan |
| P28070 | PSB4_HUMA N | Proteasome subunit beta type-4 | 100 | artan |



8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

| | | | |
|------------|--------------------------|--------------|---------------|
| Adı | Muazzez Ceren | Soyadı | YILMAZ |
| Doğum Yeri | AMASYA/Gümüşhacıöy | Doğum Tarihi | 06.05.1991 |
| Uyruğu | TC | Telefon | +905453966114 |
| E-mail | muazzezceren@hotmail.com | | |

Eğitim Düzeyi

| | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mezuniyet Yılı |
|---------------|---|----------------|
| Yüksek Lisans | Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi | 2018 |
| Lisans | İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik | 2016 |
| Lise | Merzifon Anadolu Lisesi | 2009 |

| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma* |
|-----------------|-------------------|----------|--------|
| İngilizce | İyi | İyi | İyi |

| Yabancı Dil Sınav Notu | | | | | | | | | |
|------------------------|--------|-------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-----|-------|
| YDS | YÖKDİL | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE | DİĞER |
| 52,5 | 72,5 | | | | | | | | |

| | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|------------|---------|--------------|-------|
| ALES Puanı | 80,8 | 81,5 | 71,8 |

Bilgisayar Bilgisi

| Program | Kullanma becerisi |
|-----------------------|-------------------|
| MS,Office Programları | İyi |

Yayınlar

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Ucal Y., Eravci M., Uras I., **Yılmaz M. C.**, Kayhan C. K., Tokat F., Duren M., Ince U., Ozpinar A. Proteomic Differences in Histopathological Variants of Papillary Thyroid Carcinoma. Proteomic Forum 2017, University Potsdam, 2–5 April 2017, Potsdam, Germany (Poster Presentation)

Yılmaz M.C., Ucal Y., Kiris I., Altinoz M., Ozpinar A., Antiproliferative Effect of Progesterone in Glioblastoma Cell Lines: An Application of 2 Dimensional Gel Electrophoresis, 5th International Drug Design Congress, Bahcesehir University, 19-21 October 2017, Istanbul, Turkey (Poster Presentation)

Projeler

Malign ve benign tiroid nodüllerinin protein profillerinin maldi imaging yöntemi ile belirlenmesi, Acıbadem University, Prof. Dr. Aysel Özpınar, 2016-2017 (Proje No:214S012) (**Bursiyer**)