

**AURORA KİNAZ B İNHİBİTÖRÜ TOZASERTİB'İN
PANKREAS KARSİNOMA HÜCRELERİNDE CPC
(CHROMOSOMAL PASSANGER COMPLEX)
YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

HİKMET ÇELİK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
EKİM-2015**

**AURORA KİNAZ B İNHİBİTÖRÜ TOZASERTİB'İN
PANKREAS KARSİNOMA HÜCRELERİNDE CPC
(CHROMOSOMAL PASSANGER COMPLEX)
YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

HİKMET ÇELİK

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN**

**MERSİN
EKİM-2015**

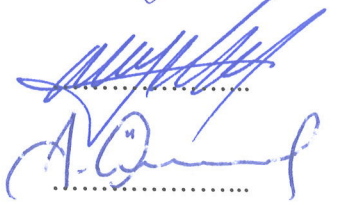
Hikmet ÇELİK tarafından Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN danışmanlığında hazırlanan “Aurora Kinaz B İnhibitörü Tozasertib’in Pankreas Karsinoma Hücrelerinde Kromozomal Geçiş Kompleksi Yolağı Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışması aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ



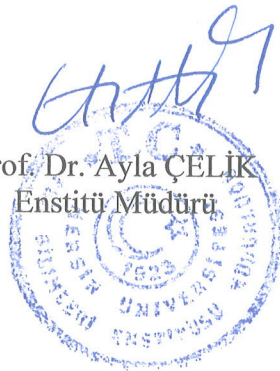
Prof. Dr. Necat YILMAZ



Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03/07/2015 tarih ve 2015-18/746 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ayla ÇELİK
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

AURORA KİNAZ B İNHİBİTÖRÜ TOZASERTİB'İN PANKREAS KARSİNOMA HÜCRELERİNDE CPC (CHROMOSOMAL PASSANGER COMPLEX) YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hikmet ÇELİK

ÖZ

Bu çalışmada CFPAC-1 pankreas duktal adenokarsinoma hücreleri kullanılarak Aurora kinaz B inhibitörü Tozasertib'in sitotoksik etkisi araştırılmıştır. xCELLigence DP eş zamanlı hücre analizi cihazında yapılan hücre titrasyon deneyleri sonucunda sitotoksikite deneyleri için uygun hücre sayısının 50.000, Tozasertib uygulama saatinin ise 12. ve 24. saat olduğu belirlendi. Tozasertib (10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) uygulaması sonucu IC_{50} değeri $6,4 \times 10^{-8}$ M olarak bulundu. xCELLigence DP analizöründe yapılan çalışmada Tozasertib'in, CFPAC-1 hücrelerinin migrasyon aktivitesine engelleyici ya da destekleyici herhangi bir etkide bulunmadığı belirlendi. İmmünflöresan yöntemle hücre çekirdeğine göre konumları ve protein anlatımı düzeyleri görsel olarak incelenen AURKB ve Borealin proteinlerinin anlatım düzeylerinin Tozasertib etkisi altında azaldığı gözlemlendi. Önemli bir apoptotik aktivite engelleyici olan Survivin'in, Tozasertibe yanıt olarak önemli düzeyde artışa uğradığı bulgulandı. Annexin V belirteci ile akan hücre ölçerde takip edilen toplam apoptotik aktivitenin, Tozasertib varlığında 12. saatte %8,45, 24. saatte %9,70 arttığı gösterildi. Akan hücre ölçerde yapılan DNA hücre döngüsü analizi ile Tozasertib'in anöploidiye neden olduğu ve G1 fazında hücre döngüsü tutuklanmasına neden olduğu belirlendi. Bu bulgularla, AURKB inhibitörü olan Tozasertib'in, pankreas duktal adenokarsinoma hücre hattı olan CFPAC-1'de apoptotik etki gösterdiği, CPC yolağı ve hücre döngüsü üzerinde etkili olduğu, ancak migrasyon üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: CFPAC-1, Pankreas Kanseri, Tozasertib, VX-680, Apoptoz, Akan Hücre Ölçer, İmmünflöresan, Annexin V, Hücre Döngüsü Analizi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TOZASERTIB, AN AURORA KINASE B INHIBITOR, ONTO THE CHROMOSOMAL PASSANGER COMPLEX PATHWAY IN PANCREATIC CARCINOMA CELLS

Hikmet ÇELİK

ABSTRACT

In this study CFPAC-1 pancreatic ductal adenocarcinoma cells is used to research the cytotoxic activity of the Tozasertib, a Aurora Kinase B inhibitor. The cytotoxic effect studies resulted with Real-Time Cell Analyser, xCELLigence DP demonstrated that the appropriate starting cell number is 50,000 and the implementing time is the 12th and 24th hours. The value of IC₅₀ Tozasertib was considered as 6.4×10^{-4} M concentration among the range of 10^{-8} M to 10^{-4} M. Research on the CFPAC-1 cells with xCELLigence DP Analyser revealed that Tozasertib has no positive or negative effect on migration. The diminishing effect of Tozasertib on protein expression of AURKB and Borealin were observed with immunofluorescent assay visually against the location of cell nuclei and protein amount. A prominent apoptotic inhibitor, Survivin was found to increase remarkably in response to Tozasertib. The total apoptotic activity in the presence of Tozasertib is shown to increase 8.45% in 12 hours and 9.70% in 24 hours by an Annexin V marker monitored with flow cytometry. The DNA cell cycle analysis performed with flow cytometry was associated with aneuploidy and G1 cell arrest caused by Tozasertib treatment. In conclusion, the AURKB inhibitor Tozasertib shows apoptotic effect on pancreatic ductal adenocarcinoma cell line, CFPAC-1, affection on CPC pathway and cell cycle, however, no influence to migration.

Keywords: CFPAC-1, Pancreatic Cancers, Tozasertib, VX-680, Apoptosis, Flow Cytometry, Annexin V, Cell cycle analysis, Immunofluorescence

Advisor: Ass. Prof. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN, Mersin University, Department of Biology

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. AHMET ATA ÖZÇİMEN'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında desteğini ve emeğini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. ŞAKİR NECAT YILMAZ ve Prof. Dr. YASEMİN KAÇAR'a,

Çalışmalarımızda kullandığımız CFPAC-1 duktal pankreatik adenokarsinoma hücrelerini sağlayan Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. GÜNEŞ ESENDAĞLI'ya,

Çalışmalarımda bana yardımcı olan bilgi ve desteğini esirgemeyen Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Arş. Gör. Derya YETKİN'e,

Ayrıca tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Bio. CANER KAPLAN'a, Uzm. Bio. ERSİN ÖZTÜRK'e, Uzm. Bio. TURHAN YILMAZ'a, Uzm. Bio. GONCA AY'a, Bio. TUĞÇE OYAHAN ÖZCAN ve tüm MEİTAM (Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi) idari ve akademik personeline,

Lisans ve Yüksek lisans hayatım boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezi Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (BAB-FBE-BB (CK) 2014-1 YL).

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
EKLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. PANKREASIN MORFOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ.....	3
2.1.1. Pankreasın Makroskopik Anatomisi.....	3
2.1.2. Pankreasın Embriyolojik ve Post-natal Durumu.....	4
2.2. PANKREAS KANSERİ VE ÖZELLİKLERİ.....	5
2.2.1. Pankreas Kanseri'nin Epidemiyolojisi.....	5
2.2.2. Pankreas Kanseri'nin Özellikleri.....	7
2.3. HÜCRE BÖLÜNMESİ'NDE AURORA KİNAZLAR VE İNHİBİTÖRLERİ.....	8
2.3.1. Hücre Döngüsünün Fazları.....	8
2.3.2. Basit Ökaryotlarda Aurora Kinaz Homologları.....	9
2.3.3. Aurora Kinaz A.....	11
2.3.4. AURKB Lokusu ve Gen Varyantları.....	13
2.3.4.1. Aurora kinaz B.....	13
2.3.5. Aurora Kinaz C.....	14
2.4. TOZASERTİB'İN ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMASI.....	15
2.4.1. Tozasertib'in Özellikleri ve Bağlanma Kinetiği.....	15
2.4.2. Aurora Kinaz B'nin diğer inhibitörleri.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. KULLANILAN CİHAZ VE SARF MALZEMELERİ.....	18

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	18
3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler	19
3.2. YÖNTEMLER	20
3.2.1. CFPAC-1 Hücre Hattının Kültüre Edilmesi	20
3.2.2. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi ve Pasaj İşlemi	20
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	21
3.2.4. Hücrelerin Sayılması	21
3.3. xCELLigence SİSTEMİNDE GERÇEK ZAMANLI CANLI HÜCRE ANALİZİNİN YAPILMASI	22
3.3.1. E-plate Tasarımı ve Software Planlaması	23
3.3.2. Hücre Titrasyonunun Belirlenmesi	24
3.3.3. CFPAC-1 Hücrelerinin E-plate 16' ya Yüklenmesi ve Tozasertib Uygulanması	25
3.3.4. xCELLigence Cihazında Migrasyon İçin CIM-Plate Uygulaması	26
3.4. AURORA KİNAZ B, INCENP, BOREALİN VE SURVİVİN PROTEİNLERİNİN BOYAMA PROTOKOLÜ VE ANALİZİ	28
3.5. IC50 KONSANTRASYON/ZAMAN AYARLI TOZASERTİB'İN APOPTOTİK AKTİVİTESİNİN CFPAC-1 HÜCRELERİNDE FITC ANNEXİN YÖNTEMİ İLE AKAN HÜCRE ÖLÇERDE GÖSTERİLMESİ	30
3.5.1. CFPAC-1 hücrelerinin ekimi, IC50Tozasertib uygulanması	31
3.5.2. FITC Annexin V testi için fitokrom boyama prosedürünün gerçekleştirilmesi...	32
3.6. DNA HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN AKAN HÜCRE ÖLÇERDE ANALİZİ	34
3.6.1. CFPAC-1 hücrelerinin ekimi, IC50Tozasertib'in uygulanması	34
3.6.2. DNA hücre döngüsü analizi için PI boyama prosedürünün gerçekleştirilmesi ...	34
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	36
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA xCELLigence DP SİSTEMİ İLE HÜCRE TİTRASYONUNUN BELİRLENMESİ	37
4.2. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA TOZASERTİB'E BAĞLI SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ	38

4.3. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA xCELLigence DP SİSTEMİ ile IC50KONSANTRASYON/ZAMAN AYARLI TOZASERTİB'İN MİGRASYONA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....	42
4.4. İMMÜNFLÖRESAN ANTİKOR UYGULAMALARIN KONFOKAL MİKROSKOPTA GÖZLENMESİ.....	45
4.5. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA IC50KONSANTRASYON/ZAMAN AYARLI TOZASERTİB'İN AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE APOPTOTİK HÜCRE AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....	48
4.6. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA IC50 KONSANTRASYON/ZAMAN AYARLI TOZASERTİB'İN AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE DNA HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR	70
EKLER.....	76
ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. GLOBACAN 2012 verilerine göre Pankreas Kanserinin Türkiye'deki Cinsiyet Dağılımı	5
Çizelge 2.2. Yıllara ve Cinsiyete Göre Toplam Kanser İnsidansı, (100.000'de, Dünya Standart Nüfusu), Türkiye	6
Çizelge 3.1. E-Plate 16 düzeni	25
Çizelge 3.2. İki tekrarlı Tozasertib Uygulaması İçin E-plate 16 Düzeni	26
Çizelge 3.3. Migrasyon Deneyi CIM Plate 16 Tasarımı	27
Çizelge 3.4. FITC Annexin V testi için hazırlanan hücrelerin plak tasarımı	31
Çizelge 4.1. E-Plate 16 kuyucuklarına yüklenen hücre sayıları.....	37
Çizelge 4.2. E-Plate 16 plağında Tozasertib uygulaması ve renk kodları	39
Çizelge 4.3. Florofor işaretlenme gruplarına göre Q1, Q2, Q3 ve Q4 popülasyonları.....	49
Çizelge 4.4. Q popülasyonları özet çizelgesi	57
Çizelge 4.5. Karşılaştırmalı Q popülasyonları çizelgesi	59
Çizelge 4.6. DNA Hücre döngüsü analizi sonuçlarının özet çizelgesi	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Pankreasın Kesitsel Anatomisi	3
Şekil 2.2. Pankreatik Vasküler Sistem	4
Şekil 2.3. Cdh1'in APC/C kompleksine substrat sunumu	12
Şekil 2.4. Tozasertib'in Moleküler İskelet ve Stereokimyasal Formülü.....	15
Şekil 2.5. INCENP - Aurora kinaz B - Tozasertib arasındaki etkileşimler.....	16
Şekil 3.1. Cedex XS Smart Slides.....	22
Şekil 3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Ölçüm Cihazı Ana Ünite ve Kontrol Ünitesi	23
Şekil 3.3. E-Plate 16.....	24
Şekil 3.4. CIM Plate 16	28
Şekil 4.1. CFPAC-1 hücre hattının zamana bağlı hücre indeksi.....	38
Şekil 4.2. CFPAC-1 hücre hattında zamana bağlı ikiye katlanma.....	38
Şekil 4.3. 96 Saat sonunda Tozasertib uygulama ve kontrol gruplarının hücre indeksi	40
Şekil 4.4. Tozasertib uygulanan kuyucukların hücre indeksi	40
Şekil 4.5. Sigmoidal konsantrasyon hesaplamasına göre Tozasertib konsantrasyonunun logaritmasına karşı hücre indeksinin DRC eğrisi	41
Şekil 4.6. 40.000 hücre popülasyonunda Tozasertib'in migrasyona etkisi.....	42
Şekil 4.7. 20.000 hücre popülasyonunda Tozasertib'in migrasyona etkisi.....	43
Şekil 4.8. CFPAC-1 hücrelerinde IC ₅₀ tozasertib uygulamasının AURKB anlatımının immünflöresan görüntüsü	46
Şekil 4.9. CFPAC-1 hücrelerinde IC ₅₀ tozasertib uygulamasının Borealin ve Survivin anlatımının immünflöresan görüntüsü	46
Şekil 4.10. Survivin anlatımının IC ₅₀ Tozasertib'e yanıt olarak artışı.....	47
Şekil 4.11. CFPAC-1 Bazal apoptoz grubunda 12. saat boyasız kontrol örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği	49
Şekil 4.12. CFPAC-1 Bazal apoptoz 12. saat grubunda FITC+PI boyalı 1. grup örneğin FSC-A/SSC-A nokta grafiği	50
Şekil 4.13. CFPAC-1 Bazal apoptoz 12. saat grubunda FITC+PI boyalı 2. grup örneğin FSC-A/SSC-A nokta grafiği	50

Şekil 4.14. CFPAC-1 Bazal apoptoz grubunda 24. saat boyasız kontrol örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği	51
Şekil 4.15. CFPAC-1 Bazal apoptoz 24. saat grubunda FITC+PI boyalı 1. grup örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği	51
Şekil 4.16. CFPAC-1 Bazal apoptoz 24. saat grubunda FITC+PI boyalı 2. grup örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği	52
Şekil 4.17. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması grubunda 12. saat boyasız kontrol örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği	52
Şekil 4.18. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması 12. saat grubunda FITC+PI boyalı 1. grup örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği.....	53
Şekil 4.19. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması 12. saat grubunda FITC+PI boyalı 2. grup örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği.....	53
Şekil 4.20. Tozasertib uygulaması grubunda 24. saat boyasız kontrol örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği.....	54
Şekil 4.21. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması 24. saat grubunda FITC+PI boyalı 1. grup örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği.....	54
Şekil 4.22. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması 24. saat grubunda FITC+PI boyalı 2. grup örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği.....	55
Şekil 4.23. Tozasertib'e bağlı apoptotik aktivitenin bazal apoptotik aktivite ile 12. saatte karşılaştırılması	55
Şekil 4.24. Tozasertib'e bağlı apoptotik aktivitenin bazal apoptotik aktivite ile 24. saatte karşılaştırılması	56
Şekil 4.25. Tozasertib ile 12. Saat inkübe edilen CFPAC-1 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akan hücre ölçerle değerlendirilmesinde FSC-A/FSC-W nokta dağılımı	60
Şekil 4.26. Tozasertib ile 24. Saat inkübe edilen CFPAC-1 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akan hücre ölçerle değerlendirilmesinde FSC-A/FSC-W nokta dağılımı	61
Şekil 4.27. Grup 1'in PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği	61
Şekil 4.28. Grup 2-A'nın PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği.....	62
Şekil 4.29. Grup 2-B'nin PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği	63
Şekil 4.30. Grup 3'ün PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği	64

Şekil 4.31. Grup 4-A'nın PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği.....	65
Şekil 4.32. Grup 4-B'nin PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği	66



EKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
EK-1. Aurora Kinaz B varyantları ve amino asit dizileri.....	74
EK-2. Aminoasitlerin Gösteriminde Kullanılan Kodlar, Polarite ve Hidrojen İyonu Aktivitesi	75
EK-3 İmmünokimyasal Antikor Tespiti için Hazırlık ve Uygulama Protokolü	76



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

m-:Mili- 10^{-3}

µ-:Mikro- 10^{-6}

n-: Nano- 10^{-9}

p-: Piko- 10^{-12}

-g: -Gram

-l: -Litre

-M: -Molar

sa.:Saat

dk.:Dakika

Anp.: Anöploid

ASR: Standartlaştırılmış yaş oranı (Age Standart Ratio)

AURKB: Aurora Kinaz B geni, sinonimleri: AIK2; AIM1; ARK2; AurB; IPL1; STK5; AIM-1; STK12; PPP1R48; aurkb-sv1; aurkb-sv2

Aurkb:Aurora kinaz B proteini

B.A.D.: Emisyon histogramında G1 ve G2 pikleri arasında tespit edilen hücre kalıntısı-Between Area Debris-

BSA:Bovin serum albümin

CPC:Kromozomal geçiş kompleksi -the chorosomal passanger complex-

CV:Varyasyon katsayısı-coefficient variation-

DI:DNA İndeksi, anoploid bir popülasyondaki G1 hücrelerinin kanal ortalamasının diploid G1kanal ortalaması ile karşılaştırılması olarak tarif edilir.

Dip.: Diploid

DNA: Deoksiribonükleik asit

DPBS: Dulbecco formülâtında fosfat tuzları tamponu

DRC:Konsantrasyona cevap eğrisi (Dose Response Curve)

IC₅₀: Sitotoksisite değişkeninde hücrelerin yarısının bölünmesini inhibe eden ilaç konsantrasyonunu temsil eder.

Ipl1: Ploidi arttıran gen, sinonimleri: YPL209CPAC15

FBS: Fötal sığır serumu

FSC(-A/-W/-H):Ön saçılma kamerası -Forward scatter camera-

-A:-Alan

-W:-Genişlik

-H:-Yükseklik

g:Sentrifugal gravitasyon kuvveti

Kon.: Konsantrasyon

Ort.: Aritmetik ortalama

PBS: 1 X fosfat tuzları tamponu

PBS-T:1 X fosfat tuzları tamponu ve %0.1 Tween 20 solüsyonu

PI: Propidyum iyodit

ppm:Milyondaki oranı belirtir

ppt:Trilyondaki oranı belirtir

RCS: İndirgenmiş chi-kare testi; 1,0 ve 3,0 arasındaki değerler iyi, 3,0 ile 5,0 arasındaki değerler orta, 5.0 ve üzeri zayıf geçerliliğe sahip olarak değerlendirilir

RNA: Ribonükleik asit

siRNA: Küçük interferans RNA

SPB:İğ kutupcisimciği (Spindle Pole Body)

SSC(-A/-W/-H):Yan saçılma kamerası -Side scatter camera-

-A: -Alan

-W:-Genişlik

-H:-Yükseklik

VX-680: Cyclopropane carboxylic acid(4-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)-6-(5-methyl-2H-pyrazol-3-ylamino)pyrimidin-2-ylsulfanyl)phenyl)amide, sinonimleri Tozasertib; MK-0457; VX6

UV:Morötesi dalga boyu (100-400 nanometre)

1. GİRİŞ

Yetişkin bir insanda 80 g ağırlığında bir organ olan pankreasın diğer organlardan biraz farklı olarak bakımı ve gelişimi mevcut farklılaşmış hücrelerin bölünmesiyle sürdürülür. Hasara uğramış pankreasta, pankreatik kanalınpankreasa tekrar bağlanması ile pankreatik adacık hücrelerinin öncülleri yeniden oluşur. Böylece pankreatik adacikhücrelerinin öncülleri kanaldan kökenlenmiş şekilde yeniden ortaya çıkar. Ana safranın distal ucu pankreasın baş bölgesi boyunca uzanır ve duodenuma giren pankreatik kanalın girişine katılır. Bu yüzden baş bölgesinde pankreas iltihabına bağlı oluşan tümörlerde safra bezleri gibi diğer salgısal bezlere yayılma kolaydır [1].Pankreas kanseri, kistik ve katı karakterli iyi huylupankreatik tümörler dışında, tüm yayılcı tümörler arasında en ölümcül olanıdır.

Pankreas kanseri, tanı zorluğu, hayatta kalım süresinin kısa olması ve hızlı metastaz yapma özelliği ile tedavi yaklaşımlarını güçleştiren bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün GLOBOCAN veri tabanına göre Türkiye'de erkek bireylerde görülme sıklığı %2,3 ölüm oranları ise %3,3'tür [2]; kadın bireylerde görülme sıklığı %1,9 ve ölüm oranı %3,4'tür. ABD'de 2010 verilerine göre hastalısız ölümler dahil, bütün ölümlerin %0,014'ünün sebebi pankreatik karsinoma olarak bilinen yayılcıkanal adenokarsinomudur [3].

Kanser tedavisindeki moleküler yaklaşımlardan biri mitozda kalıtsal materyalin dağılımını sağlayan yolaklarda düzensizliğe neden olan proteinlerin veya bu yolakları uyaran önemli aktifleştircilerin engellenmesidir.

Metafazda gerçekleşen kromozom ayrılmasını, mitozun başından sonuna kadar takip edip düzenleyen Kromozomal Geçiş Kompleksi (CPC), kromozom dizilimini organize eden ve bu çalışmanın odağında bulunan Aurora Kinaz B geni tarafından düzenlenir [4]. Aurora kinaz B'nin pankreatik hücre hatlarında gen kopya sayısının ortalama 3,5 kat amplifiye olduğu ve protein düzeyinin ortalama 3-4 kat arttığı tespit edilmiştir [5]. Bu yüzden Aurora kinaz B inhibitörleri kanser tedavilerinde umut vadetmektedir.

Ayrıca seçici inhibisyon özellikleri sayesinde hem enzimin görevlerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamış, hem de araştırmacılara yolakları iyi bilinen bir tedavi alanı oluşturmuşlardır.

Aurkb'nin ATP yarışmalı inhibitörü olan ZM447439 ile muamele edilen hücreler, mitotik ekvator düzleminde yanlış konumlanmış kromozomların varlığına rağmen mitozdan normal bir kinetik ile çıkar [6]. Bu da mitotik iğ kontrol noktasının Aurkb'nin ZM447439 ile inhibisyonuna rağmen doğru işlediğini gösterir. Yapılan çalışmalar Aurkb'nin anti-sense oligonükleotitler ile inhibisyonunun da hücre döngüsü açısından benzer sonuçları verdiği bildirilmiştir [7].

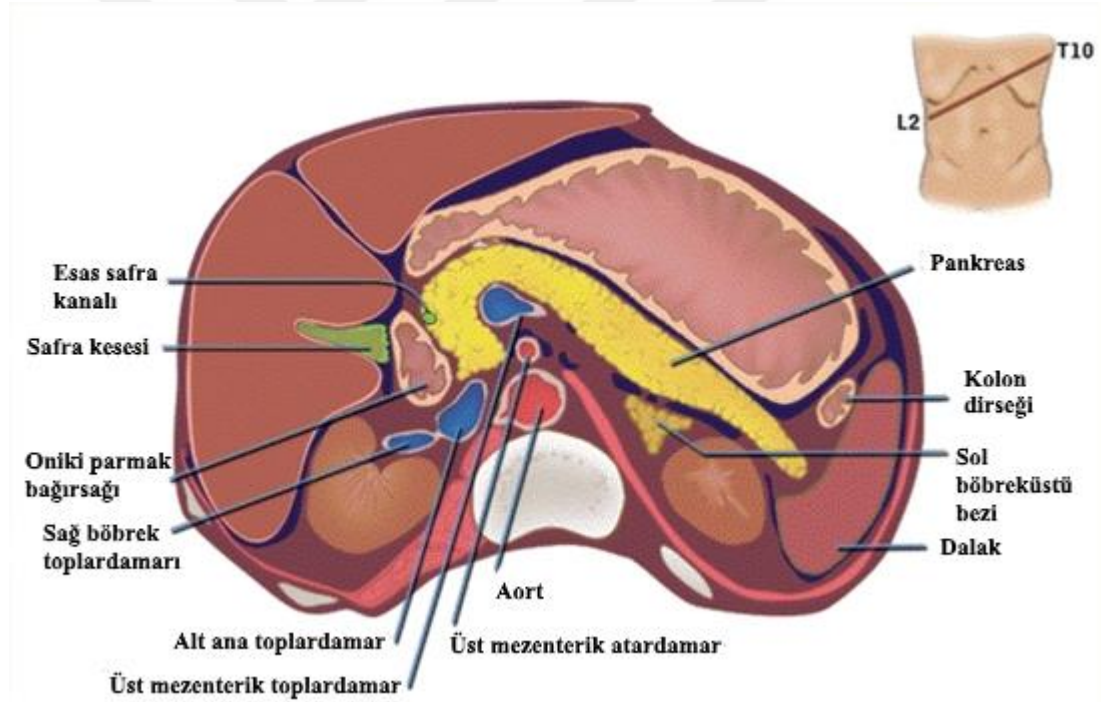
Bu çalışmada, CFPAC-1 duktal pankreatik adenokarsinoma hücre hattında, seçici Aurora kinaz B inhibitörü Tozasertib'in; sitotoksik ve IC₅₀ değerlerinin, yani hücrelerin bölünmesini yarı yarıya inhibe eden konsantrasyon aralıklarının xCELLigence gerçek zamanlı hücre takip sistemi ile belirlenmesi, yine aynı sistemde Tozasertib'in hücrelerin migratif fenotipini baskılayıp baskılamadığının araştırılması amaçlandı. Ayrıca daha sonraki çalışmalarda IC₅₀ Tozasertib kullanılarak seçici fluorofor işaretli primer antikolar ile Tozasertib varlığında CPC kompleksi üyeleri Aurora Kinaz B, Borealin, Survivin ve INCENP'in olası lokasyon veya miktar değişimlerinin saptanması amaçlandı. Tozasertib'in neden olduğu hücre ölümü tipinin apoptotik olup olmadığının BD FACS AriaIII cihazında Annexin V testi ile tespit edilmesi hedeflendi.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. PANKREASIN MORFOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ

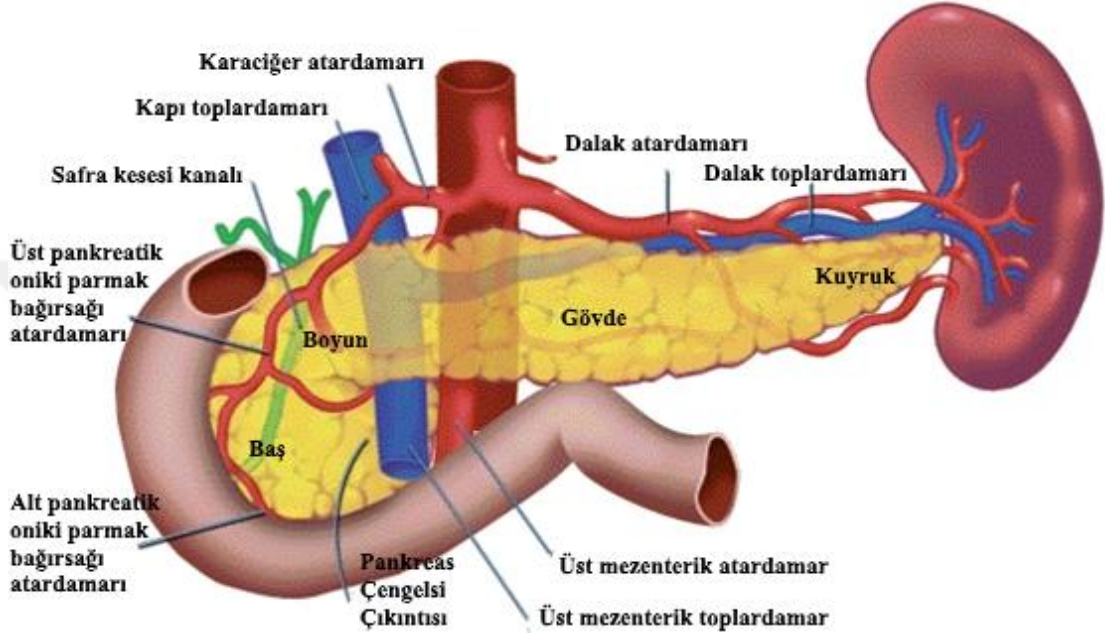
2.1.1. Pankreasın Makroskopik Anatomisi

Yetişkin bir insanda pankreas ortalama 80 g ağırlığındadır. Pankreas karın zarının arkasında bulunan bir organdır, böylece çevreleyen bir kapsül bulunmaz. Oniki parmak bağırsağının ikinci ve üçüncü bölümleri pankreasın baş tarafını çevreler. Dalak ise pankreatik kuyruğa hemen bitişiktir (Şekil 2.1.).Pankreasın baş, gövde, kuyruk ve baş bölgesinin oniki parmak bağırsağı ve kapı toplardamarı ile çevrili bölgesinde ünsinat proses –pankreas çengelsi çıkıntısı- olarak adlandırılan dört bölgesi bulunur.



Şekil 2.1. Pankreasın Kesitsel Anatomisi [1], gövde resiminin sağ üst köşede gösterilen iz boyunca kesitini temsil etmektedir. Mide, kolon, bağırsak zarı ve ince bağırsak lobları pankreasın önündedir. Pankreasın arkasında kapı toplardamarı, altında alt ana toplardamar, aorta, üst mezenterik atardamar, üst mezenterik toplardamar, böbrek ve omurga bulunur. Distal ana safra yolu pankreasın baş bölgesi boyunca uzanır.

Ana safra kanalının distal ucu pankreasın baş bölgesi boyunca uzanır ve oniki parmak bağırsağına giren pankreatik kanal girişine katılır (Şekil 2.2.). Bu yüzden baş bölgesinde pankreas iltihabına bağlı oluşan kanser, akıntı ve/veya yaralanmalar gibi patolojik durumlar safra tıkanması veya hasarına yol açabilir. Ön konumdaki yerleşiminden ötürü pankreasın her an travmadan korunması gerekir [1].



Şekil 2.2. Pankreatik Vasküler Sistem[1], pankreasa karın bölgesindeki organlar tarafından desteklenen iki ana atar damar yoluyla kan tedarik eder, bunlar çölyak ve üst mezenterik atardamarlarıdır. Pankreası besleyen çölyak arter dalları ve üst pankreatik-oniki parmak bağırsağı atardamarlarıdır. Pankreasın damarsal tahliyesi, dalak toplardamarları ve üst mezenterik toplardamarlar tarafından sağlanarak kapı toplardamarına yönlendirilmesiyle gerçekleşir.

2.1.2. Pankreasın Embriyolojik ve Post-natal Durumu

Farelerde yapılan deneyler, özellikle Cre-loxP soy hattının takip edilmesi pankreasın hormon salgılayan ve salgılamayan adacık hücrelerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Embriyonik multipotent kök hücrelerden köken aldığı daha önce de bilinen pankreasın bakımı ve gelişimidoğum sonrası yaşam süresince mevcut farklılaşmış hücrelerden bölünmesiyle sürdürülmektedir. Hasarlı pankreasta pankreatik kanalın yeniden bağlanması takiben, pankreatik adacık hücrelerinin öncülleri yeniden oluşur ve kanaldan kökenlenen adacık hücrelerinin öncülleri

yeniden ortaya çıkar. Pankreas alışlagelmiş kök hücrelere bağlı değildir, çünkü adacık hücrelerinin farklılaşması özel durumlardan yeniden aktive edilebilir.

Tip I diyabet pankreatik β hücrelerinin otoimmün yıkımı ile meydana gelmektedir ve regeneratif tıbbi vaka çalışmaları şeklinde katkı sağlayabilir hale gelmiştir. İnsülin salınımı ile kan şekerini düzenleyemez hale gelen β hücrelerinin kan dolaşımına yakın başka bir bölgeye yaklaştırılması ile kandaki glukozun homeostatik dengeye yeniden kavuşabildiği hayvan deneyleriyle gösterilmiştir [8].

2.2. PANKREAS KANSERİ VE ÖZELLİKLERİ

2.2.1. Pankreas Kanseri'nin Epidemiyolojisi

Günümüzde kanserler arasında en ölümcül olan ve son yıllarda artış gösteren pankreas kanseri, tanı zorluğu ve hayatta kalım süresinin kısa olması ve hızlı metastaz yapma özelliği ile tedavi yaklaşımlarını güçleştiren bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün GLOBOCAN veri tabanına göre pankreas kanseri melanoma olmayan deri kanserleri haricen bütün kanserler arasında Türkiye'deki görülme sıklığı Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir [2].

Çizelge 2.1. GLOBOCAN 2012 verilerine göre Pankreas Kanserin Türkiye'deki Cinsiyet Dağılımı[2]

Cinsiyet	İnsidans			Ölüm Oranı			5 Yıllık Sıklık		
	Sayı	(%)	ASR*	Sayı	(%)	ASR*	Sayı	(%)	Proporsiyon
Erkek	2015	2,3	6,1	1944	3,3	6,0	1428	0,9	5,2
Kadın	1159	1,9	3,0	1120	3,4	2,9	793	0,5	2,8
Ortalama	3174	2,1	4,5	3064	3,3	4,3	2221	0,7	4,0

Çizelge 2.1'de gösterilen, standartlaştırılmış yaş oranı (ASR), eğer popülasyon standart yaşa sahip bir yapı gösterirse ölçümün oransal olarak sahip olacağı değeri özetler. Yaşın kanserden ölme riski üzerinde oldukça önemli bir etkisi olduğundan, standardizasyon farklı popülasyonları karşılaştırmak için gereklidir.

ASR, yaşa özel oranın ağırlıklı ortalamasıdır ve ağırlık merkezi standart popülasyonun dağılımından elde edilir. En çok kullanılan standart popülasyon Dünya Standart Popülasyonudur. Hesaplanan ölüm oranı yaş ile standardize edilmiş dünya oranı olarak belirtilir. Aynı zamanda ASR, 100.000 kişide görülen vaka (proporsiyon) olarak ifade edilir [9].

Çizelge 2.2. Yıllara ve Cinsiyete Göre Toplam Kanser İnsidansı, (100.000'de, Dünya Standart Nüfusu), Türkiye[10]. Çizelge'de bütün oranlar 100.000 bireyde ortalama görülme sıklığı olarak verilmiştir.

		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Kadın	Pankreas	*	*	*	*	*	*	*	3,0
	Neoplazma	113,0	127,9	142,9	149,7	158,1	165,1	172,0	173,3
Erkek	Pankreas	3,1	3,1	4,0	4,4	5,2	6,3	6,1	5,4
	Neoplazma	154,2	168,7	236,3	246,5	256,4	279,0	279,0	269,7
Ortalama	Neoplazma	133,5	148,3	189,6	198,1	207,3	222,0	226,3	221,5

* Sağlık İstatistikleri Yıllığı'nda 2013'te belirtilmeyen oranlar

2.2.2. Pankreas Kanseri'nin Özellikleri

Pankreas kanseri kistik ve solid karakterli benign tümörler dışında tüm maligniteler arasında en ölümcül olanıdır.

Pankreasta meydana gelen kistlerin sadece %5-15'i neoplastik kist olarak belirlenmiştir, kistik neoplazi tüm neoplazi vakalarının %5'inden azdır [11]. Kistik neoplazi durumunda ise tamamen benign karakterli seröz kistadenomlar şeklinde ya da hemen her zaman kadınlarda görülen müsinöz kistik neoplazmlar olarak benign dan maligne kadar tüm karakterlerde gözlenebilirler.

A.B.D'de 2010 yılındaki hastalıksız ölümler dahil bütün ölümlerin %0,014'ünün sebebi pankreatik karsinoma olarak bilinen kanaldan köken alan yayılcı adenokarsinomdur [3].

2.3. HÜCRE BÖLÜNMESİ'NDE AURORA KİNAZLAR VE İNHİBİTÖRLERİ

Hücre bölünmesinde kalıtımın çekirdek içeriği açısından korunumu iki identik DNA kopyasının mikrotübül iğ aygıtı tarafından bölüştürülmesi ve iki kardeş hücreye paketlenmesi ile sağlanır. Mitozun yanlış kopyalarla tamamlanması genetik düzensizliğe neden olur ve diploid olmayan DNA içeriğine sahip hücreler ortaya çıkar. Tümör gelişiminin engellenmesi için mitotik aygıtların hedeflenmesi, kanıtlanmış bir yaklaşım sağlayan çeşitli anti-kanser ajanlarının piyasaya sunulması ile sonuçlanmıştır. Taksan ve alokoloidleri de içeren bu örneklerin birincil hedefi mitotik araçların mikrotübül bileşenleridir [12].

2.3.1. Hücre Döngüsünün Fazları

Ökaryotik hücre döngüsü 4 faza ayrılmıştır. Hücre döngüsünün temel görevi kromozomlardaki DNA'yı doğru bir şekilde duplike edip, kopyaları iki identik kardeş hücreye düzenli bir şekilde bölüştürmektir. Kromozomların duplikasyonu sentez fazında (S), tipik bir memeli hücresinde yaklaşık 10-12 saatlik sürede [13] gerçekleşir, bu süre hücre döngüsünün hemen hemen yarısını kapsar. S fazından sonra, kromozomların ayrılması ve hücre bölünmesi, memeli hücrelerinde yaklaşık 1 saat kadar süren mitoz (M) fazında gerçekleşir. M fazı iki önemli hücresel olaya sahne olur. İlki, kopyalanan kromozomların iki kardeş çekirdeğe dağıtıldığı çekirdek bölünmesi, diğer adıyla karyokinezdir. İkincisi ise, hücre ikiye bölünürken gerçekleşen sitoplazmik bölünme veya diğer adıyla sitokinezdir.

S fazının sonunda duplike olan kromozomların her iki çiftinde de DNA molekülleri özel protein bağları ile sarılmış ve sıkıca paketlenmiş şekilde birlikte tutulur. Profaz adı verilen erken mitotik aşamada çiftler halinde bulunan DNA molekülleri yavaş yavaş çözülmeye başlar ve kardeş kromatidler adı verilen sıkıştırılmış çubuk çiftlerine paketlenir. Yine de her iki kardeş kromatid kohezyonu ile bağlantılıdır.

Çekirdek zar birlikteliği bozulurken kardeş kromatid çiftleri, bipolar mikrotübül dizilerinden meydana gelmiş mitotik iğ eklemlenmiş hale gelirler. Karşılıklı kutuplarda odaklanmış iğ ipliklerine tutunan kardeş kromatidler metafaz adı verilen aşamada ekvator eksenine dizilirler. Kardeş kromatid kohezyonunun anafazın başlangıcında ortadan kalkmasının ardından, kardeş kromatidlerden her birinin mitotik iğ in zıt kutuplarına çekilmesi başlar.

Telofazda mitotik iğ bozulmaya başlarken ayrılan yavru kromozomların her biri ayrı çekirdekler halinde paketlenir. Sitokinez ile hücre bölünmesi tamamlanır, böylece kardeş hücreler iki çekirdekten birine sahip olur.

Birçok hücre, büyüme, protein ve organel kütlesini iki katına çıkarmak için oldukça fazla zaman harcar. Bu zamanın sağlanması amacıyla geçen süre için hücre döngüsünde ek fazlar tanımlanmıştır, M fazı ile S fazı arasında birinci aralık fazı (G1) fazı ve M fazı ile S fazı arasında ikinci aralık fazı (G2) tanımlanmıştır.

Bu fazlar dışında kavramlaştırılan bir diğer durum özellikle kök hücrelerin esnek doğasını tanımlamak için geliştirilmiştir [14]. G0 olarak tanımlanan bu faz uzun süre hücre döngüsü açısından pasif bulunan hücrelerin artan hücre ihtiyacını karşılamak için faz döngüsüne yeniden katılmasıyla son bulur. G0 fazı daha sonraları hücre çevrimi açısından pasifleşen anöplöid karakterde hücreler için de kullanılmıştır [15].

2.3.2. Basit Ökaryotlarda Aurora Kinaz Homologları

Saccharomyces cerevisiae'de Aurora kinaz B homologu Ipl1, her iki kardeş kromozomun da tek bir iğ kutbuna eklemlendiği sintelik oryantasyon adı verilen ayrışmayı, muhtemelen sentromer gerilimini ayarlayarak ve uygun olmayan mikrotübül bağlanmalarını destabilize ederek yönetmektedir. *S. cerevisiae* G1'de iğ kutup cisimciği (SPB) adı verilen duplike olmamış merkeze bağlanan sentromerleri ile atipiktir. Çünkü sentromerler SPBduplikasyonundan önce replike olur, böylece

tomurcuklanan mayalar eski SPB'ye her iki kinetokordan bağlanmış halde mitozaya girer [16]. Kardeş kromatid kohezyonunda kusurları olan veya DNA'sı replike olmadan mitozaya giren mutant mayalarda Ipl1 mikrotübül gerilimini takip ederek anafaza geçişi engeller[17].

Schizosaccharomyces pombe ise kardeş kromatid kohezyonuna ihtiyaç duyan Ark1 homologu ile iğ sentromer birlikteliğini sürdürür.



2.3.3. Aurora Kinaz A

Aurora kinazlar evrim sürecinde oldukça korunmuş serin treonin kinazlar süper ailesinin farklı görevlere sahip bir alt ailesidir. Protein ailesinin kurucu üyesi Aurora kinaz A, ismini mitotik iğ kutbunda kusurları bulunan ve iğ kutuplarında bu yüzden kuzey ışıklarını andıran bir görüntüye sahip olan bir mutant *Drosophila*'dan almaktadır [18].

Aurora kinaz A hücre döngüsünün S fazında sentrozomlarda birikir ve mitozun başlaması ile iğ kutuplarındaki sentrozomlarda yoğun bir şekilde yoğunlaşırlar, ek olarak iğ mikrotübülleri boyunca tespit edilebilirler [19]. Aurora kinaz A hücre döngüsüne bağımlı bir yoldan düzenlenir; hücre G fazına geçerken inaktive olur veya indirgenir, en yüksek sentezi ise G2/M fazında gerçekleşir.

Aurora A'nın aktifleşmesi dolaylı olarak cdc2/siklinB'nin fosforilasyon aktivitesine bağlıdır, ancak doğrudan hangi molekül tarafından fosforillendiği henüz net değildir [20]. Mitoz başlangıcında mikrotübüllerle ilişkili TPX2 proteinine bağlanmasıyla Aurora kinaz A'nın aktivasyon bölgesinde bir konformasyon değişimi olduğu kristalografi teknikleriyle belirlenmiştir. Daha sıkı bir yapı haline gelen fosforillenmiş aktivasyon bölgesinin bu değişim ile daha iyi bir substrat bağlanma yüzeyine dönüştüğü ve aktif fosforil grubunu protein fosfataz (PP1) [21] yardımıyla koruduğu bildirilmiştir.

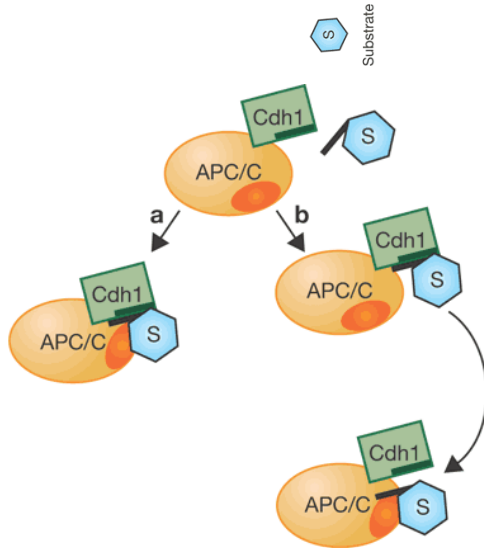
Yüksek Aurora kinaz A aktivitesine sahip kültür hücrelerinde yapılan deneylerdeğişmiş fenotipler üreten hücrelerin yüksek Aurora Kinaz A yoğunluğunda fonksiyonlarını sağlayamayacağını göstermektedir [20].

Aurora kinaz A ve B farklı hedeflerde bulunurlar, yine de hedef olarak iğ birlikteliğinin düzenlenmesinde ve kromozom ayrışması ile sitokinezde aldıkları rol itibariyle birbirlerini tamamlayıcıdır. Erken mitozda, iğ birlikteliği oluşmadan önce iki duplike olmuş sentrozom çeşitli proteinleri devreye sokar, bu olaya sentrozom olgunlaşması denir. Bu olgunlaşma, sentrozomlarda git gide artan, iğ birlikteliği açısından gerekli bir mikrotübül-nükleik asit birlikteliğine yol açar. İğ

birlikteliği oluşurken iki sentrozom birbirinden mikrotübülde etkili motor proteinler sayesinde ayrılır [22].

Sentrozomlar birbirlerinden ayrılırken kondanse olmuş kromozomlar kinetokorlardan mikrotübüllere bağlanır ve iğ aygıtının ortasında toplanır. Metafaz plağında toplanan kromozomlara bağlanmış kinetokor mikrotübüllerinden, iğ içerisinde bir kutuptan diğerine anti paralel etkileşimler gösteren mikrotübüllerden ve hücre korteksi ile ilişki kuran astral mikrotübülden [23] meydana gelen tamamlanmış mitotik iğ bipolarite gösterir.

İnsanda Aurora kinaz A'nın indirgenmesi, anafazyı teşvik eden kompleks/siklozom (APC/C)-ubikitin-proteozom yoluyla gerçekleşir [24]. APC/C kompleksinin iki aktivatörü olan hücre bölünmesinde faz düzenleyici protein (CDC20)[25] ve Kaderin tip I'den (CDH1) sadece biri, CDH1[26,27] Aurora kinaz B ile ilişkilidir. APC/C kompleksi ile substratını buluşturan (Şekil 2.3.) CDH1 iki hedefe yönelir; ilki Aurora kinaz A'nın N-terminal ucunda D-Box-aktive eden protein motifi (RxLxPS) [28], diğeri Aurora kinaz A'nın C-terminal ucunda başka bir D-Box motifi olan RxxLxxG motifidir [20].



Şekil 2.3. CDH1'in APC/C kompleksine substrat sunumu [27]

2.3.4. AURKB Lokusu ve Gen Varyantları

AURKB geni 17.kromozomun p kolunun 13.1 bandındabulunmaktadır. Ancak 8. kromozom üzerinde bir psödogen tanımlanmıştır. Bir serin treonin kinaz olan Aurora kinaz B'nin 3 farklı transkript varyantından sentezlendiği bilinmektedir. Bu varyanlar, 1314 baz çifti uzunluğundaki transkript varyantından [29] 344 aminoasit olarak daha uzun olan izoform 1 halinde; 1224 baz çifti uzunluğundaki transkript varyantından [30] 303 aminoasit olarak izoform 2 halinde; son olarak da 1317 baz çifti uzunluğundaki transkript varyantından [31] 345 aminoasit olarak izoform 3 halinde, 2015 yılında saptanmıştır (Ek 1. Aurora Kinaz B varyantları ve amino asit dizileri).

2.3.4.1. Aurora kinaz B

Serin/treonin kinazlar ailesinin aurora kinazlar alt ailesine ait bir protein olan Aurora kinaz B, AURKB geni tarafından kodlanmaktadır. Aurora kinazlar mitoz ve mayoz sırasında kromozomların mikrotübüllerle birlikteliğini etkileyerek anafazda kromozom ayrılmasını düzenler. Aurora Kinaz B, profaz sentromerlerinde kromozom kolları boyunca yayılmıştır. Metafaz sırasında iç sentromer bölgesinde bulunur olur ve kromozom kolları ile ilişki kurar, anafaz başlar başlamaz merkezi iç ve kortekse hareket eder ve telofazda mekezi içde sitokineze katkı sunmak üzere birikir [19]. İç sentromer proteini (INCENP), survivin (BIRC5) ve borealin (CDCA8) [32] ve diğer non-enzimatik alt ünitelerle birlikte CPC'yi oluşturur. Bu kompleks kinaz aktivitesini ve lokalizasyonunu yönetir.

Aurora kinaz B'nin mikrotübül kinetokor etkileşimlerini düzenlemesi, iç kontrol noktasını da düzenleyebiliyor olma ihtimalini güçlendirmektedir. İç kontrolü mikrotübül bağlantısı ve geriliminden yoksun kinetokorların varlığında hücrenin anafaza geçişini engelleyerek genetik materyalin hatasız ayrılmasını teşvik etmektedir. Aurora kinaz B açısından mutant hücreler, kinetokor gerilimi olmadığından hücrenin anafaza geçişini engelleyememektedir [6, 17, 33].

Diğer aurora kinazlar gibi Aurora kinaz B de D-Box aktive eden protein motifine sahiptir, ancak Aurora B'nin yıkımı insan protezomu C8'in (HC8) alfa alt birimine bağlanmasıyla başlar [34].

2.3.5. Aurora Kinaz C

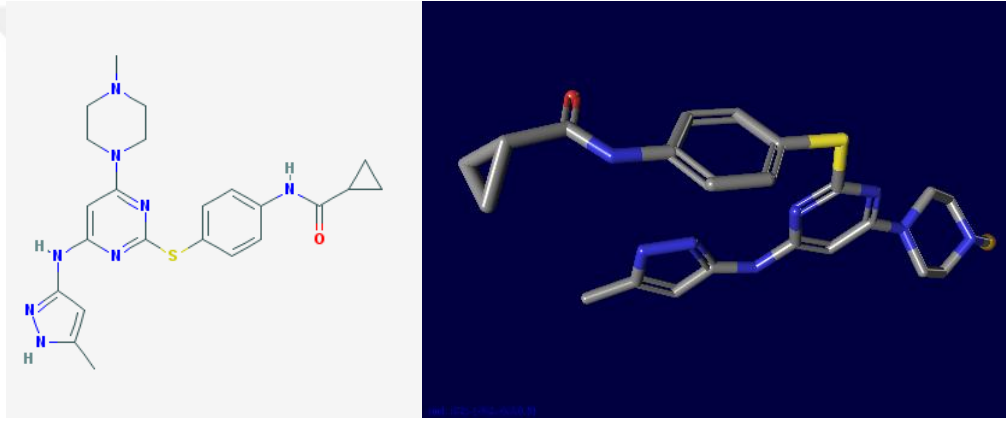
AURKC geninin özel olarak mitotik olarak bölünen hücrelerde sentezlendiği bilinmektedir [35]. Ayrıca sentezi Testis Çinko Parmak Proteini (TZFP) [36] adı verilen bir testis-spesifik transkripsiyon faktörü ile düzenlenmektedir.

Aurora kinaz C proteini de Aurora B'ye benzer şekilde IN-box bölgesinden INCENP'e bağlanır ve yine benzer bir tarzda [37] aktive olur.

2.4. TOZASERTİB'İN ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMASI

2.4.1. Tozasertib'in Özellikleri ve Bağlanma Kinetiği

VX-680, MK-0457, VX6 olarak da adlandırılan Tozasertib, Aurora kinazseçici inhibitörü olan bir fenil amid türevidir. Kimyasal adı;cyclopropane carboxylic acid(4-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)-6-(5-methyl-2H-pyrazol-3-ylamino)pyrimidin-2-ylsulfanyl)phenyl)amide olan Tozasertib sentetik bir kimyasaldır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Tozasertib'in Moleküler İskelet ve Stereokimyasal Formülü [38]

Tozasertib Aurora kinazlar ailesindeki üç memeli aurora kinazına da seçici bağlanma gösterir (Şekil 2.5.).Enzim bağlanma kinetiği çalışmalarında AURKA, AURKB, AURKC olmak üzere, kinaz inhibisyon konsantrasyonu sırasıyla 0.6 nM, 18 nM, ve 4.6 nM olarak tespit edilmiştir [39].

Tozasertib'in ayrıca, kolonileşmeyi uyarıcı bir sitokin reseptörü (fms)-ile ilişkili bir tirozin kinaz olan FLT3'e, 30 nM kinaz inhibisyon konsantrasyonu ile bağlanabildiği bildirilmiştir [40]. Tozasertib diğer protein kinazlara güçlü bir şekilde bağlanmamıştır.



Şekil 2.5. INCENP - Aurora kinaz B - Tozasertib arasındaki etkileşimler [38], INCENP proteini için mavi renk ile, Aurora kinaz B proteini için mor renk ile Tozasertib için ise kahverengi renk ile gösterilmiştir.

2.4.2. Aurora Kinaz B'nin diğer inhibitörleri

Aurora kinaz B inhibitörleri kanser tedavilerinde umut vadettiği kadar seçici inhibisyon özellikleri sayesinde bu enzimin görevlerinin daha iyi anlaşılmasını da sağlamıştır. Aurora kinazlar ailesinin diğer bir üyesi Aurora kinaz A ile Aurora kinaz B'nin işlevleri arasındaki farklar, mutantlarla yapılan çalışmalar sonucunda tam anlamıyla açıklanamamıştır. Ancak kinazolin türevi olan ZM447439 ile muamele edilen hücrelerin AURKB'ye özgü RNAi [7] ile muamele edilmiş hücrelerle fenotipik olarak aynı karakteri göstermeleri [6] ileri bir adım olmuştur.

AURKB'nin ATP yarışmalı inhibitörü olan ZM447439 ile muamele edilen hücreler interfaz boyunca ilerler, mitozu normal bir şekilde girer, kinetokor-mikrotübül etkileşimleri sekteye uğramaz ve bipolar mitotik iğler meydana gelir; fakat kromozomların iğ iplikçiklerine bağlanması, anafazda kardeş kromatidlerin ayrılması ve sitokinez gerçekleşmez. Yanlış konumlanmış kromozomların varlığına rağmen mitozdan normal bir kinetik ile çıkarlar. Bu da mitotik iğ kontrol noktasının ZM447439 varlığında doğru işlediğini gösterir. Bu deneyler, aynı zamanda CPC kompleksinin enzimatik olmayan üyeleri BUBR1, MAD2 ve CENP-E'nin

AURKBinhibitörleri varlığında indirgendiğini, kinetokorlara bağlanmadıklarını göstermiştir [6].

CPC kompleksi mitozun erken aşamasında mitotik için kromozomlar ve mikrotübüller arasında yaptığı yanlış bağlanmaları düzelterek kromozom dizilimini organize eder [4]. Mitoz sırasında bu kompleks hücrede iki şekilde bulunur. Komplekslerden biri dört bileşeni de içerirken (AURKB, INCENP, BIRC5, CDCA8), diğeri INCENP ve AURKB'yi içerir. Dörtlü bileşen kromozom dizilimi ve sitokinez süresince işlevsel iken, INCENP-Aurora B kompleksi histon 3 (H3)'ün modifiye edilmesinden sorumludur [32].

İnsan pankreatik kanseri hücre hatları olan AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, CFPAC-1, Mutj, HPAFII, Mia PaCa-2, Panc-1 ve Su.86.86'da Aurora kinaz B gen kopya sayısının 2-5 kat arttığı ve protein düzeylerinin 3-4 kat arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca AURKB'nin gen anlatımının anti-sense oligonükleotidler ile inhibisyonu pankreatik kanserlerde hücre döngüsünü durdurmuştur [5].

Bu bilgiler ışığında kanser tedavi yaklaşımları arasında Aurora kinaz B'nin inhibisyonu; yeni inhibitörlerin keşfi ve bilinen inhibitör etkilerinin farklı hücre hatlarında tekrarlanabilirliği çalışmaları ile önem kazanan bir yaklaşım olmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) kök hücre hazırlık, kök hücre akan hücre ölçer, kök hücre doku kültürü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş olup, bu yüksek lisans tezi Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir (BAB- FBF-BB (HÇ) 2014-1YL).

3.1. KULLANILAN CİHAZ VE SARF MALZEMELERİ

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

- Class-II tipi VERTICAL LAMINAR AIRFLOW CABINET: CFPAC-1 hücrelerinin çalışmalarında kullanılan steril ortam sağlayan kabin.
- Esco Cell Culture (CCL-170B-8) inkübatörü: CFPAC-1 hücrelerinin çoğaltma işleminin uygulandığı %5CO₂, %95 nem ve 37°C sıcaklıkta optimum şartları sağlayan inkübatör.
- 5.000 devirli UNIVERSAL 320/320 R santrifüj: Hücrelerin yıkama, çözme ve tripsinizasyon işlemlerinde kullanılan santrifügasyon cihazı.
- WiseCube inkübatör: Hücre kültür işlemelerine başlamadan önce 37°C sıcaklığa getirilecek malzemenin tutulduğu inkübatör.
- Cedex XS Analyzer: Otomatik hücre sayım cihazı.
- Zeiss Marka Inverted Mikroskop: Hücrelerin morfolojik görüntüleri için gerekli mikroskop.
- xCELLigence DP cihazı: İlaç uygulanan hücrelerin sitotoksisite ve migrasyon analizleri için gerekli Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü.
- Derin Dondurucu: Hücre kültür malzemelerinin -20°C de saklandığı dolap.
- Buzdolabı: Hücre kültür malzemelerinin +4°C de saklandığı dolap.
- Cedex XS hücre sayım cihazı: Tripan mavisi ile hücre canlılığı ölçümü yapılan, bir kuyucuğu Thoma lamının özelliğini gösteren hücre sayım cihazı
- Smart Slides: (8 Thoma lamı=1 Smart Slides)
- BD FACS AriaIII FACSakan Hücre Ölçer Cihazı: Hücrelerin Annexin-V ve DNA hücre döngüsü analizlerinin yapıldığı 3 lazerli yüksek çıktılı cihaz.

- Corning marka Flasklar (T75, T25): İçinde hücrelerin kültüre edildiği kaplar.
- BD Falcon tüpler (15 ve 50 ml): Hücrelerin santrifüjünde kullanılan konik tüpler.
- 96-Well Plate: Konsantrasyon ve zaman bağımlı ilaç uygulamalarında kullanılan kuyucuklu plateler.
- Serolojik Pipetler (5-10 ml): Hücrelerin beslenmesi ve yıkanması aşamasında kullanılan pipetler.
- Pastör pipetler: Hücrelerin yıkanması ve küçük miktarlardaki işlemler için kullanılan dereceli 3 ml hacimli pipetler.
- Mikropipetler: Hücrelere mikro düzeylerde ilaç ve madde uygulamalarında kullanılan pipetler.

3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler

- CFPAC-1 pankreas karsinoma hücre hattı
- IMDM besiyeri
- FBS
- L-glutamin
- Penisilin/Streptomisin
- Amfoterisin-B
- Tripsin/EDTA (etilen diamin tetraasetik asit)
- Tripan mavisi
- DPBS
- Steril su
- BD CycleTEST Plus DNA Reagent kiti
- BD Pharmingen Annexin-V FITC kit

KATKISIZ BESİYERİ

IMDM

Hiçbir ek madde yok

KATKILI BESİYERİ

IMDM

+ % 10-15 FBS

+ % 1 L-Glutamin

+ % 1 Penisilin/Streptomisin

+ % 1 Amfoterisin-B

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. CFPAC-1Hücre Hattının Kültüre Edilmesi

CFPAC-1 hücre hattı (ATCC® CRL-1918™) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI'dan sağlanmıştır.

3.2.2. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi ve Pasaj İşlemi

Besiyeri olarak %10 FBS, %1 Pen/Strep + Amfoterisin-B, %1 L-Glutamin içeren katkılı IMDM kullanıldı. Hücre kültür şişesi olarak filtre kapaklı T25 ve T75 (CellStar) boyutlarında kaplar kullanıldı. Hücreler optimum koşulları olan %95 nem, 37 °C ve %5 CO₂'li ortamı şartlarını sağlayan Esco Cell Culture (CCL-170B-8) inkübatörde kültüre edildi.

➤ Hücrelerin çözülmesi esnasında, steril bir ortamda aşağıdaki protokol izlendi.

- Bir beher içine distile su koyup 37 dereceye kadar ısınması beklendi.
- Azot tankından dondurma tüpü çıkarıldı.
- Çıkarılan dondurma tüpü buz aküsü üzerine koyuldu.
- Dondurma tüpü buz aküsü üzerinde ısınan su banyosunun yanına taşındı.
- Dondurma tüpü su banyosuna kondu ve 1-2 dakika beklendi.
- Dondurma tüpünün çevresine alkol sıkıldı ve kurulandı.
- Bir tüp içerisine 7-9 ml besiyeri koyuldu.
- Dondurma tüpündeki hücre karışımı sıvı tüpe aktarıldı.
- Pipetaj yapıldı ve 500xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüpün üzerindeki süpernatant pastör pipeti ile çekilerek atıldı.
- Tüpün dibinde kalan çökelti besi yeri eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı.
- Tüpte oluşan hücre ve besi yeri karışımı kültür kabına aktarıldı.

- Kültür kabına 2ml besi yeri ilave edildi.
- Hücreler mikroskopta kontrol edildi.
- Kültür kabı 37 °C, %5 CO₂ sağlayan etüve yerleştirildi ve 3 gece inkübe edildi.

3.2.3.Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler yaklaşık her 3 günde bir kez beslendiğinde kültür kabının yüzeyini doldurabilmektedir. Konflüans olarak da adlandırılan hücre yoğunluğu %70-100 oranında sağlandığında hücreler başka kültür kaplarına aktarılabilir. Çalışmalarımızda hücreler, T25 kültür kabında uygun konflüansa ulaştıktan sonra 1:3oranında pasajlanarak yeni kültür kaplarına alındı. Pasajlama işlemi için aşağıdaki metod kullanıldı. Bu işlemlerde Lonza marka Tripsin-EDTA, Dullbecco marka PBS kullanıldı.

- 1) Hücre yüzeyini kaplayan medium pipetle çekilerek uzaklaştırılır.
- 2) DPBS ile hücreler yıkanır.
- 3) 1-2 ml Tripsin-EDTA eklenerek oda sıcaklığında veya 37°C'de inkübe edilir.
- 4) Flask yüzeyinden kalkan hücreler 15 ml'lik tüpe aktarılır.
- 5) Tüpün üzerine 5-6 ml IMDM ilave edilir.
- 6) 500xg'de 5 dakika santrifüj edilir.
- 7) Tüpün üzerindeki süpernatant uzaklaştırılır.
- 8) Dipte kalan hücrelerin üzerine 6 ml katkılı IMDM eklenir ve 3 kültür kabının her birine 2 ml dağıtılır.
- 9) T25 kültür kaplarına 3 ml, T75 kültür kaplarına 13 ml IMDM eklenir.
- 10) Kültür kapları 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilir.

3.2.4. Hücrelerin Sayılması

Hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulanarak, tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Kaldırılan hücreler bir tüpe alınarak 500 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek

tüpün üzerindeki süpernatant atıldı. Kalan çökeltinin üzerine 1 ml IMDM besi yeri eklenecek pipetaj yapıldı.

Cedex XS (ROCHE, Mannheim, Germany) cihazı ve cihazın yazılımını taşıyan kontrol ünitesi açıldı. Resüspanse edilen hücrelerden 20 µl alınarak 0,2 ml lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Tüpün içerisine 1:1 oranında distile su ilave edilmiş 20 µl Tripan Mavisi (ROCHE Mannheim, Germany) eklendi. Karışım pipetajlanarak homojen hale getirildikten sonra cihaza ait olan Smart Slides (ROCHE Mannheim, Germany) adı verilen özel lama 20 µl hücre karışımı eklendi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Cedex XS Smart Slides, iki farklı yönden örnek yüklenebilen 8 kuyucuğa sahiptir.

Lam Cedex cihazına yerleştirildi ve hücre sayımı yapılarak not edildi.

3.3. xCELLigence SİSTEMİNDE GERÇEK ZAMANLI CANLI HÜCRE ANALİZİNİN YAPILMASI

xCELLigence sistemi herhangi bir işaretleme yapılmaksızın hücrelerin doğal hallerinin gerçek zamanlı olarak ölçülmesi için tasarlanmış bir cihazdır. Çalışma prensibi, elektronik devre elemanların sahip plakların tabanına yerleştirilen mikroelektrotların elektriksel empedans değerlerini ölçmesine dayanır. Hücre canlılığı, morfolojisi, sayısı ve hareketi gibi hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif verilere ulaşmamızı empedansta meydana gelen bu değişim sağlar. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı inkübatör içerisine yerleştirilen ve elektronik plakların koyulduğu bir ana ünite ile veri kablosu yardımı ile ona bağlanan bir kontrol biriminden meydana gelir (Şekil 3.2.).

Cihaz, inkübatöre yerleştirilmeden önce %80 alkol ile kendi temizlik kiti kullanılarak temizlendi ve 45 dakika sterilizasyon için laminar kabinde UV'ye maruz bırakıldı. Sterilizasyon tamamlandıktan sonra ana ünite inkübatöre yerleştirildi ve standardizasyon plağı kullanılarak standardizasyon işlemi yapıldı.



Şekil 3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Ölçüm Cihazı Ana Ünite ve Kontrol Ünitesi

3.3.1. E-plate Tasarımı ve Software Planlaması

Yazılımın açılmasından sonra öncelikle E-plate'in yükleneceği kızak belirlendi (cihaz 3 kızaklıdır). "Experiment Notes" sekmesinden deney ile ilgili genel bilgiler girilerek plate tasarlandı. "Layout" sekmesi ile plate'in yerleştirileceği kızak ve plate düzeninin girişi yapıldı. Çalışmada H1 ve H2 kuyucukları kontrol (yalnızca Medium içerir), A1/A2'den G1/G2'ye kadar olan kuyucuklar ise örnekleri içerecek şekilde ekildi. "Schedule" sekmesinden deney aşamaları tasarlandı. Arka plan ölçümü olarak 1 Sweep x 1 Interval' den oluşan ve 19 saniye sürececek şekilde, 30 dakikada bir ölçüm alınmak sureti ile 184 adet ölçümün yapılması programlandı. Bu planlama ile hücre titrasyon eğrisine ulaşıldı.

3.3.2.Hücre Titrasyonunun Belirlenmesi

Hücre titrasyonunun belirlenmesi için hücrelerin en az %80 konfluent olması gerekmektedir. Hücreler beklenen konfluentlik düzeyine geldiğinde tripsinize edildi ve pellet, 1 ml katkılı besi yeri ile resüspanse edilerek tripan mavisi yöntemi ile Cedex XS cihazında sayımı yapıldı (Hücrelerin sayılması). Sayımdan sonra E-plate 16'nın (Şekil 3.3.) kontrol kuyucukları da dâhil olmak üzere yaklaşık 100 µl besi yeri eklenerek arka plan ölçümü alındı.



Şekil 3.3. E-Plate 16, toplamda 16 kuyucuğa sahiptir. E-Plate 16 kuyucuklarının altındaki elektrotlar sayesinde empedans ölçümü yapmaktadır.

Ölçüm sonrasında hücre sayısı $2 \times 10^5/\mu\text{l}$ olacak şekilde ayarlanarak, E-plate 16'nın kuyucuklarına duplike olarak uygulandı. A1 ve A2 kuyucuklarından alınan 100 µl hücre süspansiyonu G1 ve G2 kuyucuklarına kadar her seferinde $\frac{1}{2}$ seri sulandırma yapılarak seyreltildi. Bu aşamada hava kabarcığı çıkartmamaya ve aşırı köpürtme yapılmamaya dikkat edildi. Kuyucuklardaki hücre sayısının dağılımı Çizelge 3.1.' deki gibidir.

Çizelge 3.1. E-Plate 16 düzeni

(Değerler Hücre sayılarını belirtmektedir).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	200000	100000	50000	25000	12500	6250	3125	KONTROL
2	200000	100000	50000	25000	12500	6250	3125	KONTROL

H1 ve H2 kuyucuklarına yalnızca besiyeri yüklendive kontrol olarak kullanıldı. Yükleme işleminin ardından hücrelerin tabana çökmesi için 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Yarım saatlik süre sonunda plate cihazın D1 kızağına yerleştirilerek ölçüm işlemi başlatıldı. 100 saatlik empedans ölçümü alındı. Ölçüm sonucunda bulunan uygun hücre sayısı diğer deneylerde kullanıldı.

3.3.3.CFPAC-1 Hücrelerinin E-plate 16' ya Yüklenmesi ve Tozasertib Uygulanması

Titrasyonun ardından belirlenen uygun hücre sayısı seçilerek ilaç uygulanması için kullanıldı. Kuyucuklardaki sabit hücre sayılarına farklı konsantrasyonlardaki Tozasertib konsantrasyonları uygulandı. Tozasertibin sitotoksik özellikleri (IC₅₀) belirlendi. Titrasyon deneyindeki aşamalara ek olarak bu aşamada bütün kuyucuklara 90 µl katkılı besiyeri eklenerek arka plan ölçümü alındı, hücreler 100 µl katkılı besiyeri ile kuyucuklara yüklendi. Belirlenen inkübasyon süresi sonunda (yaklaşık 20-30 saat) 10 µl hacimde farklı ilaç konsantrasyonları kuyucukların son hacmi 200 µl olacak şekilde, kuyucuklara tutunan hücrelerin kalkmaması için pipetaj yapılmadan, hava kabarcığı bırakılmadan dikkatlice hücrelerin bulunduğu kuyucuklara ilave edildi. F1 ve F2 kuyucukları, Tozasertib dahil hiçbir ajan içermeyen normal büyüme eğrisi kontrolü için aynı sayıda hücre ile yüklendi. G1 ve G2 kuyucuklarına ilaç yüklemesi yapılmazken, Tozasertibin çözücüsü olan DMSO'nun toksik etkileri için kontrol oluşturuldu. H1 - H2 kuyucuklarına ise yalnızca medium ve Tozasertib'in en yüksek konsantrasyonu

yüklendi ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Plate'in dizaynı Çizelge 3.2.'deki gibidir.

Çizelge 3.2. İki tekrarlı Tozasertib Uygulaması İçin E-plate 16 Düzeni

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	HÜCRE 10 ⁻⁴ M Tozasertib 500 ppm DMSO	HÜCRE 10 ⁻⁵ M Tozasertib 50 ppm DMSO	HÜCRE 10 ⁻⁶ M Tozasertib 5 ppm DMSO	HÜCRE 10 ⁻⁷ M Tozasertib 0.5 ppm DMSO	HÜCRE 10 ⁻⁸ M Tozasertib 5000 ppt DMSO	HÜCRE	HÜCRE 500 ppm DMSO	BESİYERİ
2	HÜCRE 10 ⁻⁴ M Tozasertib 500 ppm DMSO	HÜCRE 10 ⁻⁵ M Tozasertib 50 ppm DMSO	HÜCRE 10 ⁻⁶ M Tozasertib 5 ppm DMSO	HÜCRE 10 ⁻⁷ M Tozasertib 0.5 ppm DMSO	HÜCRE 10 ⁻⁸ M Tozasertib 5000 ppt DMSO	HÜCRE	HÜCRE 500 ppm DMSO	BESİYERİ

3.3.4.xCELLigence Cihazında Migrasyon İçin CIM-Plate Uygulaması

Hücreler deneye başlanmadan bir gün önce pasajlandı. Hücreler bir gece serumsuz (FBS içermeyen) besi yerinde bırakıldı. %80 konfluent seviyesine ulaştıktan sonra besiyeri alındı ve DPBS ile iki kez yıkama yapılarak tripsinize edildi. Daha sonra, hücreler DPBS ile santrifüj edildi. Elde edilen pellet katkısız besi yeri ile süspansiyon edilerek kuyucuklara aktarıldı.

CIM-Plate 16 birbirinden ayrılabilen 3 parçadan oluşmaktadır (Şekil 3.4.). En Alt bileşende bulunan kuyucuklara A1'den F2'ye kadar baloncuk oluşturmadan 160 µl %20 FBS içeren katkılı besi yeri yüklendi. G1, G2, H1 ve H2 kuyucuklarına ise 160 µl katkısız besi yeri eklendi. İşlemin sonrasında üst parça yerleştirildi. Önce 40 µl katkısız serum eklenerek 20 dk. oda sıcaklığında bekletilen plak xCELLigence DP cihazının kızıağına (Şekil 3.2.) yerleştirilerek elektronik olarak kalibre edildi.

Daha sonra Çizelge 3.3.'te gösterildiği gibi üst parçada, 50 µl hacimde katkısız besi yeri ile süspansiyon edilen hücreler birinci sütunda A1'den G1'e kadar 40.000 hücre popülasyonu olarak yüklendi. İkinci sütunda ise A2'den G2'ye kadar her bir kuyucuğa 20.000 hücre popülasyonu olarak katkısız besi yeri ile süspansiyon

edilen hücreler yüklendi. Plak Esco Cell Culture (CCL-170B-8) inkübatörü içindeki xCELLigence cihazının ikinci kızıağına yerleştirilerek 20 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında Çizelge 3.3.'te gösterilen Tozasertib uygulamaları iki farklı doz test edilecek şekilde 10 µl hacimde yapıldı. Son olarak yazılım başlatılarak 15 dakikada bir 90 saat boyunca ölçümler alınması sağlandı.

Çizelge 3.3 Migrasyon Deneyi CIM Plate 16 Tasarımı

	1		2	
	Üst Kuyucuk	Alt Kuyucuk	Üst Kuyucuk	Alt Kuyucuk
A	100 µl Serumsuz besiyeri 4x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS	100 µl Serumsuz besiyeri 2x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS
	10 ⁻⁷ M Tozasertib		10 ⁻⁷ M Tozasertib	
B	100 µl Serumsuz besiyeri 4x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS	100 µl Serumsuz besiyeri 2x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS
	10 ⁻⁷ M Tozasertib		10 ⁻⁷ M Tozasertib	
C	100 µl Serumsuz besiyeri 4x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS	100 µl Serumsuz besiyeri 2x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS
	6,4x10 ⁻⁸ M Tozasertib		6,4x10 ⁻⁸ M Tozasertib	
D	100 µl Serumsuz besiyeri 4x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS	100 µl Serumsuz besiyeri 2x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS
	6,4x10 ⁻⁸ M Tozasertib		6,4x10 ⁻⁸ M Tozasertib	
E	100 µl Serumsuz besiyeri 4x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS	100 µl Serumsuz besiyeri 2x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS
	Tozasertib (-)		Tozasertib (-)	
F	100 µl Serumsuz besiyeri 4x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS	100 µl Serumsuz besiyeri 2x10 ⁵ hücre	160 µl %20 FBS
	Tozasertib (-)		Tozasertib (-)	
G	100 µl Serumsuz besiyeri 4x10 ⁵ hücre	Katkısız Besi Yeri	100 µl Serumsuz besiyeri 2x10 ⁵ hücre	Katkısız Besi Yeri
	Tozasertib (-)		Tozasertib (-)	
H	100 µl Serumsuz besiyeri Hücre (-)	Katkısız Besi Yeri	100 µl Serumsuz besiyeri Hücre (-)	Katkısız Besi Yeri
	Tozasertib (-)		Tozasertib (-)	



Şekil 3.4. CIM Plate 16, üç kısımdan oluşur. Yatayda 8 olmak üzere duplike olarak toplamda 16 kuyucuktan oluşmaktadır. En altta migratif bir ajanın yüklendiği alt tabla, orta kısımda örneklerin yüklendiği plak ve üst kapak mevcuttur.

3.4. Aurora kinaz-B, INCENP, Borealin ve Survivin PROTEİNLERİNİN BOYAMA PROTOKOLÜ VE ANALİZİ

Antikor boyama için aderent özellikli petripler kullanıldığından üretici tarafından önerilen (EK-3 İmmünokimyasal Antikor Tespiti için Hazırlık ve Uygulama Protokolü) [41] slip lam temizlik ve kaplama aşaması yapılmadı. Ancak üreticinin sonraki yönergelerine uygun olacak şekilde plak başına 5×10^5 hücre ekerek bir gece, %5 CO₂'de 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra 24 saat ve kontrol oluşturulacak şekilde IC₅₀ Tozasertib uygulaması yapıldı. İnkübasyon sürelerinin sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler laminar kültür kabiniinde, oda sıcaklığında 10 dakika %4 paraformaldehit ile inkübe edildi. Daha sonra fiksatif uzaklaştırılarak DPBS ile çift yıkama yapıldı.

Hem nükleer hem de stoplazmik lokalizasyon hedeflediğimiz için permeabilizasyon amacıyla hücreler %0.5 Triton X-100 içeren PBS ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonra permeabilizasyon tamponu uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS-T (%0.1 Tween 20) ile 5 dakika yıkandı.

Spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin bloklanması amacıyla %1 BSA içeren PBS-T kullanılarak bloklama solüsyonu hazırlandı ve 1 saat oda sıcaklığında bloklama işlemi gerçekleştirildi.

Kullandığımız antikorlar NOVUS Biologicals tarafından üretilen işaretli primer antikorlardır ve sekonderantikor tespiti uygulamaksızın doğrudan kullanıma hazırdır. Sekonder antikor kullanılmadığından üreticinin önerdiği primer antikor tespiti yapılmadı ve doğrudan 3 kere 5'er dakika PBS-T ile yıkandı. Bu ve bundan sonraki basamaklarda hücrelerin kurumamasına dikkat edildi.

Auroa Kinaz B proteinine bağlanan DyLight 488 işaretli NBP1-74027G ürün numaralı 100 testlik paketlenmiş NOVUS Biologicals markalı seçici antikorla önerilen 1:1000-1:2000 aralığı için seyreltme ve titrasyon yapıldı. Önerilen en yoğun konsantrasyonun kullanılmasına karar verildi.

INCENP proteinine 325-400. amino asitler arasından bağlanan DyLight 650 işaretli NB100-2286C ürün numaralı 0,1 ml paketlenmiş NOVUS Biologicals markalı seçici antikorla önerilen 1:100-1:500 konsantrasyon aralığı için seyreltme ve titrasyon yapıldı. Bu konsantrasyonlarda INCENP antikoru için görüntü alınamadı.

Borealin proteinine 200-250. amino asitler arasından bağlanan DyLight 405 işaretli NBP1-22832V ürün numaralı 0,1 ml paketlenmiş NOVUS Biologicals markalı seçici antikorla önerilen 1:50-1:200 konsantrasyon aralığı için seyreltme ve titrasyon yapıldı. Önerilen en yoğun konsantrasyonun kullanılmasına karar verildi.

Survivin proteinine bağlanan DyLight 550 işaretli NB500-201R ürün numaralı 0,05 ml paketlenmiş NOVUS Biologicals markalı seçici antikorla önerilen 1:50-1:250 konsantrasyon aralığı için seyreltme ve titrasyon yapıldı. Önerilen en yoğun konsantrasyonun kullanılmasına karar verildi.

Bu antikolar hazırlanan konsantrasyonlarda bloklama çözeltisine eklenerek oda sıcaklığında bir gecelik inkübasyona alındı. Fluoroforların solmaması için bu basamakta plaklar folyo ile kapatıldı. Sonra antikoları uzaklaştırmak için PBS-T ile 5'er dakika 3 kere yıkandı. Daha sonra 150 µl/ml konsantrasyonda NucBlue Fixed Cell Ready Probes Reagent formülatlı DAPI ile 15 dk. muamele edildi.

Yıkamadan sonra hücreler konfokal mikroskopta gözlenmeye uygun hale geldi. Örneklerin görüntülenmesi Carl Zeiss LSM 700 konfokal mikroskopta gerçekleştirildi.

3.5. IC₅₀ KONSANTRASYON/ZAMAN AYARLI TOZASERTİB'İN APOPTOTİK AKTİVİTESİNİN CFPAC-1 HÜCRELERİNDE FITC Annexin YÖNTEMİ İLE AKAN HÜCRE ÖLÇERDE GÖSTERİLMESİ

IC₅₀ konsantrasyon aralığı olan 6,4x10⁻⁸ M konsantrasyonda Tozasertib'in pankreatik adenokarsinoma hücre hattı CFPAC-1 üzerinde hücre ölümü açısından nasıl bir etkiye bulunduğu tespit edilebilmesi için FITC Annexin V yöntemi, akan hücre ölçerinde analiz edilerek uygulandı. Bu yöntemin temeli apoptotik aktivitenin hücre membranı üzerinde neden olduğu değişikliklerin tespitine dayanmaktadır.

Apoptozun erken olaylarından biri membrandaki fosfatidilserinin (PS) plazma membranının iç yüzünden dış yüzeyine geçmesidir [42]. Ca⁺² bağımlı fosfolipitlere bağlanan bir protein olan Annexin V'in PS'e affinitesi yüksektir ve Annexin V işaretli bir fluorokrom, dış yüzeye göçen PS'i akan hücre ölçer ile tespitinde kullanılabilir. Annexin V FITC apoptoz tespiti tekrarlanabilir ve güvenilir bir apoptoz testidir. Akan hücre ölçer yazılımları ile oluşturulabilir [43].

3.5.1. CFPAC-1 hücrelerinin ekimi, IC₅₀ Tozasertib uygulanması

Kontrol ve konsantrasyon/zaman bağımlı ilaç ölçümlerinin 12 ve 24 saatlik uygulamaları için 1'er adet kontrol sütunu olmak üzere 4 kuyucuk, 2'şer adet ilaç uygulama olmak üzere iki grup halinde 8 kuyucuk kullanıldı (Çizelge 3.4.).

Her kuyucuğa konulacak CFPAC-1 hücreleri, %80 konfluent olan kültürden tripsinize edildi. Daha sonra hücrelerin canlılık durumu ve hücre sayısı, Cedex cihazında tripan mavisi yöntemi ile tespit edildi. Ortalama olarak 100.000 hücre/ml olarak seyreltilip tekrar Cedex cihazında ölçülen hücreler her kuyucuğa 500 µl hacimde 50.000 hücre olacak şekilde dağıtıldı.

Çizelge 3.4. FITC Annexin V testi için hazırlanan hücrelerin plak tasarımı

12 Kuyucuklu Plak-1			12 Kuyucuklu Plak-2		
Grup 1 Kontrol 12. sa.	Grup 2-A 12. saat IC ₅₀ Uygulaması	Grup 2-B 12. saat IC ₅₀ Uygulaması	Grup 3 Kontrol 24. sa.	Grup 4-A 24. saat IC ₅₀ Uygulaması	Grup 4-B 24. saat IC ₅₀ Uygulaması
50.000 Hücre	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB
50.000 Hücre	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB
50.000 Hücre	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB
50.000 Hücre	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB	50.000 Hücre 6,4x10 ⁻⁸ M TOZASERTİB

Plaklar 37 °C ve %5 CO₂ şartlarını sağlayan Esco Cell Culture (CCL-170B-8) inkübatöründe 30 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda Çizelge 3.4.'te gösterildiği gibi, IC₅₀ olarak tespit edilen 6,4x10⁻⁸ M konsantrasyonu toplam hacimde elde edebilecek şekilde katkısız IMDM medium ile hazırlanan 200 µl hacimde Tozasertib, 12ve 24 saatin 1. ve 2. Gruplarına uygulandı.

Plak-1 12. saatin sonunda, Plak-2 ise 24. saatin sonunda tripsinize edildi. Tripsinizasyon aşamasından sonra Plak-1'de ve Plak-2'de her sütun bir gruba ait olarak 15 ml'lik falkonlarda birleştirildi. Böylece, Plak 1 için fitokrom boyama prosedüründe uygulama yapılacak 12. sa.- kontrol, 12. sa.-1, 12.sa-2 olmak üzere 3 deney grubu kuruldu. Plak 2 için ise, 24. sa. kontrol, 24. sa.-1, 24. sa.-2 olmak üzere 3 deney grubu kuruldu.

Ayrıca CFPAC-1 hücre hattındaki bazal apoptozun belirlenebilmesi için T25 plaklarında 12 ve 24 saat gruplarını 2'şer plakta temsil edecek bir başka uygulama yapıldı. Her plakta yaklaşık 2x10⁶ hücre bulunan uygulama grupları 30 saat inkübe edildi. Daha sonra Tozasertib uygulamalarında harcanan süreyi de yansıtması için gruplar, ek olarak 12 veya 24 saat daha inkübe edildi.

Bütün gruplar 2300 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatantla beraber tripsin uzaklaştırıldı. Daha sonra 1 ml 1X DPBS eklenerek tripan mavisi metodu ile Cedex cihazında hücre popülasyonu ve canlılığı not edildi. Popülasyonlar 1x10⁶ hücre/ml konsantrasyon elde edilecek şekilde DPBS ileseyreltildi.

3.5.2. FITC Annexin V testi için fitokrom boyama prosedürünün gerçekleştirilmesi

Hücre kültürü ve Tozasertib uygulaması sonucu elde edilen her grup, iki kez soğuk 1x DPBS ile yıkanarak 500xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Yıkama sonrası kalan pellet 1 ml 1x Binding Buffer ile seyreltildi. Her gruptan 100 µl, yani yaklaşık 100.000 hücre alınarak 5m'lik FACS tüplerine pipetle aktarıldı.

12. saat ve 24. saat gruplarında ise 5 µL PI, 5 µl FITC ve 5 µL PI+ FITC boyaarı uygulanarak hafifçe karıştırıldı ve karanlıkta 15 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her tüpe 400 µL soğuk 1x Binding Buffer eklendi.

Bazal apoptoz uygulamasında, diğer uygulamaların FITC veya PI içeren tek floroforlu kapılamaları tespit edilmiş olduğundan sadece florofor boyasız ve 5 µL PI + 5 µL FITC içeren boyamalar oluşturuldu. FITC Annexin V ve PI florofor boyaarı içeren 12 ve 24 saat grupları 15.dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Kapılama kontrolleri ise daha önce buza yatırıldı. 15 dakikalık inkübasyon süresi sonunda tüm tüplere 400 uL soğuk 1x Binding Buffer eklendi.

Okumalar BD FACSAriaIII cihazında FITC Annexin V prosedürüne uygun olarak yapıldı.

3.6. DNA HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN AKAN HÜCRE ÖLÇERDEANALİZİ

DNA'nın hücre döngüsündeki fazlarda dağılımının analiz edilmesine dayalı olarak hücre döngüsünün akan hücre ölçerde tespiti, hücrede çekirdeğin boyanması temeline dayanır. Metod ilk olarak membran lipidlerinin noniyonik bir deterjan ile çözülmesi ile gerçekleştirilir. Daha sonra bu işlemi, tripsin uygulaması ile hücre iskeleti ve çekirdek proteinlerinin elimine edilmesi takip eder. Son olarak da hücrel RNA'nın sindirilmesi ve çekirdekteki kromatinin spermin ile stabilize edilmesi gerçekleştirilir [44,45].

DNA'nın stabilize edilmesi sonrasında sitokiyometrik olarak DNA'ya bağlanan Propidyum iyodit'in (PI) lazer ışınlarını emite etmesi ile ölçüm gerçekleştirilir. PI'in emisyon aralığı 580 ile 650 nm dalga boyları arasındadır, bu dalga boylarında çalışan akan hücre ölçer lazeri ile uyarılan PI'in eksitasyonundan alınan veriler DNA hakkında ihtiyacımız olan bilgiyi sağlamaktadır [46].

3.6.1.CFPAC-1 hücrelerinin ekimi, IC₅₀ Tozasertib'in uygulanması

DNA ile hücre döngüsü analizinde uygulanan hücre kültürü yöntemi ve plak tasarımı bölüm 3.5.1'de FITC Annexin V apoptoz testinde kullanılan tasarım ile aynıdır. Plak tasarımı ve deney grupları Çizelge 3.4'te gösterildi.

3.6.2. DNA hücre döngüsü analizi için PI boyama prosedürünün gerçekleştirilmesi

Hücre kültürü ve Tozasertib uygulaması sonucu elde edilen her grup 2.300 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tripsin supernatantla beraber uzaklaştırıldı, daha sonra 1 ml 1 x DPBS eklenerek tripan mavisi metodu ile Cedex cihazında hücre popülasyonu ve canlılığı not edildi.

Popülasyonlar 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde, Tampon çözeltisi ile seyreltildi. 300xg devirde, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant

dikkatlice uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi 2 kez daha her defasında 1 ml Tampon çözeltisi eklenerek tekrarlandı.

Boyama protoklüne geçmeden önce önerilen ölçek $\frac{1}{4}$ oranında azaltılarak 250 µl hücre çözeltisi ile devam edildi. Son olarak 250 µl hücre çözeltisi 1 ml tampon ile seyreltilerek 400xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve son damla peçeteye emdirildi. Pellet üzerine bir tripsin tamponu olan A çözeltisi'nden 75 µl eklendi ve köpürtmeden çalkalandı. 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda A çözeltisi boşaltılmadan üzerine bir tripsin inhibitörü ve RNaz tamponu olan 50 µl B çözeltisi eklendi ve köpürtmeden çalkalandı. Çözelti 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda karışım 35 µm por çapına sahip mesh filtrelerden geçirilerek 5 ml'lik FACS tüplerine alındı.

Son olarak Propidyum iyodit boyama çözeltisi olan soğuk (2-8 °C) C çözeltisi'nden 50 µl eklendi. Ve ışık geçirmemesi için alüminyum folyo ile kaplanmış buz küveti üzerinde 10 dk. karanlık bir ortamda inkübe edildi. Okumalar önerilen 3 saatlik süre aşılmadan BD FACSAriaIII cihazında CyleTest PLUS DNA Reagent Kit Sonuçlar Prosedürü'ne uygun olarak yapıldı.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmalardaki sitotoksisite, xCELLigence sistemindeki IC₅₀ cell index analiz programında istatistiksel olarak, İmmünflöresan boyama sonuçları konfokal mikroskop görüntülerine göre analiz edildi. Akan hücre ölçer DNA hücre döngüsü analizi için histogram analizi ve istatistiksel analiz ModFit yazılımı ile yapıldı.



4.BULGULAR VE TARTIŞMA

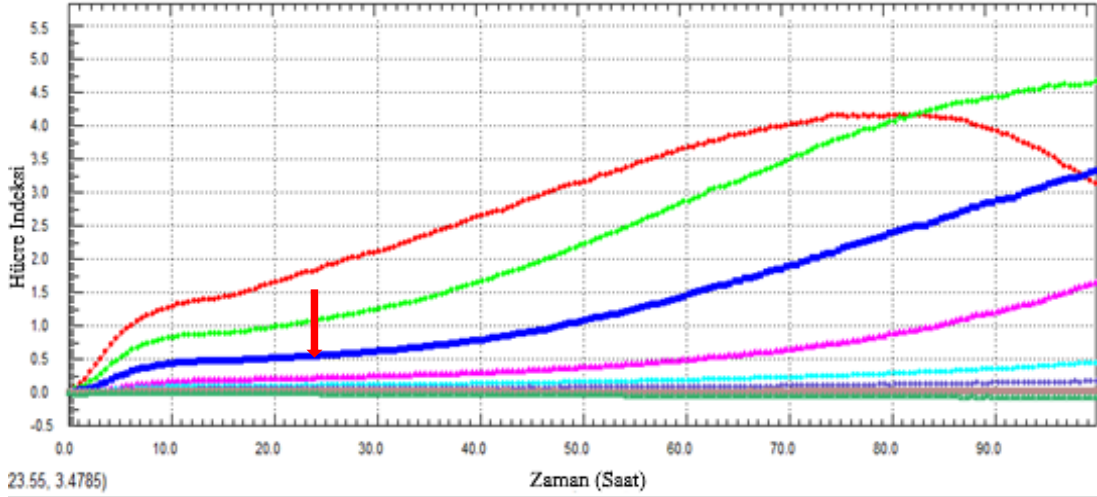
4.1. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA xCELLigence DP SİSTEMİ İLE HÜCRE TİTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

CFPAC-1 pankreas adenokarsinoma hücre titrasyonunun belirlenmesi için E-Plate 16 kullanılarak gerçekleştirilen deney yaklaşık olarak 100 saat izlendi. E-Plate 16'nın kuyucuklarına yüklenen hücre sayıları Çizelge 4.1.'deki gibidir (3.2.3 CFPAC-1 Hücre Hattına Tozasertib Uygulanması ve Hücrelerin E-plate 16' ya Yüklenmesi)

Çizelge 4.1. E-Plate 16 kuyucuklarına yüklenen hücre sayıları

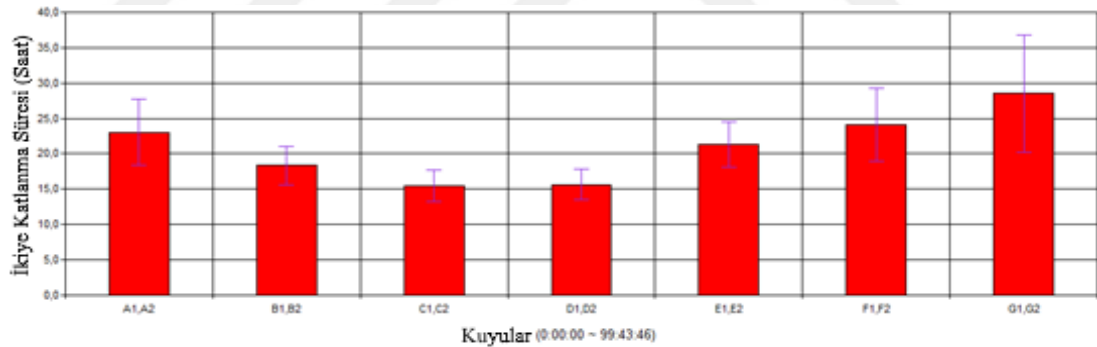
	A	B	C	D	E	F	G	H
1 (Hücre Sayısı)	200000	100000	50000	25000	12500	6250	3125	Kontrol
2 (Hücre Sayısı)	200000	100000	50000	25000	12500	6250	3125	Kontrol

Deneyin gerçek zamanlı veriler kaydedilerek tamamlanması sonucunda hücre indeksinin (hücrelerin o andaki durumunu ifade eden göreceli empedans değişimini ifade eden değişken) 24'üncü saatte durağan faz ile logaritmik faz geçişine yakın olması ve ikiye katlanma süresinin uygunluğu dikkate alındı. En uygun büyüme kinetiği, Şekil 4.1.'de, pembe renkli eğri ile D kuyucuğu için gösterilmiştir.



Şekil 4.1. CFPAC-1 hücre hattının zamana bağlı hücre indeksi

En uygun ikiye katlanma oranı ise Şekil 4.2.'de görülebileceği üzere E kuyusunda tespit edildi. Sonuç olarak titrasyon için en uygun hücre sayısı 12.500-25.000 aralığı olarak belirlendi. 24'üncü saatte Tozasertib uygulaması için 20.000 hücre ekilmesine karar verildi.



Şekil 4.2. CFPAC-1 hücre hattında zamana bağlı ikiye katlanma

4.2. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA TOZASERTİB'E BAĞLI SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ

Hücre titrasyon deneylerinin gerçekleştirilmesinin ardından E-Plate 16'nın A1-A2'den, G1-G2 kuyucuklarına kadar sırayla 20.000 hücre yüklendi. F1-F2 kuyucukları normal büyümenin takip edilebilmesi için hücre kontrolü olarak kullanıldı. Konsanstrasyon uygulamalarının gerçekleştirileceği 24 saatlik inkübasyon

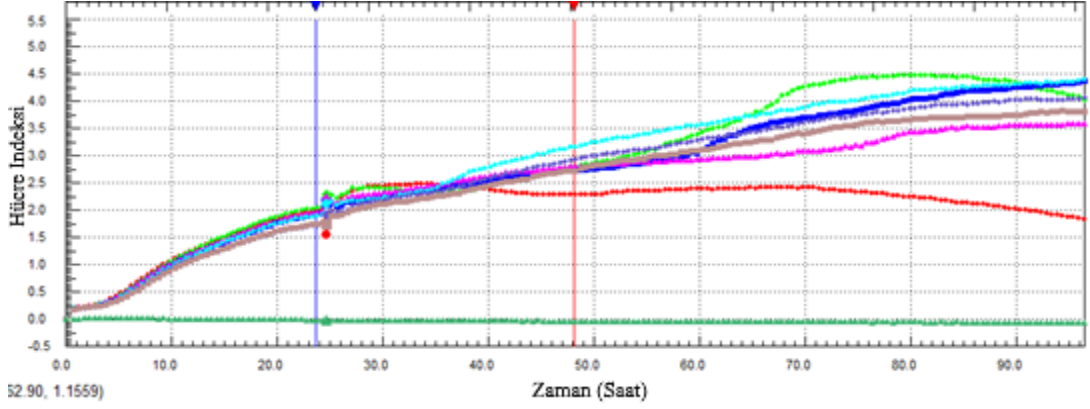
ve proliferasyon takibi için E-Plate16 xCELLigence DP cihazına yerleştirildi ve RTCA DP yazılımı ile ölçüme başlandı.

Yirmidördüncü saatte plak, inkübasyondan alındı ve konsantrasyon uygulaması için E-Plate 16 laminar flowa aktarıldı. A1-E2 kuyucukları dahil seri sulandırmalar uygulanarak Tozasertib konsantrasyon gradienti oluşturuldu. 10^{-8} M'dan 10^{-4} M'a kadar onar kat gradientte oluşturulan Tozasertib, Bölüm 3.3.3.'de tarif edilen teknikle kuyucuklardaki hücrelerle muamele edildi (3.3.3. CFPAC-1 Hücrelerinin E-plate 16' ya Yüklenmesi ve Tozasertib Uygulanması).

G1-G2 kuyucuklarında Tozasertib çözücüsü toksik DMSO ajanı, uygulamada kullanıldı, en yüksek konsantrasyonunda hücre büyümesine girişimi olup olmadığını tespit etmek için 20.000 hücreye milyonda 500 hacimde uygulandı. H1-H2 kuyucukları deneydeki en yüksek miktarda Tozasertib konsantrasyonu (10^{-4} M) ile negatif kontrol olarak muamele edildi. Deney yaklaşık 100 saat boyunca takip edildi.

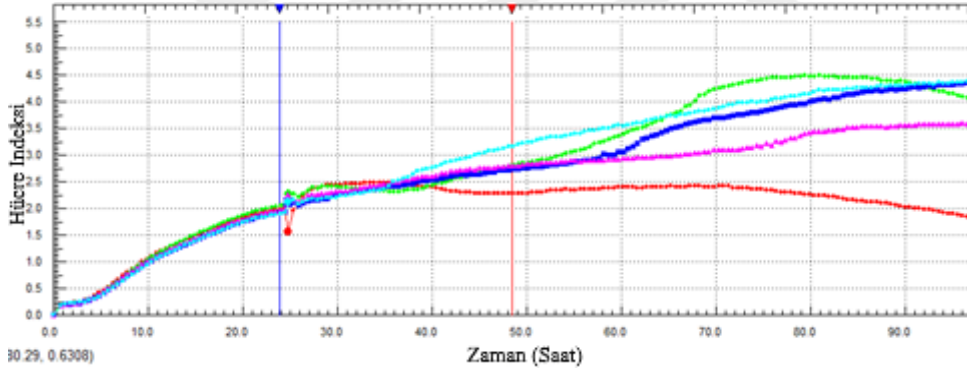
Çizelge 4.2. E-Plate 16 plağında Tozasertib uygulaması ve renk kodları

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	HÜCRE 10^{-4} M Tozasertib 500 ppm DMSO	HÜCRE 10^{-5} M Tozasertib 50 ppm DMSO	HÜCRE 10^{-6} M Tozasertib 5 ppm DMSO	HÜCRE 10^{-7} M Tozasertib 0.5 ppm DMSO	HÜCRE 10^{-8} M Tozasertib 5000 ppt DMSO	HÜCRE	HÜCRE 500 ppm DMSO	BESİYERİ
2	HÜCRE 10^{-4} M Tozasertib 500 ppm DMSO	HÜCRE 10^{-5} M Tozasertib 50 ppm DMSO	HÜCRE 10^{-6} M Tozasertib 5 ppm DMSO	HÜCRE 10^{-7} M Tozasertib 0.5 ppm DMSO	HÜCRE 10^{-8} M Tozasertib 5000 ppt DMSO	HÜCRE	HÜCRE 500 ppm DMSO	BESİYERİ



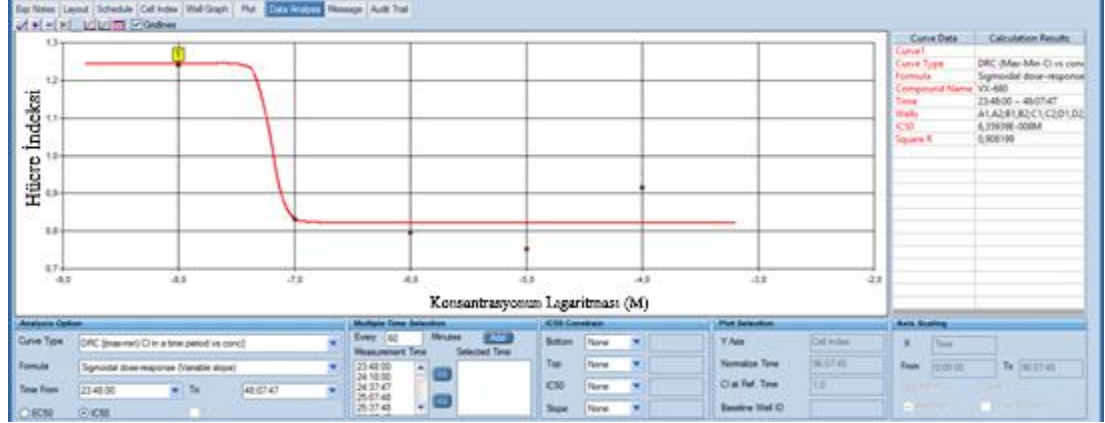
Şekil 4.3. 96 Saat sonunda Tozasertib uygulama ve kontrol gruplarının hücre indeksi

Uygulama sonrasında H1-H2 kuyucuklarındaki kör kontrolde hiç sinyal dalgalanması olmadığı, F1-F2 kuyucuklarındaki hücre gelişimi kontrol örneğinde üremenin düzenli olduğu ve G1-G2 grubundaki hücrelerin de canlılığını koruduğu ve DMSO konsantrasyonunun toksik etkide bulunmayacak kadar az olduğu görüldü.



Şekil 4.4. Tozasertib uygulanan kuyucukların hücre indeksi

Tozasertib uygulamasından sonraki 24 saat içerisinde 10^{-4} M konsantrasyon hariç bütün hücrelerin bölünmeye devam ettiği görüldü. Diğer konsantrasyonlarda sırasıyla 10^{-6} M ve 10^{-5} M konsantrasyonda yaklaşık olarak 24 saat sonra, 10^{-7} M konsantrasyonda 16 saat sonra, 10^{-9} M ve 10^{-8} M konsantrasyonda 12 saat sonra üreme devam etti.



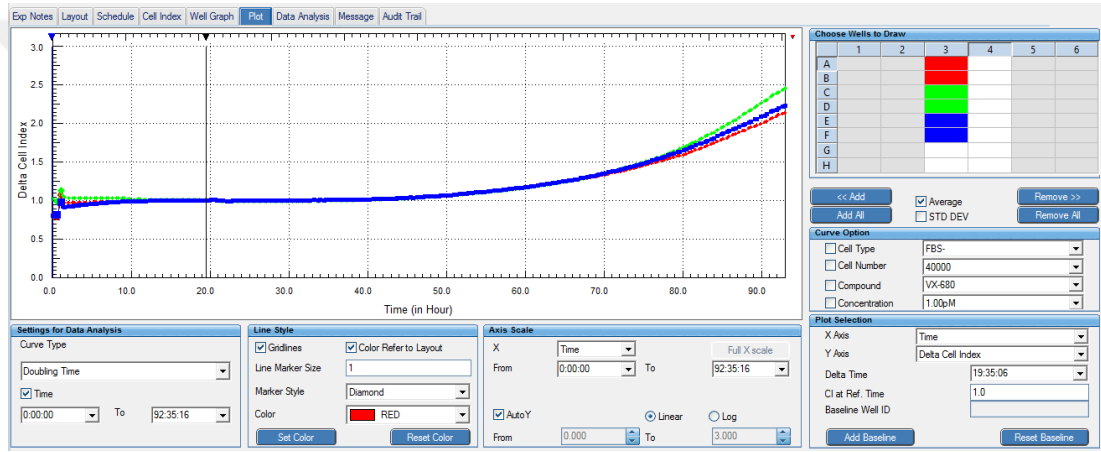
Şekil 4.5. Sigmoidal konsantrasyon hesaplamasına göre Tozasertib konsantrasyonunun logaritmasına karşı hücre indeksinin DRC eğrisi

DRC eğrisinin hesaplanması için 24'üncü saatteki ilaç uygulamasından hemen öncesi (23:48:00) ile 48. saat arasındaki ilaç konsantrasyonunun molar ifadesi ile hücre indeksi ilişkisi dikkate alındığında IC_{50} yaklaşık olarak $6,4 \cdot 10^{-8} M$ konsantrasyonda tespit edildi. R kare regresyon testi, verilerin %90'ının DRC eğrisinin ifade ettiği konsantrasyona cevap modeline uygun olduğu gösterildi.

CFPAC-1 hücrelerinde xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizatör kullanarak Tozasertib'in konsantrasyon/zaman bağımlı sitotoksik indeks bulgumuz olan $6,4 \cdot 10^{-8} M$ derişim, Xie ve ark. tarafından lüminesan tespiti temeline dayanan CellTiter Glo kiti ile yaklaşık $10^{-7} M$ olarak tespit edilmiştir [47].

4.3. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA xCELLigence DP SİSTEMİ ile IC₅₀ KONSANTRASYON/ZAMAN AYARLI TOZASERTİB'İN MİGRASYONA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

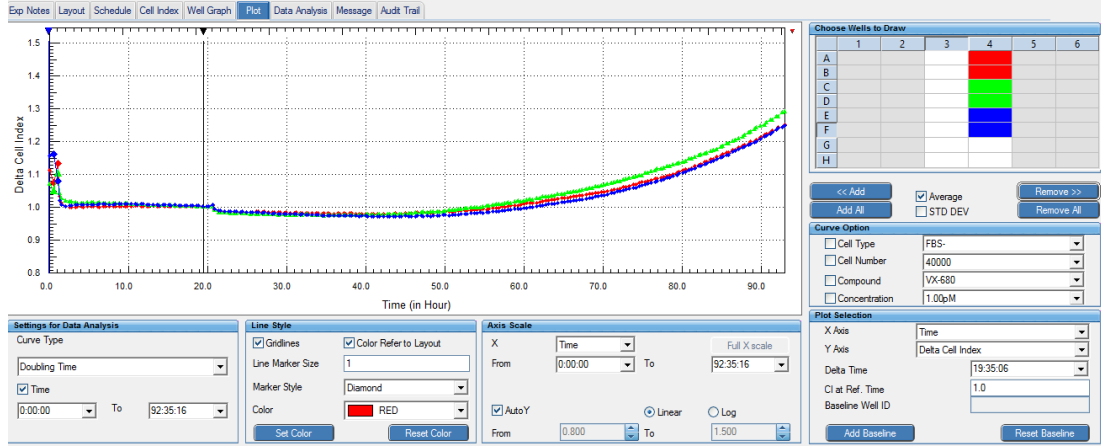
Tozasertib'in migrasyon olayına herhangi bir etkide bulunup bulunmayacağı iki farklı hücre başlangıç popülasyonu ve iki farklı konsantrasyonda Tozasertib kullanılarak 90 saat boyunca gözlemlendi. Bu sürenin sonunda hücre popülasyon grupları kendi içlerinde konsantrasyona bağlı olarak negatif kontrolleri ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.6. 40.000 hücre popülasyonunda Tozasertib'in migrasyona etkisi

xCELLigence sistemini kontrol eden RTCA yazılımı üzerinde hücre popülasyonu grafiği 40.000 hücre için incelendi (Şekil 4.6.). Tozasertib ekmeden önceki bir zamana ait ölçüm noktasında, siyah dikey çizgi ile gösterilen bölgede hücre popülasyonları için yazılımdan delta normalizasyonu yapılarak büyüme eğrilerinin üst üste gelmesi sağlandı.

Mavi eğri ve kuyular ile gösterilen Tozasertib negatif grubun, yeşil eğri ve kuyular ile gösterilen IC₅₀Tozasertib, yani 6,4x10⁻⁸ M Tozasertib içeren gruptan farkı olmadığı gözlemlendi. Kırmızı eğri ve kuyular ile gösterilen 10⁻⁷ M Tozasertib içeren grupta, negatif kontrol grubu ile ve IC₅₀ grubu ile karşılaştırıldığında da herhangi bir farka sahip olmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.7. 20.000 hücre popülasyonunda Tozasertib'in migrasyona etkisi

xCELLigence sistemini kontrol eden RTCA yazılımı üzerinde hücre popülasyonu grafiği 20.000 hücre için incelendi (Şekil 4.7.). Tozasertib ekmeden önceki bir zamana ait ölçüm noktasında, siyah dikey çizgi ile gösterilen bölgede hücre popülasyonları için yazılımdan delta normalizasyonu yapılarak büyüme eğrilerinin üst üste gelmesi sağlandı.

Hücre ekimi yapılırken 2. Sütunda bulunan ve 20.000 hücre popülasyonu içeren kuyulardaki sonuçların 40.000 hücre popülasyonuna ait gruptan farklı olmadığı gözlemlendi. Mavi eğri ve kuyular ile gösterilen Tozasertib negatif grubun, yeşil eğri ve kuyular ile gösterilen IC₅₀Tozasertib içeren gruptan farklı olmadığı gözlemlendi. Kırmızı eğri ve kuyular ile gösterilen 10⁻⁷ M Tozasertib içeren grupta, negatif kontrol grubu ile ve IC₅₀ grubu ile karşılaştırıldığında da herhangi bir farka sahip olmadığı gözlemlendi.

Bu bulgu Guan ve ark. tarafından HeLa benzeri bir hücre tiplendirilmesi ile bilinen serviks karsinoma hücre hattı Hep2' de yaptıkları çalışma ile örtüşmektedir [48]. Fakat non-tümöral kistik MCF-10A hücre hattını kullanarak hücre kültür plağının sabit çaplı bir pipet ucu ile çizilmesi temeline dayanan bir deney olan, yara iyileştirme metodu deneyi yapan Wang ve ark. Tozasertib'in 4 farklı konsantrasyonunu kullanarak, konsantrasyon/zaman bağımlı olarak hücre göçünü engellediğini göstermişlerdir [49]. Doku tipine, hücre tipine veya tümöral kökene

göre Tozasertib'in migrasyona konsantrasyon/zaman bağımlı etkisi değişebilmektedir.

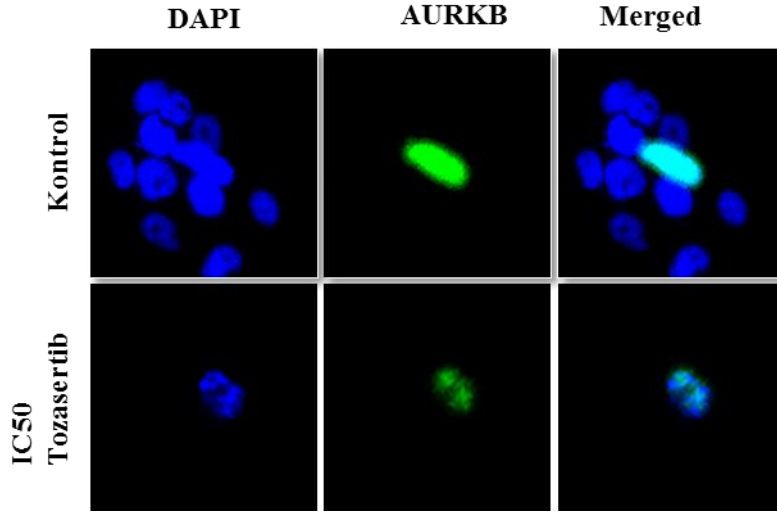


4.4. İMMÜNFLÖRESAN ANTİKOR UYGULAMALARIN KONFOKAL MİKROSKOPTA GÖZLENMESİ

Konfokal mikroskopi uygulaması için hazırlanan CFPAC-1 hücreleri IC_{50} Tozasertib ile muamele edildikten sonra 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda nükleer ve stoplazmik permeabilizasyona uygun muamele yapıldıktan sonra Borealin ve Survivin proteinleri (Şekil 4.9.) CFPAC-1 hücrelerinde birlikte muamele edildi. AURKB proteini (Şekil 4.8.), Borealin ve Survivinden ayrı bir grupta uygulandı. Gruplar, flöresan işaretli AURKB, Borealin, Survivin antikorları uygulaması sonrasında bir gecelik inkübasyona alındı.

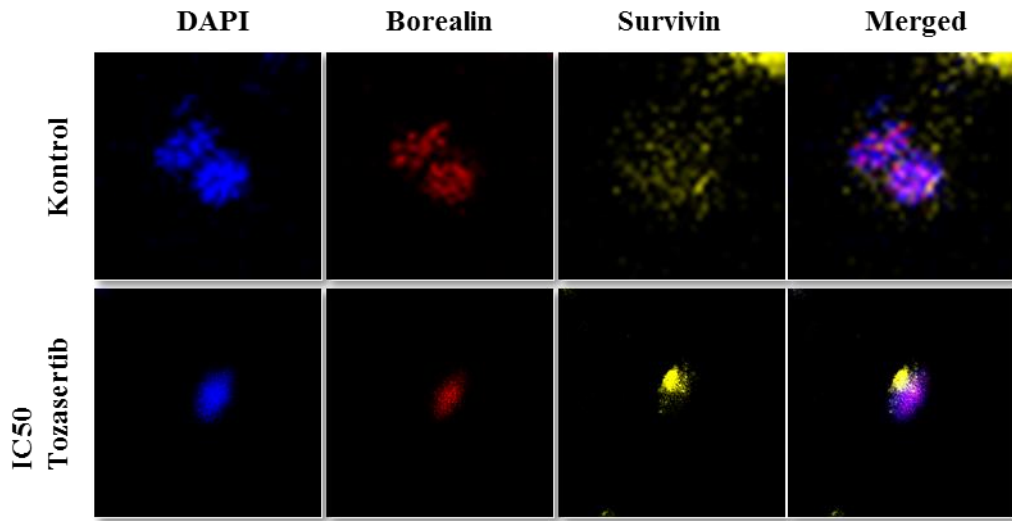
İnkübasyon sonrasında protokolde belirtilen yöntem izlenerek uygun yıkamalar yapıldı ve DAPI uygulaması gerçekleştirildi. Hazırlanan hücreler Carl Zeiss LSM 700 konfokal mikroskopta cihaza uygun ZEN yazılımı ile immünflöresan görüntülemeleri gerçekleştirildi.

AURKB protein anlatımı için, IC_{50} Tozasertib uygulanan CFPAC-1 hücrelerinin immünflöresan olarak işaretlenmesi sonucu elde edilen görüntüler, Tozasertib uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre anlatım düzeyinde bir azalma olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.8.). Ancak bu sonuç beklenen düzeyde bir azalmayı ifade etmemektedir. IC_{50} Tozasertib'den daha yüksek konsantrasyonlarının ileri saat uygulamaları gelecekte planlanacak çalışmalar için önerilebilir.

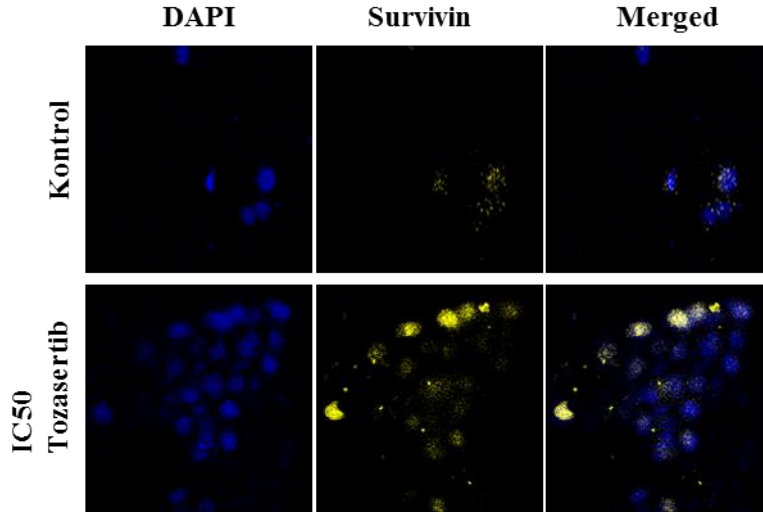


Şekil 4.8. CFPAC-1 hücrelerinde IC₅₀ tozasertib uygulamasının AURKB anlatımının immünflöresan görüntüsü

Borealin ve Survivin proteinlerinin anlatımı için, IC₅₀ Tozasertib uygulanan CFPAC-1 hücrelerinin immünflöresan olarak işaretlenmesi sonucu elde edilen görüntüler, Tozasertib uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre anlatım düzeyinde bir azalma olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.9.). Ancak bu sonuçlarda beklenen düzeyde bir azalmayı ifade etmediğinden, IC₅₀ Tozasertib'ten daha yüksek konsantrasyonlarının ileri saat uygulamalarının test edilmesi önerilebilir.



Şekil 4.9. CFPAC-1 hücrelerinde IC₅₀ tozasertib uygulamasının Borealin ve Survivin anlatımının immünflöresan görüntüsü



Şekil 4.10. Survivin anlatımının IC₅₀ Tozasertib'e yanıt olarak artışı

Survivin gen anlatımının IC₅₀ Tozasertibe yanıt olarak arttığı konfokal immünflöresan yöntemle gösterildi (Şekil 4.10.). Pankreatik duktal adenokasinomlarda oldukça yüksek düzeylerde (%79) anlatımı yapılan Survivin proteini [50], bu çalışmada kullanılan duktal adenokarsinoma hücre hattı olan CFPAC-1'de de oldukça yüksek anlatım gösterdiği bulguları.

Guan ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada apoptozun, Survivini hedef alan bir siRNA kullanılarak uyarılabildiği gösterilmiştir. Survivin gen anlatımını düşüren bu uygulama apoptotik aktiviteyi %7,03 oranında arttırmıştır [51].

Uygulanan IC₅₀ Tozasertib dozunun CFPAC-1 hücreleri için yetersiz kaldığı ancak bu dozun üzerindeki uygulamalar ile farklı bir ajanın birlikte uygulanması, pankreatik karsinoma hücrelerinin apoptoza yönelmesinde daha etkili olabilir.

4.5. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA IC₅₀KONSANTRASYON/ZAMAN AYARLI TOZASERTİB'İN AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE APOPTOTİK HÜCRE AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Apoptozun belirlenmesi için yapılan çalışmada, BD FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I'de belirtilen yönergelere göre analiz yapıldı. Bu analizlerde fosfatidil serin (PS), FITC işaretli Annexin V proteini aracılığıyla FITC emisyon filtresinde, DNA ise PI boyası aracılığıyla PE-Cy7 emisyon filtresinde tespit edildi.

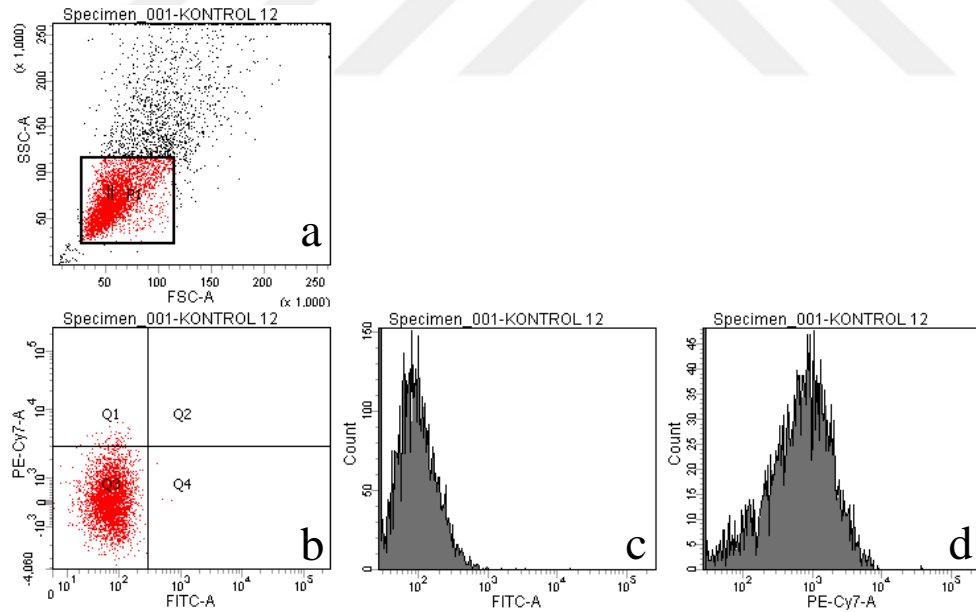
Önce, hiçbir florofor boya içermeyen hücrelerden oluşan kontrol örnekleri BD FACSAriaIII akan hücre ölçer cihazına yüklendi. FSC-A nokta görüntüsüne SSC-A nokta görüntüsü üzerinde iyi bir nokta dağılım görüntüsü elde edilinceye kadar voltaj ayarı yapıldı. Uygun dağılım tespit edildikten sonra, akan hücre ölçerde florofor boya içermeyen hücre popülasyonlarından 100.000 hücre sayımı boyunca veri kaydedildi. Hücre popülasyonunu, istenmeyen hücre kalıntılarından ayrılmış bir kümede toplamak için yazılımla oluşturulan ve P1 Kapısı adı verilen bir popülasyon filtresi kullanıldı.

Bu filtre, kontrol örneğinde FITC-A/PE-Cy7-A görüntüsünde emisyon tespiti açısından negatif olan, boyalı örnek gruplarında da canlı hücreleri ifade eden ve Q3 popülasyonu adı verilen topluluğun tespitini sağladı. Q3 popülasyonunun nokta dağılımlı grafik üzerindeki sınırlarını belirleyen yazılımsal bir araç olan ve grafiği dört alana bölen bir kadran oluşturuldu. Bu kadran, aynı grubun boyalı örneklerinde Q1, Q2, Q4 olarak ifade edilen diğer popülasyonların sınırlarını belirlemek için kullanıldı. Çizelge 4.3.'te Q harfi ile temsil eden popülasyonların, florofor boya işaretli hücre gruplarında hangi karakterdeki hücreleri ifade ettiği gösterildi.

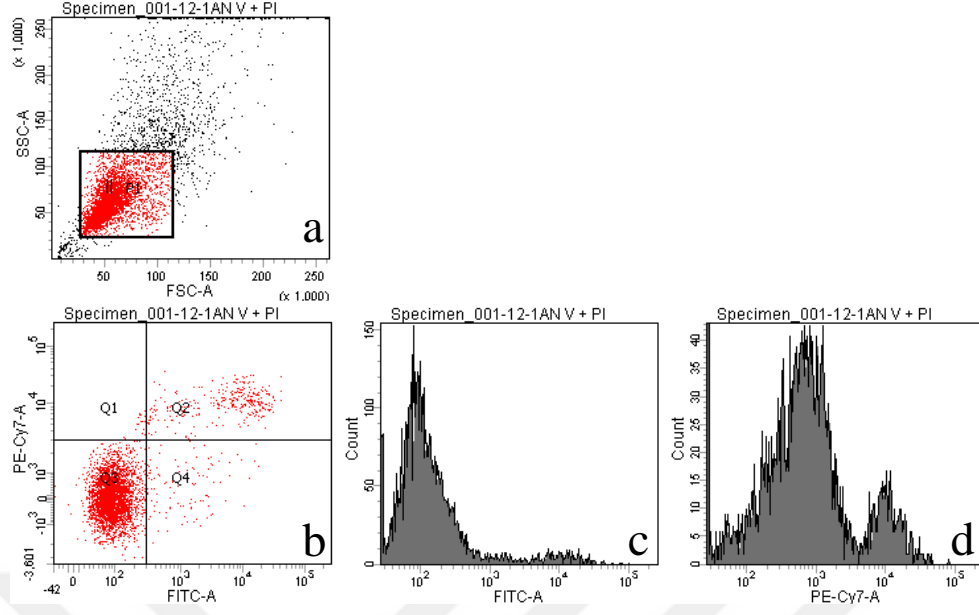
Çizelge 4.3. Florofor işaretlenme gruplarına göre Q1,Q2,Q3 ve Q4 popülasyonları

	FITC Annexin V-PS	PI-DNA	Hücre Popülasyonunun Karakteri
Q1	-	+	Ölü Hücre
Q2	+	+	Geç Apoptotik Hücre
Q3	-	-	Canlı Hücre
Q4	+	-	Erken Apoptotik Hücre

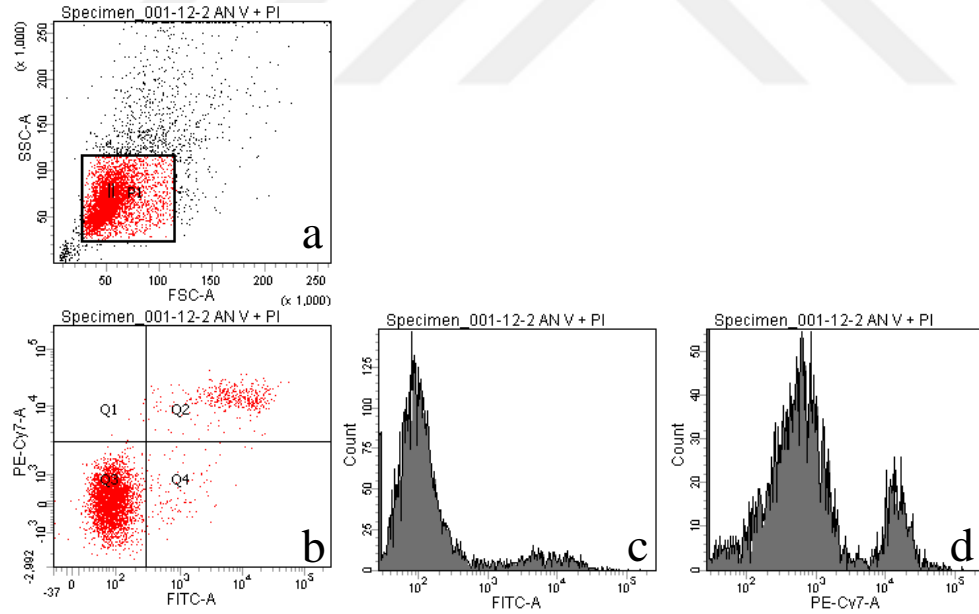
Her gruptaki boyasız kontrol örneği ile belirlenen P1 kapısı, aynı gruptaki FITC+PI boyalı diğer gruplara da değiştirilmeden uygulandı. Böylece istenmeyen hücre kalıntılarında arındırılmış popülasyonu tespit edildi. Sonraki adımda P1 kapısı ile tespit edilen hücre popülasyonu, FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde gösterildi. Bu histogramda Q popülasyonlarını belirleyen ve histogramı dörde bölen kadranın konumu belirlendi. Kadran aynı gruptaki boyalı örneklere de konumu değişmeyecek şekilde uygulandı. FITC-A ve PE-Cy7-A emisyon histogramları kontrol edilerek florofor işaretli veya işaretsiz gruplardaki hücrelerin emisyon farkı da ayrıca kontrol edildi.



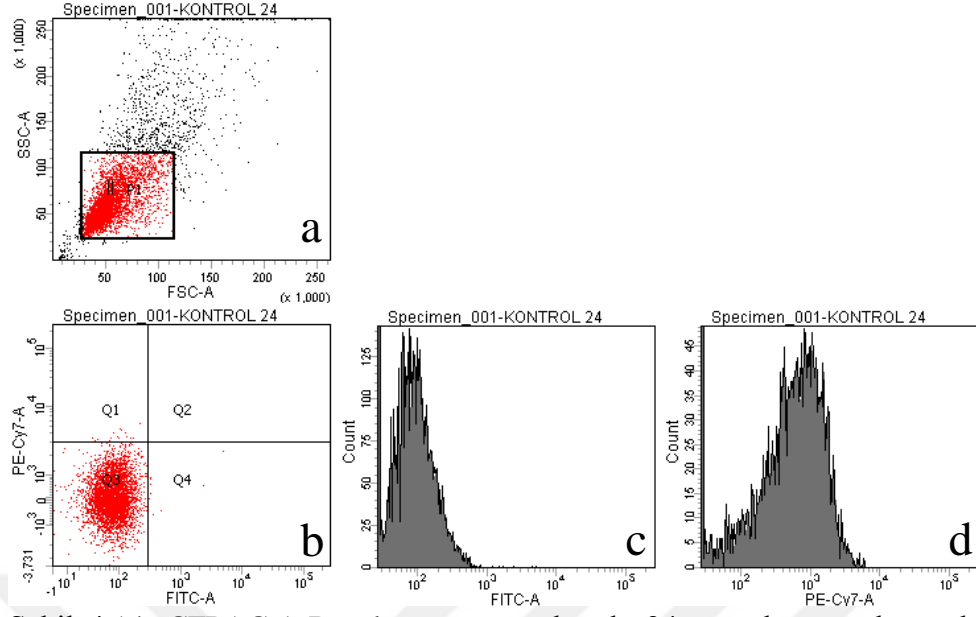
Şekil 4.11. CFPAC-1 Bazal apoptoz grubunda 12. saat boyasız kontrol örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği. (a.) 12. saat bazal apoptoz grubunun P1 kapısını, (b.) Bazal apoptoz grubunda boyasız örnekte FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde kadrın konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



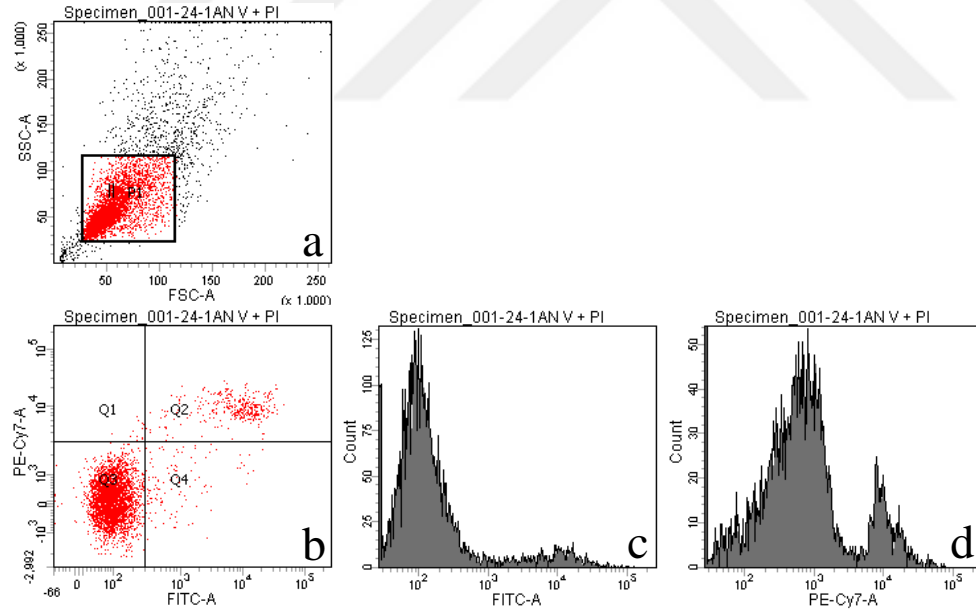
Şekil 4.12. CFPAC-1 Bazal apoptoz 12. saat grubunda FITC+PI boyalı 1. grup örneğın FSC-A/SSC-A nokta grafiği. (a.) P1 kapısının FITC+PI boyalı 1. gruptaki konumunu, (b.) FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadran konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



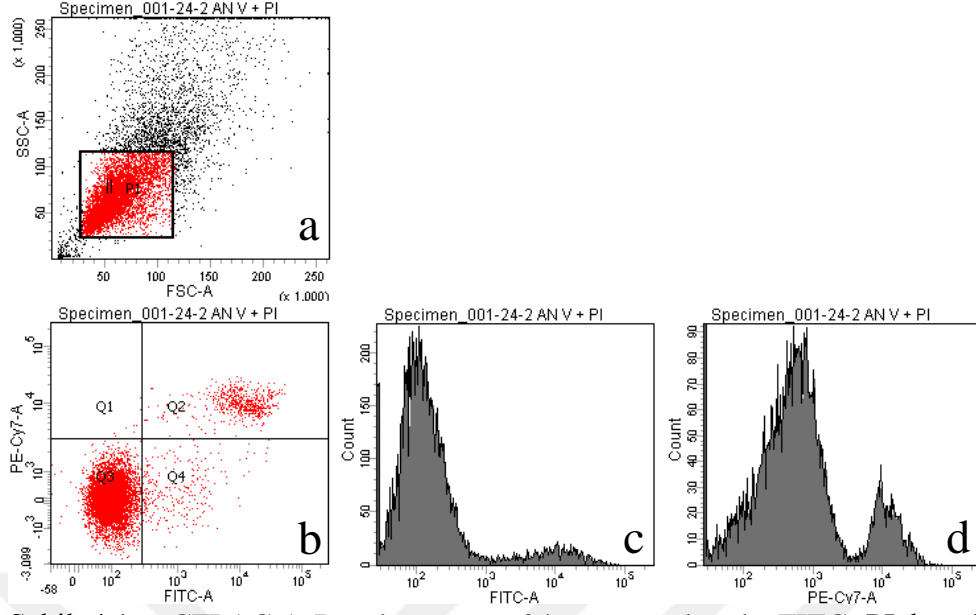
Şekil 4.13. CFPAC-1 Bazal apoptoz 12. saat grubunda FITC+PI boyalı 2. grup örneğın FSC-A/SSC-A nokta grafiği. (a.) P1 kapısının FITC+PI boyalı 2. gruptaki konumu, (b.) FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadran konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



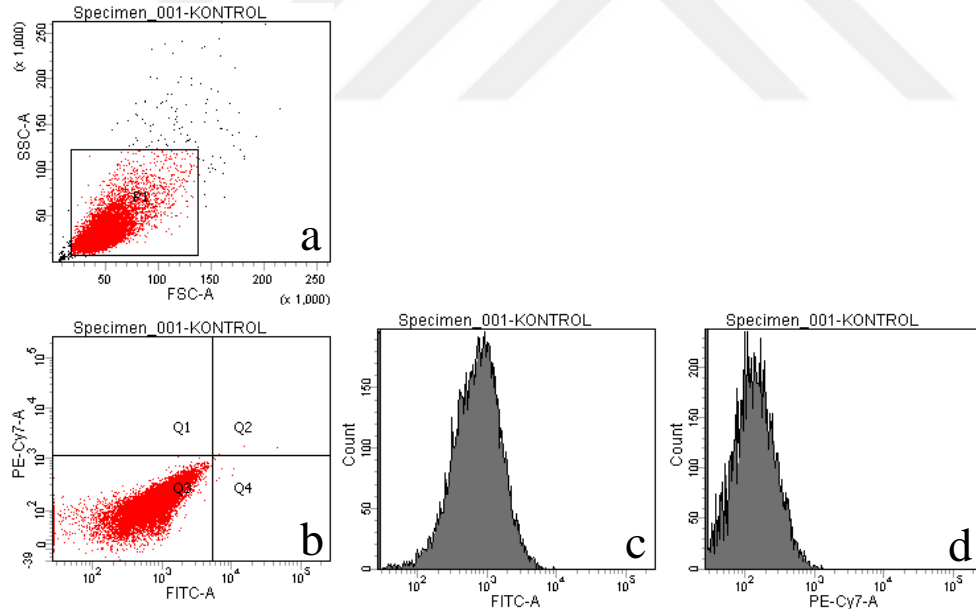
Şekil 4.14. CFPAC-1 Bazal apoptoz grubunda 24. saat boyasız kontrol örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği. (a.) 24. saat bazal apoptoz grubunun P1 kapısını, (b.) Bazal apoptoz 24. saat grubunda boyasız örnekte FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadran konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



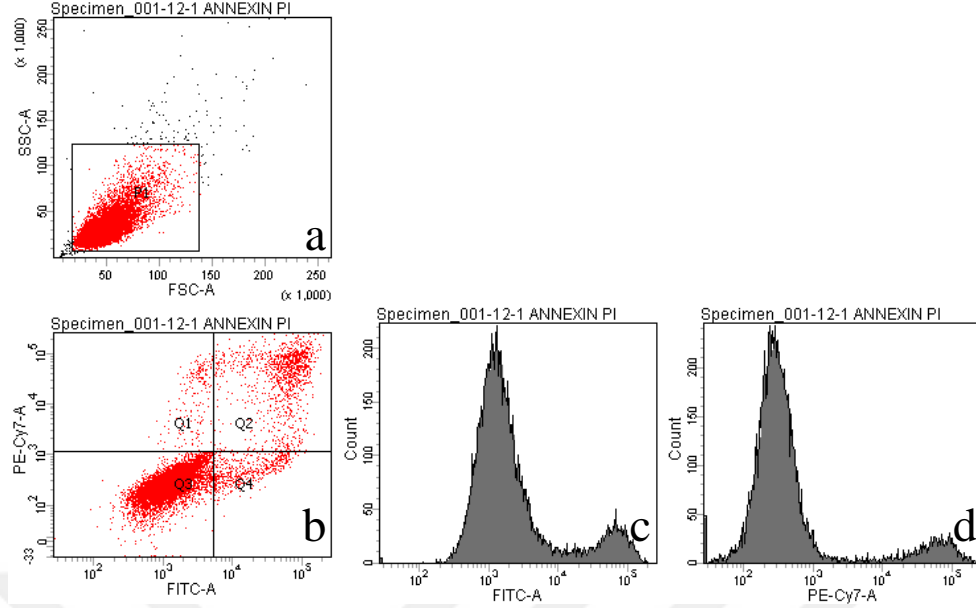
Şekil 4.15. CFPAC-1 Bazal apoptoz 24. saat grubunda FITC+PI boyalı 1. grup örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği . (a.) P1 kapısının FITC+PI boyalı 1. gruptaki konumunu, (b.) FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadran konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



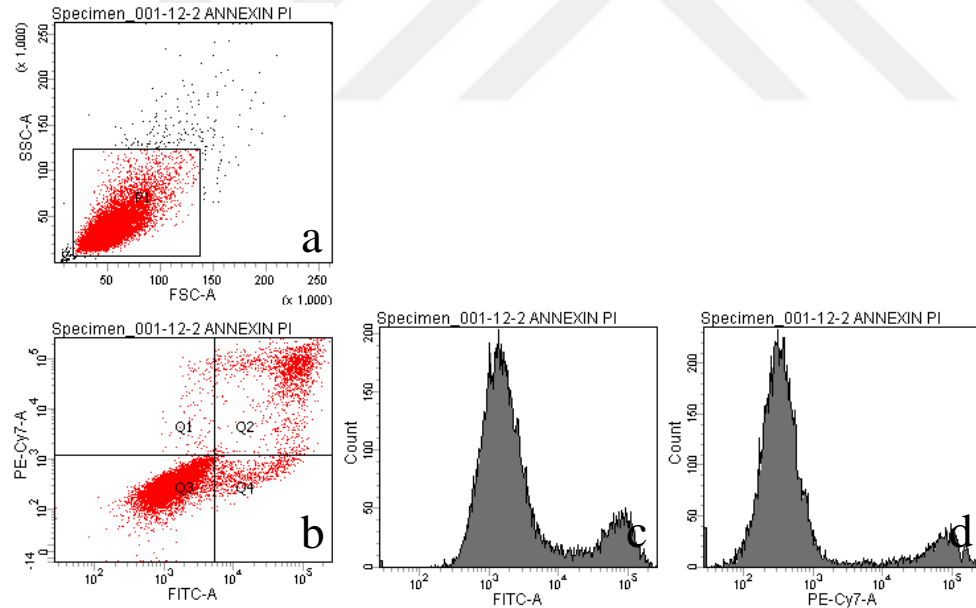
Şekil 4.16. CFPAC-1 Bazal apoptoz 24. saat grubunda FITC+PI boyalı 2. grup örneğın FSC-A/SSC-A nokta grafiği . (a.) P1 kapısının FITC+PI boyalı 2. gruptaki konumunu, (b.) FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadran konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



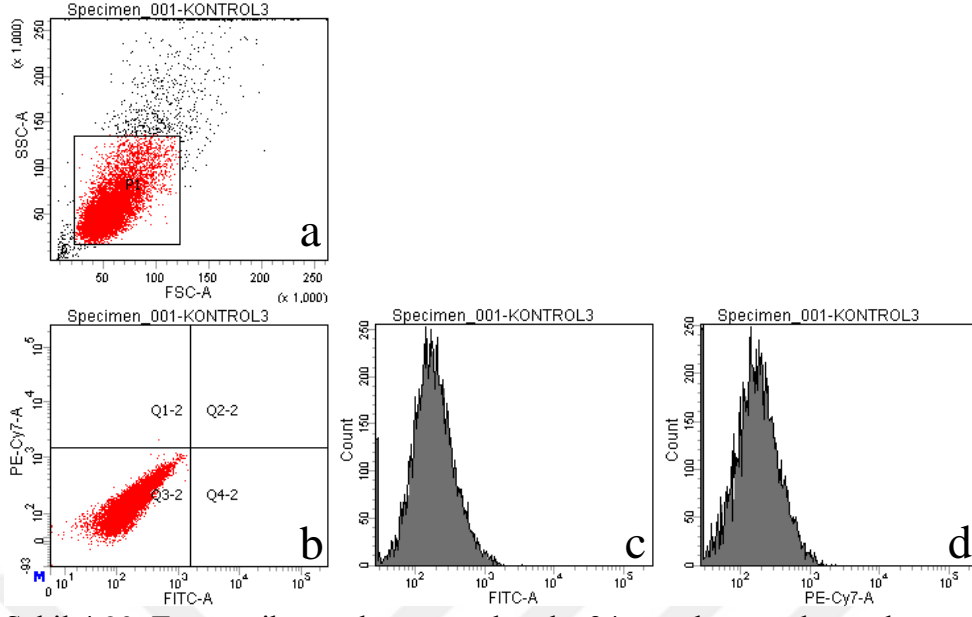
Şekil 4.17. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması grubunda 12. saat boyasız kontrol örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği . (a.) 12. saat Tozasertib uygulaması grubunun P1 kapısını, (b.) Tozasertib uygulaması12. saat grubunda boyasız örnekte FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q kadranı konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



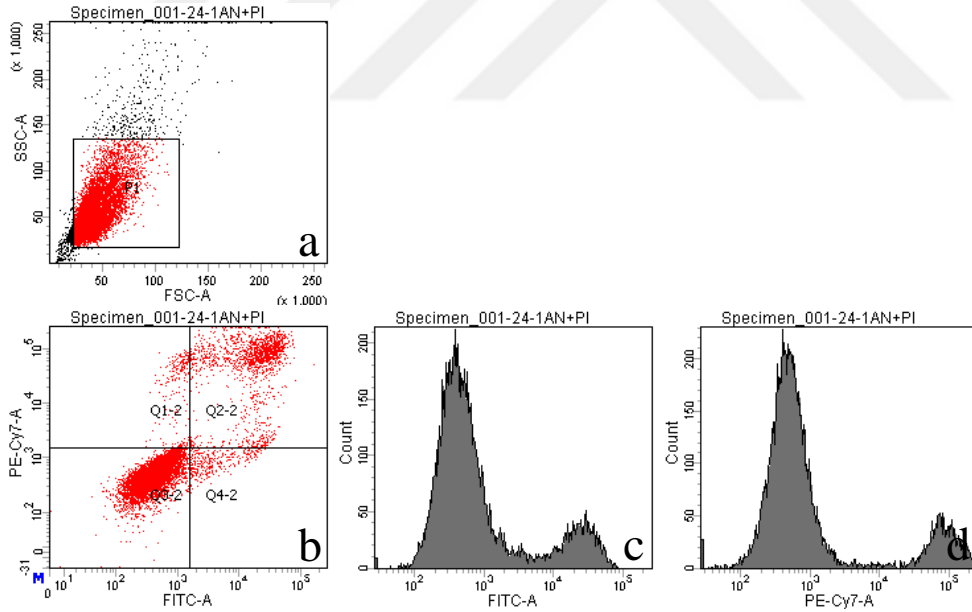
Şekil 4.18. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması 12. saat grubunda FITC+PI boyalı 1. grup örneğin FSC-A/SSC-A nokta grafiği . (a.) P1 kapısının FITC+PI boyalı 1. gruptaki konumunu, (b.) FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadranı konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



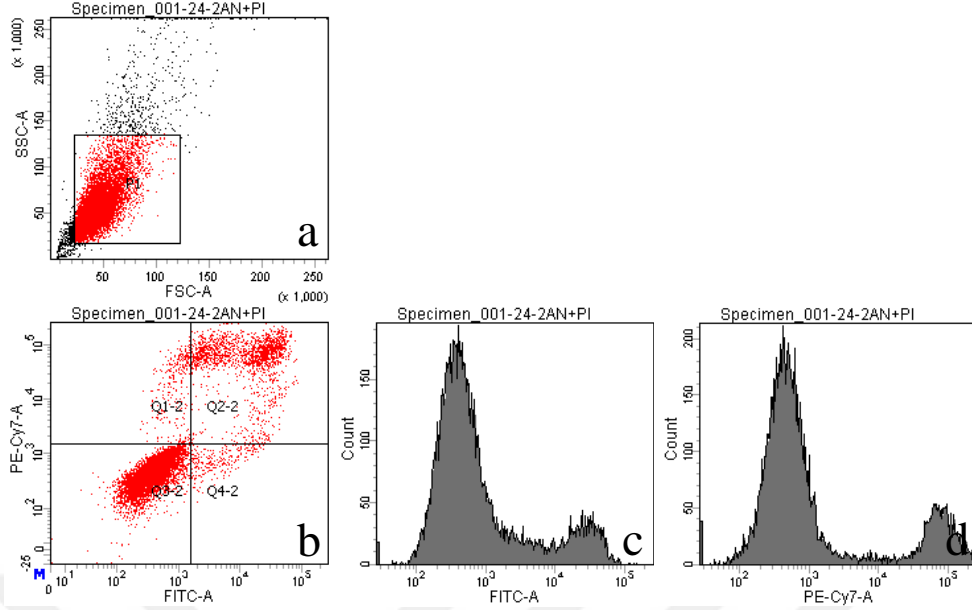
Şekil 4.19. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması 12. saat grubunda FITC+PI boyalı 2. grup örneğin FSC-A/SSC-A nokta grafiği. (a.) P1 kapısının FITC+PI boyalı 2. gruptaki konumunu, (b.) FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadranı konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



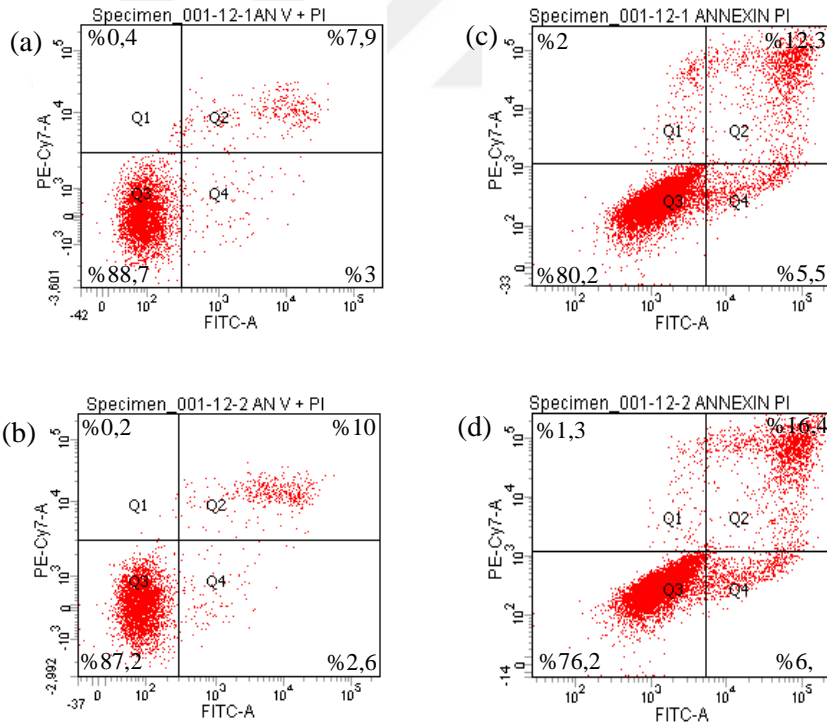
Şekil 4.20. Tozasertib uygulaması grubunda 24. saat boyasız kontrol örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği. (a.) 24. saat Tozasertib uygulaması grubunun P1 kapısını, (b.) Tozasertib uygulaması 12. saat grubunda boyasız örnekte FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadrant konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



Şekil 4.21. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması 24. saat grubunda FITC+PI boyalı 1. grup örneğinin FSC-A/SSC-A nokta grafiği. (a.) P1 kapısının FITC+PI boyalı 1. gruptaki konumunu, (b.) FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadrant konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



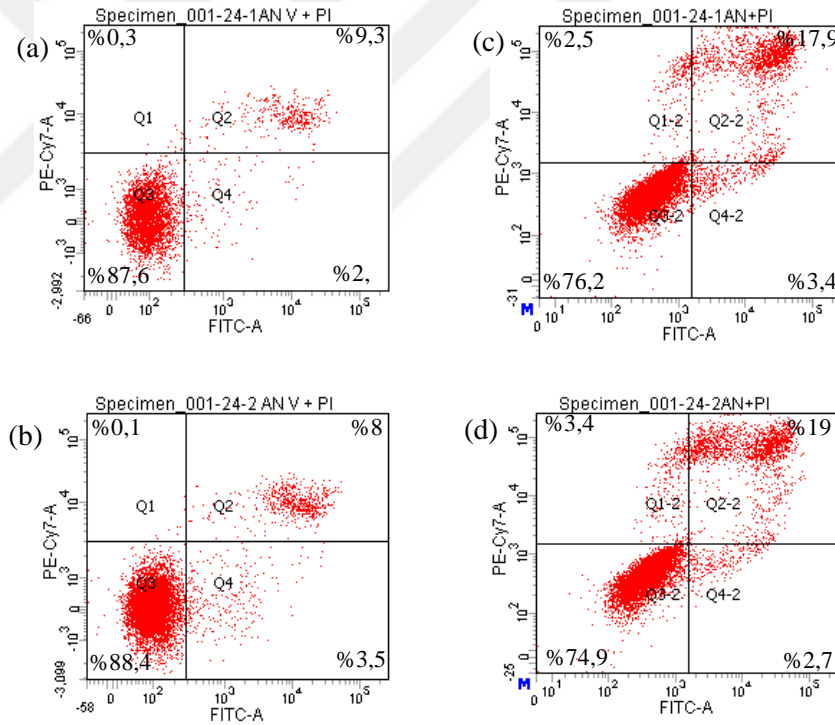
Şekil 4.22. CFPAC-1 Tozasertib uygulaması 24. saat grubunda FITC+PI boyalı 2. grup örneğin FSC-A/SSC-A nokta grafiği . (a.) P1 kapısının FITC+PI boyalı 2. gruptaki konumunu, (b.) FITC-A/PE-Cy7-A grafiğinde Q popülasyonları kadran konumunu, (c,d.) Sırasıyla FITC-A ve PE-Cy7-A filtrelerinde emisyon histogram grafiğini göstermektedir.



Şekil 4.23. Tozasertib'e bağlı apoptotik aktivitenin bazal apoptotik aktivite ile 12. saatte karşılaştırılması. (a) Bazal apoptoz 1. grubu, (b) Bazal apoptoz 2. grubu, (c) IC₅₀ Tozasertib'in 1. gruptaki apoptotik aktivitesini (d) IC₅₀ Tozasertib'in 2. grupta apoptotik aktivitesini göstermektedir.

Hücre ikilenme süresine denk gelen 30 saatlik inkübasyondan 12 saat sonra yapılan ölçümlere göre CFPAC-1 pankreas duktal adenokarsinoma hücre hattında bazal erken apoptotik aktivite hücrelerin ortalama %2,8'inde gözlemlendi. Hücrelerin %3'ünde nekrotik ölüm gerçekleştiği ve %8,95'inde geç apoptotik aktivitenin varlığı gözlemlendi. Hücre popülasyonunun ortalama %87,95 oranında canlı olduğu gözlemlendi.

Hücre ikilenme süresine denk gelen 30 saatlik inkübasyondan sonra IC₅₀ Tozasertib ile muamele edilen hücrelerin 12 saat sonra yapılan ölçümlerine göre apoptotik aktivite CFPAC-1 hücre hattında hücrelerin ortalama %5,85'inde gözlemlendi. Hücrelerin %1,65'inde nekrotik ölüm gerçekleştiği görüldü. %14,35'inde geç apoptotik aktivitenin varlığı gözlemlendi. Hücre popülasyonunun ortalama %78,2'sinin canlı olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.24. Tozasertib'e bağlı apoptotik aktivitenin bazal apoptotik aktivite ile 24. saatte karşılaştırılması. (a) Bazal apoptoz 1. grubu, (b) Bazal apoptoz 2. grubu, (c) IC₅₀ Tozasertib'in 1. grupta apoptotik aktivitesini, (d) IC₅₀ Tozasertib'in 2. grupta apoptotik aktivitesini göstermektedir.

Hücrelerin 30 saatlik inkübasyonundan 24 saat sonra yapılan ölçümlere göre CFPAC-1 hücre hattında bazal erken apoptotik aktivite hücrelerin ortalama %3,15'inde gözlemlendi. Hücrelerin %0,2'sinde nekrotik ölüm gerçekleştiği olduğu ve

%8,65'inde geç apoptotik aktivitenin varlığı gözlemlendi. Hücre popülasyonunun ortalama %88 oranında canlı olduğu gözlemlendi.

İnkübatörde bekletilen hücrelerin, 30 saatlik süre sonunda IC₅₀ Tozasertib ile muamele edildikten 24 saat sonra yapılan ölçümlerine göre, apoptotik aktivite hücrelerin ortalama %3,05'inde gözlemlendi. Hücrelerin %2,95'inde nekrotik ölüm gerçekleşmiş olduğu ve %18,45'inde geç apoptotik aktivitenin varlığı gözlemlendi. Hücre popülasyonunun ortalama %75,55'inin canlı olduğu gözlemlendi.

CFPAC-1 hücre hattında IC₅₀ konsantrasyon/zaman ayarlı Tozasertib'in akan hücre ölçeği ile apoptotik hücre aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan FITC Annexin V testi sonuçları Çizelge 4.4.'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. Q popülasyonları özet çizelgesi

	BAZAL 12.sa.-1	BAZAL 12.sa.-2	Ort.BAZAL 12.sa.	BAZAL 24.sa.-1	BAZAL 24.sa.-2	Ort.BAZAL 24.sa.	IC ₅₀ 12.sa.-1	IC ₅₀ 12.sa.-2	Ort. IC ₅₀ 12.sa.	IC ₅₀ 24.sa.-1	IC ₅₀ 24.sa.-2	Ort. IC ₅₀ 24.sa.
Q1	%0,40	%0,20	%0,30	%0,30	%0,10	%0,20	%2,00	%1,30	%1,65	%2,50	%3,40	%2,95
Q2	%7,90	%10,00	%8,95	%9,30	%8,00	%8,65	%12,30	%16,40	%14,35	%17,90	%19,00	%18,45
Q3	%88,70	%87,20	%87,95	%87,60	%88,40	%88,00	%80,20	%76,20	%78,20	%76,20	%74,90	%75,55
Q4	%3,00	%2,60	%2,80	%2,80	%3,50	%3,15	%5,50	%6,20	%5,85	%3,40	%2,70	%3,05

Bu sonuçlara göre 12. Saatte IC₅₀ Tozasertib, hücre popülasyonunda aşağıda açıklanan değişimlere neden olduğu tespit edildi;

- Nekrotik hücrelerin oranını %1,35 arttırdı,
- Sekonder apoptotik aktivite gösteren hücre oranını ise %5,40 arttırdı.
- Canlı hücrelerin oranını ise %9,75 azalttı.
- Primer apoptotik aktivite gösteren hücre oranını %3,05 arttırdı
- Toplamda apoptotik hücre oranını %8,45 arttırdığı tespit edildi.

IC₅₀ Tozasertib'in 24. saatin sonunda CFPAC-1 hücre popülasyonunda aşağıda açıklanan değişimlere neden olduğu tespit edildi;

- Nekrotik hücrelerin oranını %2,75 arttırdı.
- Sekonder apoptotik aktivite gösteren hücre oranını %9,80 arttırdı.
- Canlı hücrelerin oranını %12,45 azalttı.
- Primer apoptotik aktivite gösteren hücre oranını %0,1 azalttı.
- Toplamda apoptotik hücre oranını %9,7 arttırdı.

Pankreatik duktal adenokarsinoma hücre hattı olan CFPAC-1'in Tozasertib uygulama yapılan grupta inkübasyondan sonraki 12. saate göre 24. saatte görülen değişimler ise aşağıdaki gibidir;

- Nekrotik aktivite gösteren hücre oranı %1,3 arttı.
- Sekonder apoptotik aktivite gösteren hücre oranı %4,1 arttı.
- Canlı hücre oranı %2,65 azaldı.
- Primer apoptotik aktivite gösteren hücre oranı %2,8 azaldı.
- Toplamda apoptotik aktivite gösteren bütün hücrelerin oranı %1,3 arttı.

CFPAC-1'in Tozasertib uygulama yapılmayan grupta inkübasyondan sonraki 12. saate göre 24. saatte görülen bazal değişimler ise aşağıdaki gibidir;

- Nekrotik aktivite gösteren hücre oranı %1 azaldı.
- Sekonder apoptotik aktivite gösteren hücre oranı %3 azaldı.
- Canlı hücre oranı %0,05 arttı.
- Primer apoptotik aktivite gösteren hücre oranı %0,35 arttı.
- Toplamda apoptotik aktivite gösteren bütün hücrelerin oranı %0,05 arttı.

CFPAC-1 hücre hattında IC₅₀ konsantrasyon/zaman ayarlı Tozasertib'in akan hücre ölçer ile apoptotik hücre aktivitesine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan FITC Annexin V testi sonuçları ve 12.saat ile 24. saat arasında değişen bazal apoptotik aktiviteye ait sonuçlar Çizelge 4.5.'te özetlenmiştir.

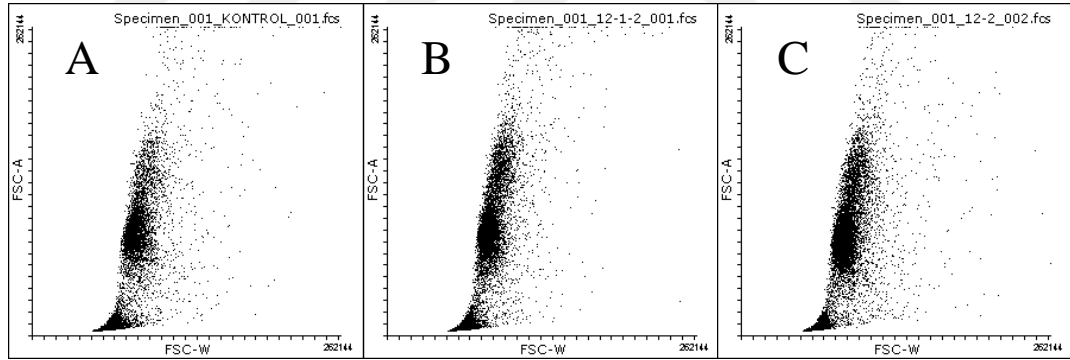
Çizelge 4.5. Karşılaştırmalı Q popülasyonları çizelgesi

Δ	(a) Δ ort.B-ort.T 12.sa.	(b) Δ ort.B-ort.T 24.sa.	(c) Δ ort.T24-ort.T12	(c) Δ ort.B24-ort.B12
Q1	%1,35	%2,75	%1,30	-%0,10
Q2	%5,40	%9,80	%4,10	-%0,30
Q3	-%9,75	-%12,45	-%2,65	%0,05
Q4	%3,05	-%0,10	-%2,80	%0,35
Q2+Q4	%8,45	%9,70	%1,30	%0,05

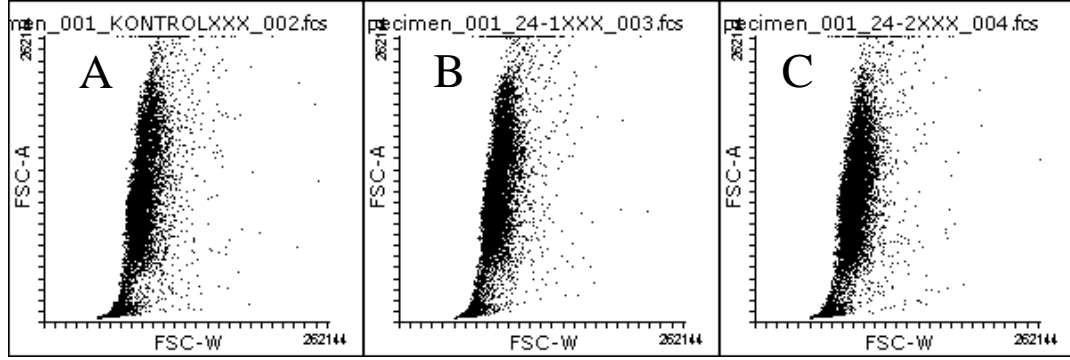
4.6. CFPAC-1 HÜCRE HATTINDA IC₅₀ KONSANTRASYON/ZAMAN AYARLI TOZASERTİB'İN AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE DNA HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Kontrol, 12. ve 24. saat grupları BD FACSAria III cihazına yüklendi ve her grup BD CycleTEST Plus DNA Reagent Kit'inde belirtildiği gibi FSC-A nokta görüntüsüne FSC-W görüntüsü üzerinde iyi bir nokta dağılım görüntüsü elde edilinceye kadar voltaj ayarı yapıldı. Uygun dağılım tespit edildikten sonra, akan hücre ölçerde 10.000 hücre sayımı boyunca veri kaydedildi. Nokta dağılımları 12. saat uygulamaları için Şekil 4.8.'de ve 24. saat uygulamaları için Şekil 4.9.'da gösterildi.

FSC-W/FSC-A nokta grafikleri şekil 4.8'de gösterildi. Bu grafikler Turku Üniversitesi, Biyoteknoloji Merkezi, Hücre Görüntüleme Birimi tarafından geliştirilen Flowing Software 2 yazılımı kullanılarak oluşturuldu.

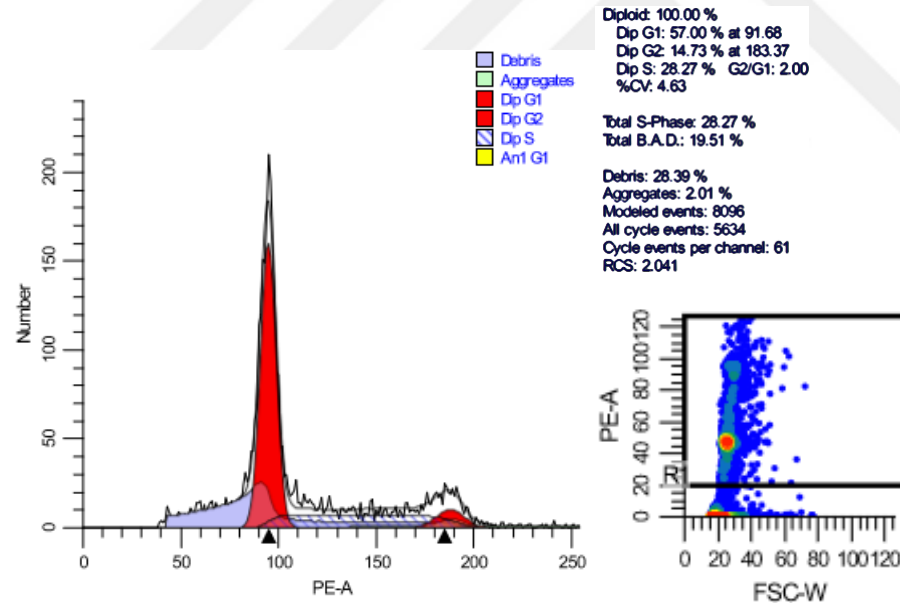


Şekil 4.25. Tozasertib ile 12saat inkübe edilen CFPAC-1 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akan hücre ölçerle değerlendirilmesinde FSC-A/FSC-W nokta dağılımı A) Grup 1, B) Grup 2-A, C) Grup 2-B



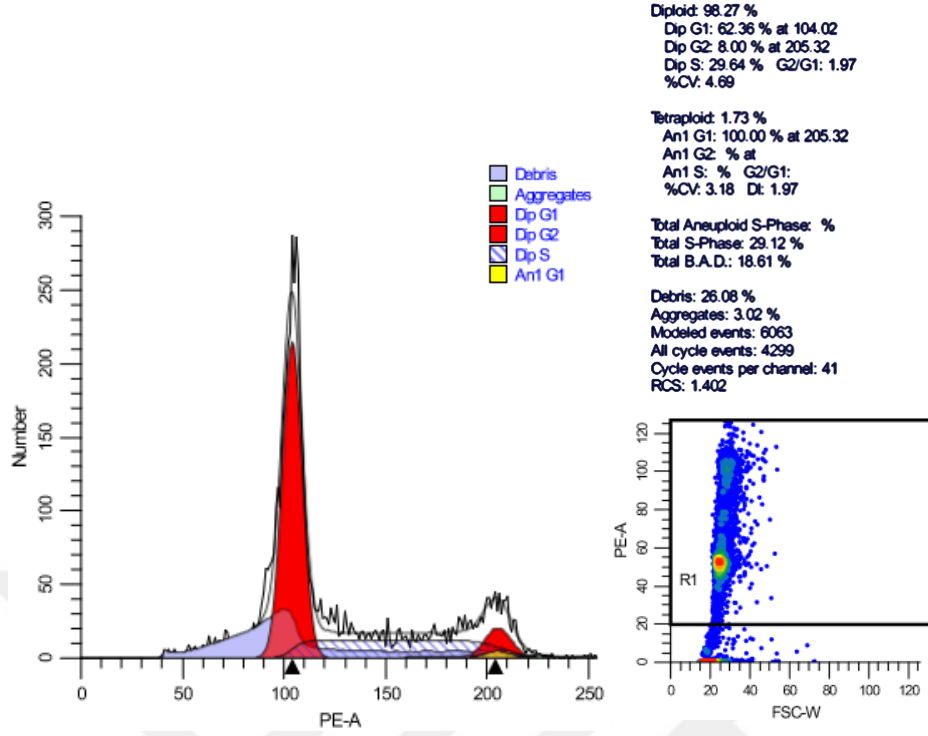
Şekil 4.26. Tozasertib ile 24 saat inkübe edilen CFPAC-1 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akan hücre ölçerle değerlendirilmesinde FSC-A/FSC-W nokta dağılımı A) Grup 3, B) Grup 4-A, C) Grup 4-B

Her grup için analiz tamamlandıktan sonra BD FACSAria III'ten elde edilen elektronik verilerin ModFit yazılımı ile değerlendirilmesi gerçekleştirildi. ModFit yazılımı matematiksel bir model kullanılarak, PI emisyonundan DNA hücre döngüsünün durumu ile ilgili veriler elde edildi. Elde edilen veriler Çizelge 4.6.'da sunuldu.



Şekil 4.27. Grup 1'in PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği, emisyon verilerinin ModFit yazılımı ile analizini göstermektedir.

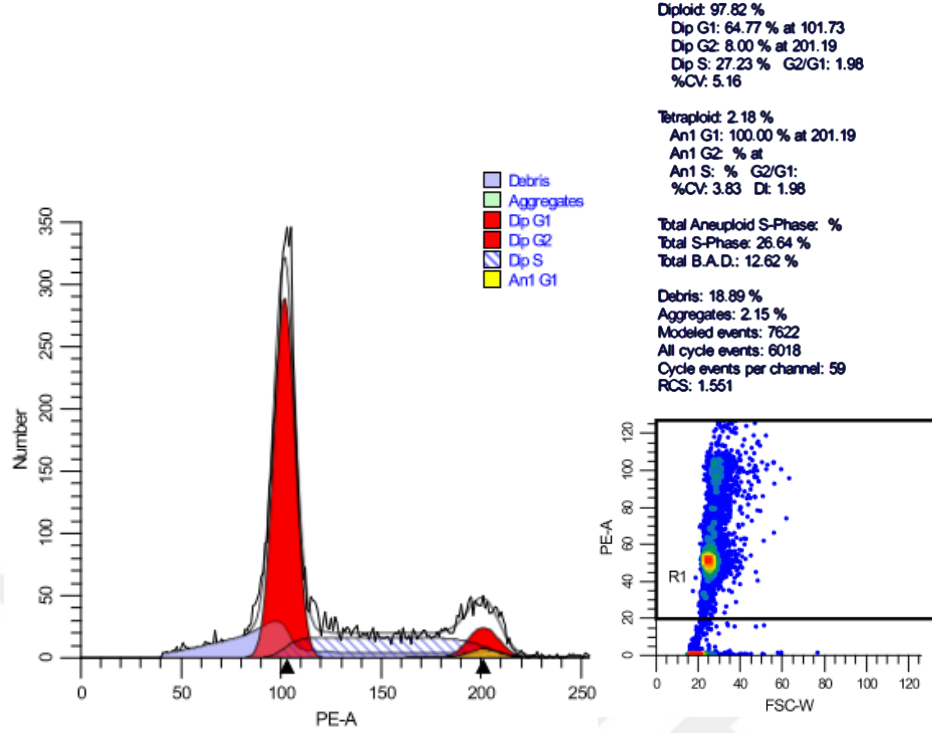
Bu verilere göre 12. saat kontrol gurubu olan Grup 1'deki hücrelerin tamamı diploittir. Diploit hücre popülasyonununun %65,53'ü G1 fazında, %7,48'i G2 fazında ve %26,99'u S fazındadır. G2 fazındaki hücrelerin G1 fazındaki hücrelere PE-A kanalı oranı 1,98 olarak belirlendi. Diploid hücrelerin varyasyon katsayısı %4,63'tür.



Şekil 4.28. Grup 2-A'nın PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği, emisyon verilerinin ModFit yazılımı ile analizini göstermektedir.

Modfit yazılımının PI emisyonundan yaptığı analiz sonucunda ilk 12. saat Tozasertib IC₅₀ konsantrasyon/zaman gurubu olan Grup 2-A'daki diploid hücre oranı %98,27'dir. Diploid hücre popülasyonunun %62,36'sı G1 fazında, %8'i G2 fazında ve %29,64'ü S fazındadır. G2 fazındaki hücrelerin G1 fazındaki hücrelere PE-A kanalı oranı 1,97 olarak belirlendi. Diploid hücrelerin varyasyon katsayısı-%CV-4,69'dur.

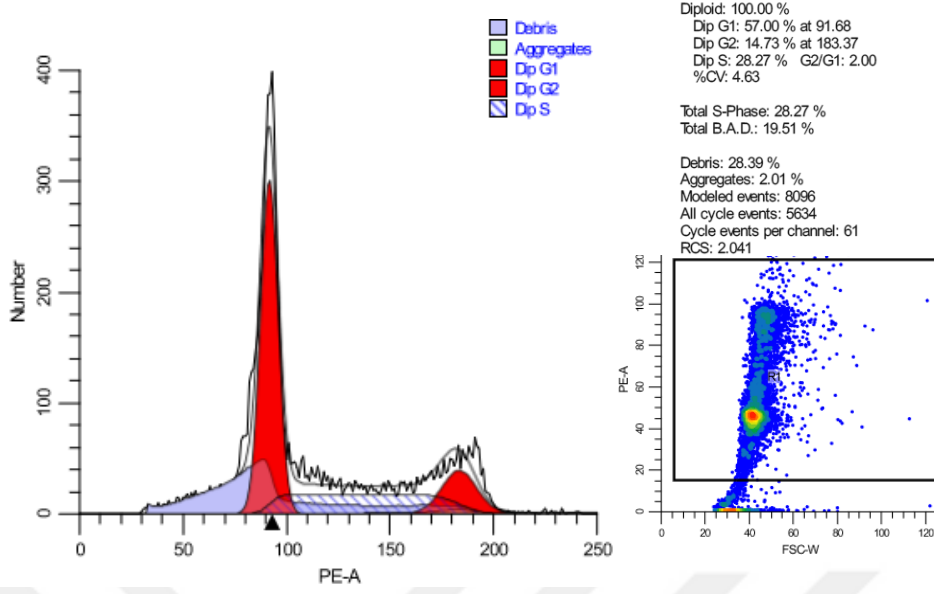
Toplam hücre popülasyonunun %1,73'ü tetraploittir. Tetraploit hücrelerin tamamı G1 fazında tutuklanmıştır ve varyasyon katsayısı 3,18'dir.



Şekil 4.29. Grup 2-B'nin PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği, emisyon verilerinin ModFit yazılımı ile analizini göstermektedir.

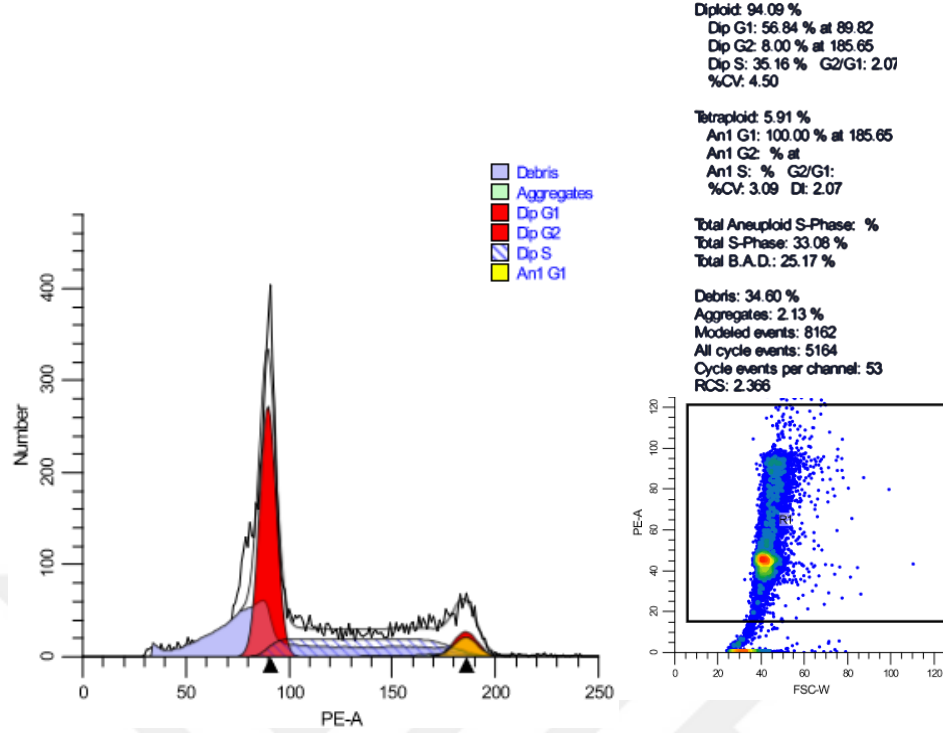
Modfit yazılımının PI emisyonundan yaptığı analiz sonucunda ikinci 12. saat IC_{50} Tozasertib konsantrasyon/zaman gurubu olan Grup 2-B'deki diploid hücre oranı %97,82'dir. Diploid hücre popülasyonunun %64,77'si G1 fazında, %8'i G2 fazında ve %27,33'ü S fazındadır. G2 fazındaki hücrelerin G1 fazındaki hücelere PE-A kanalı oranı 1,98 olarak belirlendi. Diploid hücrelerin varyasyon katsayısı 5,16'dır.

Toplam hücre popülasyonunun %2,18'i tetraploittir. Tetraploit hücrelerin tamamı G1 fazında tutuklanmıştır ve varyasyon katsayısı 3,83'tür.



Şekil 4.30. Grup 3'ün PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği, emisyon verilerinin ModFit yazılımı ile analizini göstermektedir.

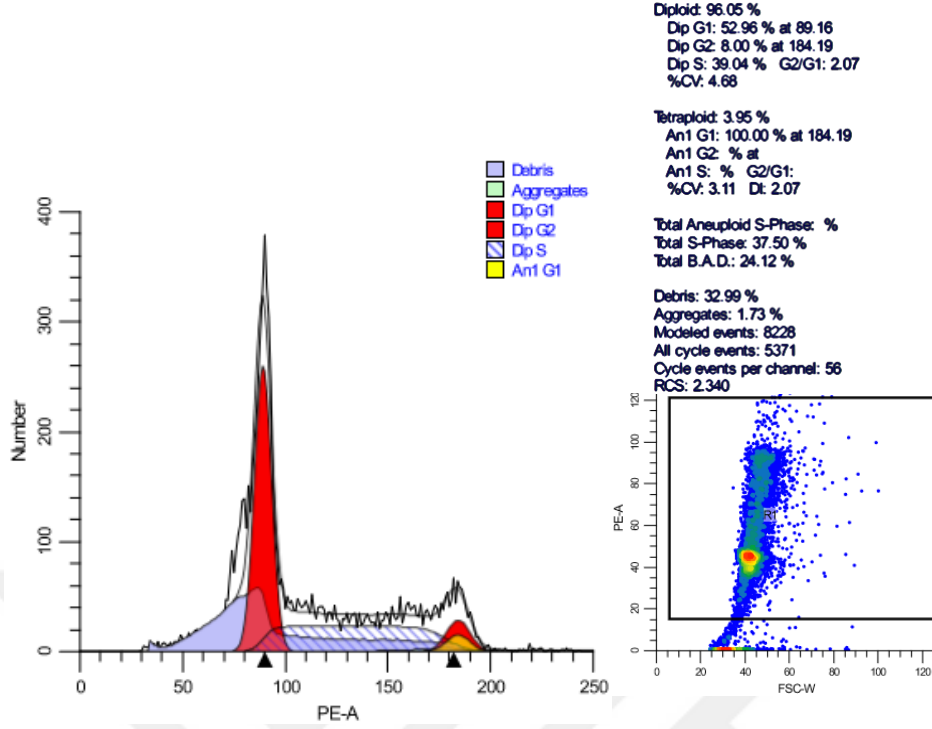
Modfit yazılımının PI emisyonundan yaptığı analize göre 24. saat kontrol gurubu olan Grup 3'deki hücrelerin tamamı diploittir. Diploit hücre popülasyonunun %57'si G1 fazında, %14,73'ü G2 fazında ve %28,27'si S fazındadır. G2 fazındaki hücrelerin ve G1 fazındaki hücelere PE-A kanalı oranı 2 olarak belirlendi. Diploid hücrelerin varyasyon katsayısı %4,63'tür.



Şekil 4.31. Grup 4-A'nın PE-A filtresinde PI emisyonu grafiği, emisyon verilerinin ModFit yazılımı ile analizini göstermektedir.

Modfit yazılımının PI emisyonundan yaptığı analiz sonucunda ilk 24. saat IC₅₀ Tozasertib konsantrasyon/zaman gurubu olan Grup 4-A'daki diploid hücre oranı %94,09'dur. Diploid hücre popülasyonunun %56,84'ü G1 fazında, %8'i G2 fazında ve %35,16'sı S fazındadır. G2 fazındaki hücrelerin G1 fazındaki hücrelere PE-A kanal oranı 2,07 olarak belirlendi. Diploid hücrelerin varyasyon katsayısı 4,5'tir.

Toplam hücre popülasyonunun %5,91'i tetraploittir. Tetraploit hücrelerin tamamı G1 fazında tutuklanmıştır ve varyasyon katsayısı 3,09'dur.



Şekil 4.32. Grup 4-B'nin PE-A filtresinde PI emisyonu grafiğı, emisyon verilerinin ModFit yazılımı ile analizini göstermektedir.

Modfit yazılımının PI emisyonundan yaptığı analiz sonucunda ikinci 24. saat IC₅₀ Tozasertib konsantrasyon/zaman gurubu olan Grup 4-B'deki diploid hücre oranı %96,05'tir. Diploid hücre popülasyonunun %52,96'sı G1 fazında, %8'i G2 fazında ve %39,04'ü S fazındadır. G2 fazındaki hücrelerin G1 fazındaki hücelere PE-A kanal oranı 2,07 olarak belirlendi. Diploid hücrelerin varyasyon katsayısı 4,68'dir.

Toplam hücre popülasyonunun %3,95'i tetraploittir. Tetraploit hücrelerin tamamı G1 fazında tutuklanmıştır ve varyasyon katsayısı 3,11'dir.

Çizelge 4.6. DNA Hücre döngüsü analizi sonuçlarının özet çizelgesi

	Grup 1	Grup 2- A	Grup 2- B	Grup 2 Ort.	Grup 3	Grup 4- A	Grup 4- B	Grup 4 Ort.
Diploid Oranı	%100,00	%98,27	%97,82	%98,05	%100,00	%94,09	%96,05	%95,07
% Dip G1	%65,53	62,36%	%64,77	%63,57	%57,00	%56,84	%52,96	%54,90
% Dip G2	%7,48	%8,00	%8,00	%8,00	%14,73	%8,00	%8,00	%8,00
% Diploid S	%26,99	29,64%	%27,33	%28,49	%28,27	%35,16	%39,04	%37,10
G2/G1 Kanal Oranı	1,98	1,97	1,98	1,975	2,00	2,07	2,07	2,07
%CV	%4,63	%4,69	%5,16	%4,93	%4,63	%4,50	%4,68	%4,59
Top. Tetraploid	%0,00	%1,73	%2,18	%1,96	%0,00	%5,91	%3,95	%4,93
% Anp. G1	%0,00	%100,00	%100,00	%100,00	%0,00	%100,00	%100,00	%100,00
%CV	-	3,18	3,83	3,505	-	3,09	3,11	3,1
DI:	-	1,97	1,98	1,975	-	2,07	2,07	2,07
Total S Fazı	%26,99	%29,12	%26,64	%27,88	%28,27	%33,08	%37,50	%35,29
B.A.D.	%20,94	%18,61	%12,62	%15,62	%19,51	%25,17	%24,12	%24,65
Debris	%29,30	%26,08	%18,89	%22,49	%28,39	%34,60	%32,99	%33,80
Agregatlar	%4,63	%3,02	%2,15	%2,59	%2,01	%2,13	%1,73	%1,93
Modellenen Hücreler	3698	6063	7622	6842,5	8096	8162	8228	8195
Bütün Faz Hücreleri	2443	4299	6018	5158,5	5634	5164	5371	5267,5
Kanal başına düşen hücre	25	41	59	50	61	53	56	54,5
RCS	1,051	1,402	1,551	1,4765	2,04	2,366	2,34	2,353

Akan hücre ölçer cihazı ile FITC Annexin V yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, IC₅₀ Tozasertib'in 12. saatin sonunda %1,96 poliploidi oluşturduğu gösterildi. İleri saatlerde poliploidinin daha fazla arttığı 24. saatte belirlenen %4,93'lük poliploidi oranı ile gösterildi. Bu bulgu, Li ve ark.'nın A498 ve Caki-1 hücre hatlarına 72 saatlik süresince uyguladığı 5x10⁻⁸ M Tozasertib'in akan hücre ölçer DNA hücre döngüsü analizleri ile karşılaştırıldığında oldukça tutarlıdır. Li ve ark. da poliploidi artışı ve G2/M fazında hücre döngüsünün tutuklandığını ve böylece apoptozun uyarıldığını bildirmişlerdir [52].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Aurora kinaz B inhibitörlerinden biri olan Tozasertib'in hücre bölünmesini yarı yarıya durduran IC₅₀ konsantrasyon aralığı xCELLigence DP cihazında gerçek zamanlı olarak araştırılmıştır.

Bu araştırmanın sonucunda;

1. CFPAC-1 pankreatik duktal adenokarsinom hücrelerine 10⁻⁴ M – 10⁻⁸ M aralığında beş farklı konsantrasyonda Tozasertib uygulaması yapıldı ve xCELLigence DP cihazındaki gerçek zamanlı hücre analizine göre, IC₅₀ değeri 6,4x10⁻⁸ M olarak tespit edildi.

2. Tozasertib'in bu 5 farklı konsantrasyonu 12 kuyucuklu plak ile konvansiyonel hücre sitotoksosite sayım analizi olan tripan mavisi hücre canlılığı testi ile denendi ve çapraz doğrulama sağlandı. Tripan mavisi boyası hücre canlılık testine göre 10⁻⁵ M ve 10⁻⁶ M konsantrasyonlar sitotoksik, 10⁻⁷ M ve 10⁻⁸ M konsantrasyonlar sitotoksosite sınırına yakın bulundu.

3. xCELLigence DP gerçek zamanlı hücre analizöründe migrasyon testleri için kullanılan CIM-Plate elektronik hücre kültür plaklarında yapılan konsantrasyon/zaman bağımlı testlere göre Tozasertib'in CFPAC-1 hücrelerinde migrasyonu engelleyen ya da daha fazla teşvik eden herhangi bir etkisi tespit edilemedi.

4. IC₅₀ Tozasertib'in önemli bir apoptotik direnç elemanı olan Survivin proteininin anlatımını artırdığı immünflöresan yöntem ile gösterildi.

5. IC₅₀ Tozasertib uygulanan CFPAC-1 hücrelerinde, CPC yolağındaki proteinlerden AURKB ve Borealin'in kontrol hücrelerine göre daha düşük düzeyde anlatıldığı immünflöresan yöntemle gösterildi.

6. Bazal apoptotik aktivite ile kıyaslanan IC₅₀ Tozasertib aktivitesinin, nekrotik ve apoptotik aktivite gösteren hücre oranını arttırdığı bulguları.

7. Önemli bir CPC yolağı bileşeni olan Aurora kinaz B proteininin IC₅₀ Tozasertib ile inhibe edilmesinin poliploidiye neden olduğu DNA hücre döngüsü analizi ile gösterildi. İleri saatlerde bu etkinin arttığı ve böylece IC₅₀ Tozasertib ile anöloid G1 hücre döngüsü tutuklanmasının tetiklendiği bulundu.

Tozsertib'in CFPAC-1 pankreas duktal adenokarsinoma hücrelerinde kantitatif gerçek zamanlı olarak ölçülen sitotoksik indeks, migrasyon, apoptoz, DNA hücre döngüsü, CPC proteinlerinin immünflöresan analizi sonucu elde edilen veriler gelecek çalışmalara ışık tutacaktır. Farklı bileşik grupları ile sinerjik etkilerinin konsantrasyon/zaman değişkenleri dikkate alınarak çalışılması, ayrıca kanser hücrelerinin proliferasyon ve hücre ölümü yollarındaki farklı gen ve protein düzeyindeki *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Pandol, S.J., "The Exocrine Pancreas", *Colloq. Ser. Integr. Syst. Physiol. Mol. Funct.* 3, 1–64 s., (2011).
- [2] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012", *Int. J. Cancer.* 136, E359–E386 s., (2015).
- [3] Hoyert, D.L., Xu, J., "Deaths: preliminary data for 2011", *Natl Vital Stat Rep.* 61, 1–52 s., (2012).
- [4] Carmena, M., Earnshaw, W.C., "The cellular geography of aurora kinases", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 842–854 s., (2003).
- [5] Rojanala, S., Han, H., Muñoz, R.M., Browne, W., Nagle, R., Von Hoff, D.D., Bearss, D.J., "The mitotic serine threonine kinase, Aurora-2, is a potential target for drug development in human pancreatic cancer", *Mol. Cancer Ther.* 3, 451–457 s., (2004).
- [6] Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., Taylor, S.S., "Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores", *J. Cell Biol.* 161, 267–280 s., (2003).
- [7] Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells", *Nature.* 411, 494–498 s., (2001).
- [8] Ballinger, W.F., Lacy, P.E., "Transplantation of intact pancreatic islets in rats", *Surgery.* 72, 175–186 s., (1972).
- [9] Ahmad, O.B., Boschi-Pinto, C., Lopez, A.D., Murray, C.J., Lozano, R., Inoue, M., "Age standardization of rates: a new WHO standard," *World Health Organization Geneva,* (2001).
<http://www.who.int/entity/healthinfo/paper31.pdf?ua=1> (8.06. 2015).
- [10] Köse, M.R., Başara, B.B., Güler, C., Yentür, G. K., "Sağlık İstatistikleri Yıllığı", (2013). <http://www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-97020/h/saglik-istatistik-yilligi-2013.pdf> (8.06.2015).

- [11] Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Robbins, S.L., Cotran, R.S., Sav, A., Özdamar, Ş.O., "Pankreas", in: Robins Ve Cotran Hast. Patolojik Temeli, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 947–953 s., (2009).
- [12] Pollard, J.R., Mortimore, M., "Discovery and Development of Aurora Kinase Inhibitors as Anticancer Agents", *J. Med. Chem.* 52, 2629–2651 s., (2009).
- [13] Thomas, D.B., "Regulation of the mammalian cell cycle in vitro?", *Biochem. Soc. Trans.* 5, 1801–1808 s., (1977).
- [14] Lajtha, L.G., "Recent studies in erythroid differentiation and proliferation", *Medicine (Baltimore)*. 43, 625–653 s., (1964).
- [15] van den Ingh, H.F., Griffioen, G., Cornelisse, C.J., "Flow cytometric detection of aneuploidy in colorectal adenomas", *Cancer Res.* 45, 3392–3397 s., (1985).
- [16] Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J.R., Nasmyth, K., "Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora Kinase-INCENP) Complex Promotes Chromosome Bi-orientation by Altering Kinetochore-Spindle Pole Connections", *Cell*. 108, 317–329 s., (2002).
- [17] Biggins, S., "The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint", *Genes Dev.* 15, 3118–3129 s., (2001).
- [18] Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., Parry, H., "Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles", *Cell*. 81, 95–105 s., (1995).
- [19] Ducat, D., Zheng, Y., "Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation", *Exp. Cell Res.* 301, 60–67 s., (2004).
- [20] Bolanos-Garcia, V.M., "Aurora kinases", *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1572–1577 s., (2005).
- [21] Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., Conti, E., "Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle", *Mol. Cell*. 12, 851–862 s., (2003).
- [22] Scholey, J.M., Brust-Mascher, I., Mogilner, A., "Cell division", *Nature*. 422, 746–752 s., (2003).

- [23] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., "Cytokinesis", in: *Mol. Biol. Cell*, 4th ed., Garland Science, New York, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26831/>, (2002).
- [24] Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., Lees, E., "The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation", *Oncogene*. 19, 4906–4916 s., (2000).
- [25] Chao, W.C.H., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E.H., Barford, D., "Structure of the mitotic checkpoint complex", *Nature*. 484, 208–213 s., (2012).
- [26] Taguchi, S., Honda, K., Sugiura, K., Yamaguchi, A., Furukawa, K., Urano, T., "Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1", *FEBS Lett.* 519, 59–65 s., (2002).
- [27] Buschhorn, B. A., Peters, J. M., "How APC/C orders destruction", *Nat. Cell Biol.* 8, 209–211 s., (2006).
- [28] Castro, A., "The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A", *EMBO Rep.* 3, 1209–1214 s., (2002).
- [29] "Homo sapiens aurora kinase B (AURKB), transcript variant 1, mRNA - Nucleotide - NCBI", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/378786659> (01.06.2015).
- [30] "Homo sapiens aurora kinase B (AURKB), transcript variant 2, mRNA - Nucleotide - NCBI", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/378786657> (1.06.2015).
- [31] "Homo sapiens aurora kinase B (AURKB), transcript variant 3, mRNA - Nucleotide - NCBI", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/548960891> (1.06.2015).
- [32] Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L., Earnshaw, W.C., "Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle", *J. Cell Biol.* 166, 179–191 s., (2004).

- [33] Lens, S.M., Wolthuis, R.M., Klompmaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G., Medema, R.H., "Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension", *EMBO J.* 22, 2934–2947 s., (2003).
- [34] Shu, F., Guo, S., Dang, Y., Qi, M., Zhou, G., Guo, Z., Zhang, Y., Wu, C., Zhao, S., Yu, L., "Human Aurora-B binds to a proteasome α -subunit HC8 and undergoes degradation in a proteasome-dependent manner", *Mol. Cell. Biochem.* 254, 157–162 s., (2003).
- [35] Vader, G., Lens, S.M.A., "The Aurora kinase family in cell division and cancer", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer.* 1786, 60–72 s., (2008).
- [36] Tang, C.J.C., Chuang, C.K., Hu, H.M., Tang, T.K., "The Zinc Finger Domain of Tzfp Binds to the tbs Motif Located at the Upstream Flanking Region of the Aie1 (aurora-C) Kinase Gene", *J. Biol. Chem.* 276, 19631–19639 s., (2001)
- [37] Sasai, K., Katayama, H., Stenoien, D.L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Nigg, E.A., Earnshaw, W.C., Brinkley, W.R., Sen, S., "Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells", *Cell Motil. Cytoskeleton.* 59, 249–263 s., (2004).
- [38] National Center for Biotechnology Information, Scripps Research Institute Molecular Screening Center, PubChem Substance Database, "CID:5494449", (2015). <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/citations.html> (09.06.2015).
- [39] Harrington, E.A., Bebbington, D., Moore, J., Rasmussen, R.K., Ajose-Adeogun, A.O., Nakayama, T., Graham, J.A., Demur, C., Hercend, T., Diu-Hercend, A., Su, M., Golec, J.M.C., Miller, K.M., "VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo", *Nat. Med.* 10, 262–267 s., (2004).
- [40] Carter, T.A., Wodicka, L.M., Shah, N.P., Velasco, A.M., Fabian, M.A., Treiber, D.K., Milanov, Z.V., Atteridge, C.E., Biggs, W.H., Edeen, P.T., Floyd, M., Ford, J.M., Grotzfeld, R.M., Herrgard, S., Insko, D.E., Mehta, S.A., Patel, H.K., Pao, W., Sawyers, C.L., Varmus, H., Zarrinkar, P.P., Lockhart, D.J., "Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 11011–11016 s., (2005).
- [41] "Immunocytochemistry Protocol | Novus Biologicals", <http://www.novusbio.com/support/support-by-application/immunocytochemistry/protocol.html> (01.06.2015).

- [42] Van den Eijnde, S.M., Boshart, L., Reutelingsperger, C.P., Zeeuw, C.I.D., Vermeij-Keers, C., "Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pan-cellular phenomenon which alters during apoptosis", *Cell Death Differ.* 4, 311–316 s., (1997).
- [43] Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V", *J. Immunol. Methods.* 184, 39–51 s., (1995).
- [44] Vindeløv, L.L., Christensen, I.J., Nissen, N.I., "A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis", *Cytometry.* 3, 323–327 s., (1983).
- [45] Vindeløv, L.L., Christensen, I.J., Jensen, G., Nissen, N.I., "Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining and internal standardization", *Cytometry.* 3, 332–339 s., (1983).
- [46] Martens, A.C., van den Engh, G.J., Hagenbeek, A., "The fluorescence intensity of propidium iodide bound to DNA depends on the concentration of sodium chloride", *Cytometry.* 2, 24–25 s., (1981).
- [47] Xie, L., Kassner, M., Munoz, R.M., Que, Q.Q., Kiefer, J., Zhao, Y., Mousses, S., Yin, H.H., Von Hoff, D.D., Han, H., "Kinome-wide siRNA screening identifies molecular targets mediating the sensitivity of pancreatic cancer cells to Aurora kinase inhibitors", *Biochem. Pharmacol.* 83, 452–461 s., (2012).
- [48] Guan, Z., Wang, X. R., Zhu, X. F., Huang, X. F., Xu, J., Wang, L. H., Wan, X. B., Long, Z.J., Liu, J. N., Feng, G. K., Huang, W., Zeng, Y. X., Chen, F. J., Liu, Q., "Aurora-A, a Negative Prognostic Marker, Increases Migration and Decreases Radiosensitivity in Cancer Cells", *Cancer Res.* 67, 10436–10444 s., (2007).
- [49] Wang, L.H., Xiang, J., Yan, M., Zhang, Y., Zhao, Y., Yue, C.F., Xu, J., Zheng, F.M., Chen, J. N., Kang, Z., Chen, T. S., Xing, D., Liu, Q., "The Mitotic Kinase Aurora-A Induces Mammary Cell Migration and Breast Cancer Metastasis by Activating the Cofilin-F-actin Pathway", *Cancer Res.* 70, 9118–9128 s., (2010).
- [50] Liu, B.B., Wang, W.H., "Survivin and pancreatic cancer", *World J. Clin. Oncol.* 2, 164 s., (2011).

- [51] Guan, H. T., Xue, X. H., Dai, Z. J., Wang, X. J., Li, A., Qin, Z. Y., "Down-regulation of survivin expression by small interfering RNA induces pancreatic cancer cell apoptosis and enhances its radiosensitivity", *World J. Gastroenterol.* WJG. 12, 2901–2907 s., (2006).
- [52] Li, Y., Zhang, Z. F., Chen, J., Huang, D., Ding, Y., Tan, M. H., Qian, C. N., Resau, J.H., Kim, H., Teh, B.T., "VX680/MK-0457, a potent and selective Aurora kinase inhibitor, targets both tumor and endothelial cells in clear cell renal cell carcinoma", *Am. J. Transl. Res.* 2, 296–308 s., (2010).



EKLER

EK-1. Aurora Kinaz B varyantları ve amino asit dizileri

1. Aurora kinaz B izoform 1'in aminoasit dizisi NP_004208.2

ORIGIN

```
1 maqkensypw pygrqtapsg lstlpqrvlr kepvtpsaly lmsrsnvqpt aapgqkvmen
61 ssgtpdiltr hftiddfeig rplgkgkfgn vylarekksh fivalkvlfk sqiekegveh
121 qlrreieiq ahlhhpnrlr ynyfydrrii ylileyaprg elykelqksc tfdeqrtati
181 meeladalmy chgkkvihrd ikpenlllgl kgelkiadfg wsvhpslrr ktmcgtldyl
241 ppemiegrmh nekvdwlcig vlcyellvgn ppfesashne tyrrivkvdI kfpasvpmga
301 qdliskllrh npserlplaq vsahpwvran srrvlppsal qsva
```

2. Aurora kinaz B izoform 2'nin aminoasit dizisi NP_001243763.1

ORIGIN

```
1 msrsnvqpta apgqkvmens sgtpdilrth ftiddfeigr plgkgkfgnv ylarekkshf
61 ivalkvlfks qiekegvehq lrreieiqah lhhpnrlrly nyfydrriy lileyaprg
121 lykelqksct fdeqrtatim eeladalmyc hgkkvihrdi kpenlllglk gelkiadfgw
181 svhpslrrk tmcgtldyly pemiegrmhn ekvdwlcigv lcyellvgnp pfesashnet
241 yrrivkvdIk fpasvpmgaq dliskllrhn pserlplaqv sahpwvrans rrvlppsalq
301 sva
```

3. Aurora kinaz B izoform 2'nin aminoasit dizisi NP_001271455.1

ORIGIN

```
1 maqkensypw pygrqtapsg lstlpqrvlr kepvtpsaly lmsrsnvqpt aapgqkvmen
61 ssgtpdiltr rhftiddfei grplgkgkfg nvyharekks hfivalkvlf ksqiekegve
121 hqlrreieiq ahlhhpnrlr lynyfydrrii ylileyaprg gelykelqks ctfdeqrtat
181 imeeladalmy chgkkvihrd ikpenlllgl kgelkiadfg wsvhpslrr rktmcgtldy
241 lppemiegrm hnekvdwlcig vlcyellvgn nppfesashne etyrrivkvd kfpasvpmg
301 aqdliskllr hnpserlpla qvsahpwvra nsrrvlppsa lqsva
```

EK-2. Aminoasitlerin Gösteriminde Kullanılan Kodlar, Polarite ve Hidrojen İyonu Aktivitesi

Aminoasit	1-Harf	3-Harf	Yan zincir polaritesi	Yan zincir asidite veya bazisite
alanin	a	ala	apolar	Nötür
sistein	c	cys	polar	Nötür
aspartik asit	d	asp	polar	Asidik
glütamik asit	e	glu	polar	Asidik
fenilalanin	f	phe	apolar	Nötür
glisin	g	gly	apolar	Nötür
histidin	h	his	polar	hafif bazik
izolösin	i	ile	apolar	Nötür
lizin	k	lys	polar	Bazik
lösin	l	leu	apolar	Nötür
metiyonin	m	met	apolar	Nötür
asparajin	n	asn	polar	Nötür
prolin	p	pro	apolar	Nötür
glütamin	q	gln	polar	Nötür
arjinin	r	arg	polar	kuvvetli bazik
serin	s	ser	polar	Nötür
treonin	t	thr	polar	Nötür
valin	v	val	apolar	Nötür
triptofan	w	trp	apolar	Nötür
tirozin	y	tyr	polar	Nötür

EK-3 İmmünokimyasal Antikor Tespiti için Hazırlık ve Uygulama Protokolü

Bu protokol ile aderent hücrelerde immünflöresan (IF) boyama lamaları –slip lam- için temizlik ve kaplama hazırlığı yapılacaktır. Boyama lamaları 6 kuyucuklu kültür plaklarına yerleştirilecek ve daha sonra analiz için mikroskop slaytlarına yerleştirilecektir. Birçok mikroskop 0,17 mm kalınlığında lameller ile daha iyi çalışır, bu kalınlık sinyal yoğunluğu bakımından en iyi sonucu verir. Asit temizliği kirlilik yaratacak toz parçalarını uzaklaştırır ve cam üzerine hücrenin adhezyonunu artırır.

1. Slip lamalar 1M HCl içerisinde 24 saat inkübe edilir.
2. 3 kere distile su ile yıkanır.
3. 3 kere %95 etanol ile yıkanır.
4. 0.1 mg/ml jelatin ya da poly-L-lizin solüsyonuna bir raf kullanılarak 5 dakika batırılır.
5. Kültür kabiniinde hava ile ya da 37oC fırında hızlıca kurutulabilir.
6. Temiz, kaplanmış ve kuru lamalar kuyucuklara yerleştirilebilir.
7. Daha sonra kabinin UV lambası ile 2 saat boyunca plak ve slip lamalar sterilize edilebilir.

Hücrelerin Büyütülmesi ve Fiksasyonu

1. Slip lam başına 5×10^5 hücre eklenerek bir gece kültüre edilir.
2. Kültür mediumu uzaklaştırılır ve hücreler %4 formaldehit veya %10 formalin ile 10 dakika oda sıcaklığında kültür kabiniinde inkübe edilir.
3. Fiksatif uzaklaştırılır ve kuyucuklara PBS ile çift yıkama yapılır.
4. Eğer intrasellüler bir epitop görüntülenecekse hücre permeabilizasyonu gerekmektedir.
 - a. Nükleer/mitokondriyal lokalizasyon: hücreler %0.5 Triton X-100 içeren PBS ile 10 dakika inkübe edilir.
 - b. Stoplazmik lokalizasyon: hücreler %0.1-0.5 Tween 20 çözeltisi içeren PBS ile 10 dakika inkübe edilir.
5. Permeabilizasyon tamponu uzaklaştırılır ve kuyucuklar PBS-T (%0.1 Tween 20) ile 5 dakika yıkanır.

Bloklama ve Primer Antikor İnkübasyonu

1. Spesifik olmayan bağlanma bölgeleri bloklama solüsyonu ile 1 saat kadar oda sıcaklığında bloklanır. Sekonder antikorun elde edildiği canlıdan elde edilen serumdan %10 içeren PBS-T en iyi bloklama solüsyonudur, fakat %1 BSA içeren PBS-T de kullanılabilir.
2. Bloklama tamponu uzaklaştırılır ve primer antikor bloklama tamponu içerisinde inkübe edilir. Üreticinin bilgi sayfalarında önerilen antikor konsantrasyonunauyarak 4°C'de bir gece inkübe edilir.
3. Primer antikor uzaklaştırılır ve kuyucuklar 3 kere 5'er dakika PBS-T ile yıkanır. Bu ve bundan sonraki basamaklarda hücrelerin kurumasına müsaade edilmemelidir.
4. Sekonder antikor bloklama tamponuna eklenir ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. Her plak fluoroforun solmaması için bu basamaktan sonra folyo ile kaplanmalıdır.
5. İkincil antikor uzaklaştırılır ve PBS-T ile 5'er dakika 3 kere yıkanır.
6. Tercihli: Çift/Nükleer etiketleme
 - a. Çift etiketleme: ikinci bir primer antikor kullanıyorsanız ve uygun olmayan şekilde ikincil ile eşleşiyorsa 2.-5. adımları tekrarlayınız.
 - b. Nükleer etiketleme: Primer antikorların uygulanmasından sonra DAPI gibi DNA bağlanan boyalar ikincil antikorun uygulanması beklenmeden uygulanabilir. İnkübasyondan sonra 5 dakika PBS ile yıkanır.
7. Bir mikroskop lamına bir damla anti-fade yükleme tamponu alın. Forseps ile kuyucuk altındaki slip lamı çıkarın ve fazla PBS'in akmasını sağlayın. Slip lamları ters yüz şekilde lama yapıştırın.
8. Slip lamların kenarlarını kurumayı önlemek için temiz tırnak ojesi ile kapatın ve ojenin kurumasını bekleyin.
9. Lamalar uygun flüoresans filtre ayarı ile mikroskop altında incelemeye hazırdır. Mikroskop ışığının foto solma dolayısıyla gözlem süresini kısalttığı göz önünde bulundurularak her lamın kullanım süresine dikkat edilmelidir.
10. Lamalar -20 °C - 40 °C arasında karanlık bir lam kutusunda muhafaza edilebilir.

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Hikmet ÇELİK

Doğum Tarihi: 18/06/1985

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Sayısal	İçel Anadolu Lisesi	1996-2013
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Üniversitesi	2003-2010

ESERLER

1. Paydas, S., Acikalın, A., Ergin, M., Celik, H., Yavuz, B., Tanriverdi, K., "MicroRNA profiles (including 370 miRNAs) in lymphomas." J Clin Oncol., 31, (suppl; abstr e19512) (2013)
2. Ercolak, V., Paydas, S., Bagir, E., Ergin, M., Seydaoglu, G., Celik, H., Yavuz, B., Tanriverdi, K., Günaldi, M., Afsar, C. U., Duman, B. B., "PRAME Expression and Its Clinical Relevance in Hodgkin's Lymphoma." Acta haematologica 134, (4): 199-207. s, doi:10.1159/00038153s3. (2015)