

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RADYASYONA MARUZ BIRAKILAN İNSAN GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE  
KÜLTÜRLERİNDE (U-87 MG VE T98G) TRABECTEDİN ARACILI ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ  
SİTOTOKSİK ETKİDE DNA TAMİR MEKANİZMALARININ ROLÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Emir BOZKURT**

**Anabilim Dalı: Biyoloji**

**Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selim UZUNOĞLU**

**MANİSA-2013**

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RADYASYONA MARUZ BIRAKILAN İNSAN GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE  
KÜLTÜRLERİNDE (U-87 MG VE T98G) TRABECTEDİN ARACILI ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ  
SİTOTOKSİK ETKİDE DNA TAMİR MEKANİZMALARININ ROLÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Emir BOZKURT**

**Anabilim Dalı: Biyoloji**

**Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selim UZUNOĞLU**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 16.05.2013**

**MANİSA-2013**

## İÇİNDEKİLER

<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	III
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	IV
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	V
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	VII
<b>ÖZET</b> .....	IX
<b>ABSTRACT</b> .....	X
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Glioblastoma multiforme .....	1
1.1.1. Astrosit farklılaşması ve glioma formasyonunun oluşumu.....	2
1.1.2. GBM insidansı, sınıflandırılması ve moleküler genetiği .....	3
1.1.3. GBM' de tedavi yaklaşımları .....	4
1.1.4. GBM'yi araştırmada kullanılan model hücre hatları .....	6
1.2. İyonize Radyasyon Kaynaklı DNA hasarı ve oluşan hasarlara tercihen çalışan tamir yolları.....	7
1.2.1. İyonize radyasyon .....	8
1.2.2. İyonize radyasyonla indüklenen DNA hasar çeşitleri.....	10
1.2.3. İyonize radyasyon aracılı DNA çift zincir kırıklarına hücrenin cevabı .....	11
1.2.4. DNA çift zincir kırıklarının (DSB) onarımı.....	12
1.2.5. Baz kesip çıkarma onarım (BER) mekanizması .....	14
1.2.6. Yanlış eşleşme onarım mekanizması (MMR).....	16
1.2.7. İyonize radyasyon ile tetiklenen hücre döngüsündeki duraksama .....	18
1.2.8. İyonize radyasyon ile tetiklenen hücre ölüm tipleri .....	19
1.2.8.1. Apoptozis .....	19
1.2.8.1.2. İyonize radyasyon aracılı apoptozis.....	20
1.2.8.2. Otofaji.....	21
1.2.8.3. Nekrozis .....	22
1.3. Trabectedin kaynaklı DNA hasarı ve oluşan hasarlara tercihen çalışan tamir yolları.....	22
1.3.1 Trabectedin (Yondelis <sup>®</sup> , Ecteinascidin 743, ET-743).....	22
1.3.2. Trabectedin ve kan beyin bariyeri.....	23
1.3.3. Trabectedin - DNA etkileşimi .....	23
1.3.3.1. Trabectedin ile tetiklenen DNA hasarlarının tamirinde rol alan mekanizmalar.....	24
1.3.3.1.1. DNA hasarının doğrudan geri çevrilmesi .....	24
1.3.3.1.2. Baz kesip çıkarma onarım (BER) mekanizması .....	25
1.3.3.1.3. Nükleotid kesip çıkarma onarım mekanizması (NER) .....	25
<b>2. AMAÇ</b> .....	27
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	28
3.1. Hücre hatlarının temini, çoğaltımı ve idamesi.....	28
3.2. Hücrelerin sayımı .....	28

3.3. Trabectedin'in stok solüsyonlarının hazırlanması.....	29
3.4. Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan yöntemler.....	29
3.5. Trabectedin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisinin xCELLigence sistemi ile belirlenmesi .....	29
3.6. İyonize radyasyon uygulaması.....	29
3.7. İyonize radyasyonun hücre canlılığı üzerindeki etkisinin Tripan mavisi yöntemiyle belirlenmesi .....	30
3.8. Trabectedin ve iyonize radyasyon ardışık uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi .....	30
3.9. Ardışık deneylerde olası antagonistik/additif/sinerjistik etkilerinin hesaplanması.....	31
3.10. DNA fragmentasyon miktarının ölçümü ile apoptozisin gösterilmesi.....	31
3.11. Kaspaz 3/7 aktivitesinin ölçümü ile apoptozisin doğrulanması.....	31
3.12. Human DNA Repair PCR Array uygulamaları .....	32
3.12.1. RNA izolasyonu.....	32
3.12.2. PCR Array uygulamaları ve analiz.....	32
3.13. İstatistiksel analiz .....	33
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>34</b>
4.1. Trabectedin'in GBM hücre kültürlerinde doza ve zamana bağlı etkileri.....	34
4.2. İyonize radyasyonun GBM hücre kültürlerinde doza ve zamana bağlı etkileri .....	35
4.3. Ardışık uygulamalı Trabectedin ve iyonize radyasyonun GBM hücre kültürleri üzerindeki etkileri .....	35
4.4. DNA fragmentasyon düzeyleri üzerinden Trabectedinin GBM hücre kültürlerindeki apoptotik etkisi .....	37
4.5. Trabectedinin GBM hücre kültürlerinde Kaspaz 3/7 aracılı apoptotik etkisi .....	38
4.6. GBM hücre kültürlerindeki apoptotik etkinin ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonla zenginleştirilmesi .....	38
4.7. Ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonun GBM hücre kültürlerinde Kaspaz 3/7 aracılı apoptotik etkisi.....	39
4.8. Ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonun etkilediği DNA tamiri ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki değişiklikler.....	40
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>47</b>
<b>6. SONUÇ .....</b>	<b>52</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>54</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>67</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.1:</b> Primer ve sekonder GBM tümörlerinde gözlenen genetik değişiklikler .....	4
<b>Şekil 1.2:</b> Elektromanyetik radyasyon çeşitleri .....	9
<b>Şekil 1.3:</b> Compton olayı .....	9
<b>Şekil 1.4:</b> DSB tamir mekanizmaları .....	14
<b>Şekil 1.5:</b> BER mekanizması .....	15
<b>Şekil 1.6:</b> MMR mekanizması .....	16
<b>Şekil 1.7:</b> Trabectedin'in kimyasal yapısı .....	23
<b>Şekil 1.8:</b> O <sub>6</sub> -MeG hasarının MGMT ile onarılması .....	25
<b>Şekil 1.9:</b> NER mekanizması .....	26
<b>Şekil 4.1:</b> xCELLigence sisteminde izlenen U-87 MG (A) ve T98G (B) hücre kültürlerinde Trabectedin'in etkileri .....	34
<b>Şekil 4.2:</b> İyonize radyasyonun U-87 MG (A) ve T98G (B) hücre kültürlerinin canlılık yüzdelerine etkileri .....	35
<b>Şekil 4.3:</b> Ardışık uygulamalı Trabectedin ve IR'nin U-87 MG (A) ve T98G (B) hücre kültürlerinin canlılık yüzdelerine etkileri .....	36
<b>Şekil 4.4:</b> Trabectedin'in ile muamele edilmiş T98G hücre kültürlerinde DNA fragmentasyonu yüzdeleri .....	37
<b>Şekil 4.5:</b> Trabectedin ile muamele edilmiş T98G hücre kültürlerinde kaspaz 3/7 aktivite düzeyleri .....	38
<b>Şekil 4.6:</b> Ardışık uygulamalı Trabectedin ve IR'nin GBM hücre kültürlerinde DNA fragmentasyonu yüzdeleri .....	39
<b>Şekil 4.7:</b> Ardışık uygulamalı etkin Trabectedin ve IR'nin GBM hücre kültürlerinde kaspaz 3/7 aktivasyon düzeyleri .....	40

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b>Çizelge 1.1:</b> İyonize radyasyonla indüklenen baz değişiklikleri ve bu değişikliklerin görülme sıklıkları .....	10
<b>Çizelge 1.2:</b> MMR mekanizmasında rol alan tanımlanmış proteinler ve görevleri .....	17
<b>Çizelge 3.1:</b> Trabectedin ve iyonize radyasyonun ardışık deneylerde uygulanan dozları .....	31
<b>Çizelge 4.1:</b> Yirmi dört saat Trabectedin ve 24 saat iyonize radyasyon ardışık uygulamasının CI değerleri.....	37
<b>Çizelge 4.2:</b> U-87 MG hücre kültürlerinde 8 Gy doz IR uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler .....	41
<b>Çizelge 4.3:</b> T98G hücre kültürlerinde 6 Gy doz IR uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler .....	42
<b>Çizelge 4.4:</b> U-87 MG hücre kültürlerinde 5 nM Trabectedin uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler .....	43
<b>Çizelge 4.5:</b> T98G hücre kültürlerinde 13 nM Trabectedin uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler .....	44
<b>Çizelge 4.6:</b> U-87 MG hücre kültürlerinde 5 nM Trabectedin ve 8 Gy IR uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler .....	45
<b>Çizelge 4.7:</b> T98G hücre kültürlerinde 13 nM Trabectedin ve 6 Gy IR uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler .....	46

## KISALTMALAR LİSTESİ

**ABH:** Alkylation repair homolog; Alkilasyon tamiri homolog  
**ABTS:** 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)  
**AIF:** Apoptosis-inducing factor; Apoptozis indükleyici faktör  
**ATCC:** American Type Culture Collection  
**ATG:** Autophagy Related; Otofaji ilişkili  
**ATM:** Ataxia telangiectasia mutated  
**ATR:** Ataxia telangiectasia and Rad3 related  
**ATXN:** Ataxin  
**APAF:** Apoptotic peptidase activating factor; Apototik peptidaz aktive edici faktör  
**APE:** Apurinic-Apyrimidinic Endonuclease; Apürinik/apirimidinik endonükleaz  
**APO:** Apolipoprotein  
**BCL:** B-cell CLL/lymphoma  
**BCNU:** Bis-chloroethylnitrosourea  
**BCRP:** Breast cancer resistance protein; Meme kanseri direnç proteini  
**BER:** Base excision repair; Baz kesip çıkarma tamiri  
**BRCA:** Breast cancer; Meme kanseri  
**BRIP:** BRCA1 interacting protein  
**BTCG:** Brain Tumor Cooperative Group  
**BTSG:** Brain Tumor Study Group  
**CAD:** Carbamoyl-Phosphate Synthetase;  
**CCNO:** Cyclin O  
**CDC25A:** Cell division cycle 25 homolog A  
**CDC45:** Cell division cycle 45 homolog  
**Chk:** Checkpoint kinase  
**CI:** Combination index, kombinasyon indeksi  
**CNTF/LIF:** Ciliary Neurotrophic Factor/Leukemia inhibitory factor  
**DSB:** Double-strand break, Çift zincir kırığı  
**DNA-PK:** DNA-Dependent Protein Kinase, DNA bağımlı protein kinaz  
**DR:** Death Receptor, Ölüm reseptörü  
**DMSO:** Dimethyl sulfoxide  
**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid  
**EGF:** Epidermal growth factor; Epidermal çoğalma faktörü  
**EGFR:** Epidermal growth factor receptor; Epidermal çoğalma faktörü reseptörü  
**ERCC:** Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency  
**EXO:** Exonuclease  
**FEN:** Flap structure-specific endonuclease  
**FGF:** Fibroblast growth factor; Fibroblast çoğalma faktörü  
**FADD:** Fas (TNFRSF6)-associated via death domain  
**Fas:** TNF Receptor Superfamily, Member 6  
**GBM:** Glioblastoma multiforme  
**Gy:** Gray  
**HR:** Homologous recombination; Homolog rekombinasyon  
**Htra2/Omi:** HtrA serine peptidase/omi  
**IL:** Interleukin  
**IR:** Ionizing radiation, İyonize radyasyon  
**KBB:** Kan Beyin Bariyeri  
**LC:** Light chain 3; Hafif zincir 3  
**mAG:** Macroautophagy; Makrotofaji  
**MDC:** Mediator of DNA damage checkpoint protein  
**MDM2:** Mouse Double Minute 2  
**MDR:** Multiple drug resistance; Çoklu ilaç direnci  
**MGMT:** O-6-methylguanine-DNA methyltransferase  
**MLH:** MutL homolog  
**MMR:** Mismatch repair; Yanlış eşleşme tamiri  
**MRE11:** Meiotic recombination 11 homolog

**MSH:** MutS homolog  
**NBS:** Nijmegen Breakage Syndrome  
**NEIL:** Nei Endonuclease VIII-Like  
**NER:** Nucleotide excision repair; Nükleotid kesip çıkarma tamiri  
**NHEJ:** Non-homologous end joining, Homolog olmayan uçların birleştirilmesi  
**Ogg:** 8-oxoguanine DNA glycosylase  
**OH:** Hydroxyl, hidroksil  
**PARP:** Poly (ADP-ribose) polymerase  
**PCNA:** Proliferating cell nuclear antigen  
**PDGF:** Platelet-derived growth factor, Trombosit kaynaklı çoğalma faktörü  
**P-gp:** P-glycoprotein  
**PI3K:** Phosphatidylinositol 3-Kinase  
**PMS:** Postmeiotic Segregation Increased  
**PTEN:** Phosphatase and tensin homolog  
**Rb:** Retinoblastoma  
**RFC:** Replication factor C  
**RPA:** Replication factor A  
**SHH:** Sonic hedgehog  
**SSB:** Single-strand break; Tek zincir kırığı  
**TRADD:** TNFRSF1A-associated via death domain  
**TMZ:** Temozolomid  
**TNF:** Tumor necrosis factor  
**TNFR:** Tumor necrosis factor receptor  
**TOP:** Topoisomerase  
**TR:** Trabectedin  
**XP:** Xeroderma pigmentosum  
**XRCC:** X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren eşsiz bilgi birikimi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Selim UZUNOĞLU'na, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Arş. Gör. Harika ATMACA'ya, bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için gerekli laboratuvar imkanlarını kullanmama izin veren ve geniş vizyonu ile beni destekleyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Rüşhan USLU ve Sayın Doç. Dr. Burçak KARACA'ya, iyonize radyasyon uygulamalarına danışmanlık yapan Uzm. Dr. Özlem AKAGÜNDÜZ'e, tez projeme finansal destek sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve yaşamım boyunca bana destek olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Emir BOZKURT, 2013

Bu yüksek lisans tez çalışmasının sarf malzemeleri, Celal Bayar Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenen, FBE 2012–094 'nolu projeden karşılanmıştır.

**RADYASYONA MARUZ BIRAKILAN İNSAN GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE  
KÜLTÜRLERİNDE (U-87 MG VE T98G) TRABECTEDİN ARACILI ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ  
SİTOTOKSİK ETKİDE DNA TAMİR MEKANİZMALARININ ROLÜ  
ÖZET**

Glioblastoma Multiforme (GBM), primer beyin tümörleri içerisinde en sık karşılaşılan ve en ölümcül olanıdır. Tedavideki en önemli sorunlardan biri, tümör hücrelerinin radyasyona ve kemotörapötiklere karşı direnç geliştirmesidir. Bu yüzden güncel araştırma stratejileri, molekül bazlı hedeflerin belirlenmesini, yeni kemotörapötikler geliştirilmesini, tümör hücrelerinin radyasyona karşı duyarlı hale getirilmesini içerir. Trabectedin (ET-743), Karayip Denizi'nde yaşayan omurgasız bir canlı olan Ecteinascidia turbinata (deniz fıskiyesi) organizmasından izole edilmiş, günümüzde yarı sentetik olarak üretilen bir moleküldür. DNA'nın küçük oluşuna bağlanıp konformasyonunda bozulmalara yol açarak, hücreyi ölüme götürdüğü bilinmektedir.

Bu çalışmanın öncelikli amacı, glioblastoma multiforme hücre (U-87 MG ve T98G) kültürlerine düşük dozlardaki radyasyon ve trabectedin molekülünün ardışık uygulanmasıyla sitotoksik ve apoptotik etkinliğin zenginleştirilip zenginleştirilemeyeceğini test etmektir. İkincil amaç ise, radyasyon ve trabectedin uygulanan GBM hücrelerinde gözlenen zenginleştirilmiş sitotoksik/apoptotik etkide, DNA tamir sistemlerinin rol alıp almadığını araştırmaktır.

Trabectedin'in hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin araştırılmasında xCELLigence sistemi kullanıldı. İyonize radyasyon ve ardışık uygulamaların hücre canlılığı üzerindeki etkileri Tripan mavisi yöntemi kullanılarak araştırıldı. Apoptozisin gösterilmesinde, DNA fragmentasyon miktarı ve kaspaz 3/7 aktivasyon düzeyleri ölçüldü. Ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonun etkilediği DNA tamiri ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki değişiklikler Human DNA Repair Array PCR Array kullanılarak araştırıldı.

Trabectedin'in U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde 24. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 8.4 nM ve 17 nM; 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri ise sırasıyla 5 ve 13 nM hesaplandı. İyonize radyasyon'un U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde 24. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla 22Gy ve 25 Gy; 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla 8 Gy ve 9.8 Gy bulundu. Her iki hücre kültüründe de, 24 saat Trabectedin ve 24 saat iyonize radyasyon ardışık uygulamasının sitotoksik etkiyi zenginleştirdiği saptandı. Trabectedin'in artan konsantrasyonları (0.01-100 nM) ile muamele edilen T98G hücre kültürlerinin DNA fragmentasyonu ve kaspaz 3/7 aktivite düzeylerinde doza ve zamana bağlı artış gözlemlendi. Her ikisinin ardışık uygulandığı T98G hücre kültürlerinde DNA fragmentasyonu ve kaspaz 3/7 aktivasyonu düzeylerinde artış gözlemlendi. Ardışık uygulamanın T98G hücre kültürlerinde Rad51B, XRCC4, ATM, ATR, MGMT; U-87 MG hücre kültürlerinde ise OGG1, Rad51B, XRCC4 gibi DNA tamir mekanizmaları ile ilişkili genlerin mRNA düzeyinde değişikliklere yol açtığı belirlendi.

GBM hücre kültürlerinde (U-87 MG ve T98G) Trabectedin ve iyonize radyasyonun ardışık uygulamasının sitotoksik ve apoptotik etkileri, DNA tamir mekanizmalarını nasıl etkilediği ilk defa bu çalışma ile ortaya konuldu. Bu çalışmanın verileri, GBM kanserinin tedavisinde radyoterapinin etkinliğini artırmada, Trabectedin'in hücreleri hassaslaştırmada kullanılabilecek etkin bir kemoterapötik olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** U-87 MG ve T98G hücre kültürleri, İyonize radyasyon, Trabectedin, Sitotoksikite, DNA tamir mekanizmaları.

**THE ROLE OF DNA REPAIR MECHANISMS IN TRABECTEDIN MEDIATED ENHANCED  
CYTOTOXIC EFFECT IN RADIATION TREATED HUMAN GLIOBLASTOMA  
MULTIFORME CELL CULTURES (U-87 MG AND T98G)**

**ABSTRACT**

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common and lethal brain tumors. One of the most important problems in the treatment is drug and radiation resistance observed in glioblastoma cells. Thus, current research strategies include determining molecular targets, developing new chemotherapeutics and sensitization of tumor cells to radiation.

Trabectedin (ET-743) is a molecule that was originally isolated from the Caribbean sea squirt, *Ecteinascidia turbinata* and is currently prepared semi-synthetically. It is known that it binds to minor groove of the DNA and leads to cell death.

The main objective of the study is to investigate whether the cytotoxic and apoptotic effect of sequential treatment of the low doses of radiation and Trabectedin on human glioblastoma multiforme (U-87 MG ve T98G) cells would enhance. Moreover it is to investigate the role of DNA repair mechanisms on the enhanced cytotoxic/apoptotic effect of sequential treatment of the low doses of radiation and Trabectedin.

xCELLigence system was used for investigating the effects of Trabectedin on the cell viability. The effects of ionizing radiation and sequential treatments on the cell viability were determined by using Trypan blue dye exclusion assay. Apoptosis was shown by measuring the level of DNA fragmentation and caspase 3/7 activation. Changes in mRNA levels of DNA repair related genes which are affected by sequential treatment of efficient Trabectedin and radiation doses were determined by Human DNA Repair Array PCR Array.

The IC<sub>50</sub> values of Trabectedin in U-87 MG and T98G cell lines were 8.4 nM and 17 nM, respectively, at 24h; 5 and 13 nM, respectively, at 48h. The IC<sub>50</sub> values of ionizing radiation in U-87 MG and T98G cell lines were 22 Gy and 25 Gy, respectively, at 24h; 8 Gy and 9.8 Gy, respectively, at 48h. Enhanced cytotoxicity was observed in both tested cell lines by sequential treatment of Trabectedin and ionizing radiation. Increased DNA fragmentation and caspase 3/7 activation was observed in T98G cell lines treated with increasing concentrations (0.01-100 nM) of Trabectedin in a time and dose dependent manner. Increased levels of DNA fragmentation and caspase 3/7 activation were observed in sequentially treated T98G cell lines. Sequential treatment was also caused significant changes in mRNA levels of DNA repair mechanisms related genes such as Rad51B, XRCC4, ATM, ATR, MGMT in T98G cell lines; OGG1, Rad51B, XRCC4 in U-87 MG cell lines.

This is the first study in the GBM cell cultures that both cytotoxic/ apoptotic effects of the sequential treatment of Trabectedin and ionizing radiation and the role of DNA repair mechanisms in these effects were investigated. The preliminary data indicates that Trabectedin may be a promising chemotherapeutic for sensitizing cells to ionizing radiation in the treatment of GBM.

**Keywords:** U-87 MG and T98G cell lines, Ionizing radiation, Trabectedin, Cytotoxicity, DNA repair mechanisms.

## 1.GİRİŞ

### 1.1. Glioblastoma Multiforme

Hücrelerde çoğalmayı düzenleyen moleküler mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar ve fenotipe yansıyan hücre içi kontrolsüz etkileşimler, çoğalma kontrolünün kaybı ile sonuçlanabilir. Hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve bundukları dokudan diğer dokulara yayılmasıyla karakteristik bir hastalık olan kanserin 100'ün üzerinde çeşidi vardır. Kanserler genel olarak köken aldıkları dokuya göre sınıflandırılır. Epitelial hücrelerinden köken alanlar "karsinom", mezoderm hücrelerinden (kemik, kas gibi) köken alan kanserler "sarkom", meme hücreleri gibi salgı bezi hücrelerinden köken alanlar ise "adenokarsinom" olarak adlandırılırlar. Hücrelerin aşırı çoğalmasıyla dokularda oluşan ve büyüme eğilimi gösteren kitleler ise tümör adını alır. Beyin tümörleri, tüm tümör tipleri içerisinde %2 görülme sıklığıyla yer alırken, glioblastomalar beyin tümörlerinde %60 görülme sıklığıyla ilk sırada yer alır. Glioblastoma multiforme (GBM) ise yetişkinlerde en sık rastlanan primer beyin tümörüdür. GBM insidansı akciğer, kolon ve meme kanserleri ile karşılaştırıldığında az olmasına karşın, tüm kanser çeşitleri arasında en dirençli olan ve en kötü seyreden türdür. Son 40 yıllık dönemde gelişen teknolojiye paralel olarak mikronörocerrahi, iyonize radyasyon (IR) terapisi, radyolojik görüntüleme sistemleri ve yeni kemoterapötikler başarıyla geliştirilmiş olmasına karşın GBM prognozu günümüzde kötü seyrine devam etmektedir. GBM hastaları için ortalama yaşam süresi yaklaşık 12 aydır ve bu hastaların yalnızca ~ %5'i tanı konulduktan sonra 5 yıl yaşayabilmektedir. GBM'lerde sistemik metastaz ile nadiren karşılaşılırken lokal metastaz sıklıkla görülür. Cerrahi müdahale sonrası, tümörlerin büyük kısmı çıkarılan bölgenin iki santimetrekare alan içerisinde nüks etmektedir. GBM'de cerrahi rezeksiyonun yararı normal sinir dokusuna zarar verme potansiyelindeki kısmın alınması ve hastalığın bir süre daha izlenmesine olanak sağlamasıdır. Glioblastomanın konumu dolayısıyla cerrahi rezeksiyon ile tümoral dokunun tamamı uzaklaştırılmamaktadır. Bu da tedavi sonrası hastalığın nüks etmesine yol açmaktadır. Ayrıca kemoterapi süresince kanser hücreleri çoklu ilaç direnci kazandığından tekrar eden glioblastomaların tedavisi daha da zorlaşmaktadır (Verkhatsky ve diğ., 2007) .

Glioblastomalar için en geniş kabul gören sınıflandırma; **kanserleşen hücrenin kökeni, evresi ve glioblastomanın konumu** referans alınarak yapılmaktadır. **Kanserleşen hücrenin kökenine göre;** ependimoma (ependimal hücrelerden köken alan), astrositoma (astrositlerden köken alan), oligodendrositoma (oligodendrositlerden köken alan) ve karışık glioblastomalar (farklı glia hücre tiplerinin karışımından köken alanlar) olarak sınıflandırılır. **Glioblastomanın ilerleme evresini** tanımlamada; hücresel yoğunluğun artması, nuklear

atipiler, hücrelerin mitotik durumları, çoğalma özellikleri göz önünde bulundurulur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasına göre glioblastomalar dört evrede incelenir. Evre I ve II' de hastalık çok ilerlememiş ve normal dokudan ayırt edilebilirken; evre III ve IV' te artan maligniteyle birlikte normal dokudan ayırt edilemeyen bir morfoloji gözlenir. **Glioblastomalar beyin zarının (tentorium) altında veya üstünde oluş konumuna göre ise** "supratentorial" ve "infratentorial" olmak üzere iki gruba ayrılır. Glioblastoma multiforme, astrosit kaynaklı tümörlerin en ileri evresindeki tiptir ve astrositomalar da 3 grup altında sınıflandırılır: evre 2 (astrositoma), evre 3 (anaplastik astrositoma) ve evre 4 (GBM). Yüzde 82'lik görülme sıklığıyla GBM en sık rastlanan astrositoma tipidir (Nagane ve diğ., 1999; Verkhatsky ve diğ., 2007).

### 1.1.1. Astrosit Farklılaşması ve Glioma Formasyonunun Oluşumu

Merkezi sinir sistemini (MSS) yapı ve fonksiyonunu hücresele düzeyde anlamada, iki paradigma öne çıkmaktadır. Bunlardan birincisi; enformasyonun tamamen nöronların üzerinden aktığı ve sinirsel fonksiyonların nöronlar arası etkileşim ile düzenlendiğini, glia hücrelerinin ise nöronlara besin ve destek sağladıklarını belirten "nöron paradigması" dir. Son yirmi yıldır kabul görmeye başlayan ve öne çıkan ikinci paradigma ise, glia hücrelerinin düşünülenden daha önemli olduğunu, nöronlarla sürekli dinamik etkileşim içinde olduklarını, nöronal metabolizmayı ve nöronlar arası iletişimi düzenledikleri, sinirsel fonksiyonların nöron-glia etkileşimleriyle oluşturulduğunu öne süren, glia hücrelerini beynin tamamlayıcı hücreleri olarak tanımlayan "glia paradigması" dir. Glia paradigmasına göre, MSS de nöronların çevresinde bulunan ve onlara destek sağlayan glia (nöroglia) hücreleri görev ve morfolojik özelliklerine göre astrositler, oligodendrositler, mikroglia ve ependim hücreleri olmak üzere dört grupta incelenir. Sayıca en fazla (glial hücrelerin ~%80'i) ve yıldız şekilleriyle karakterize olan astrositlerin birincil fonksiyonu, nöronlara besin ve destek sağlamaktır. Son yıllarda yapılan araştırmalar astrositlerin yeni sinir hücrelerinin üretimi, sinaptogenezin düzenlenmesi, sinapsların kontrolü, kan-beyin bariyerinin oluşturulması, hücrelerarası matrikste iyon dengesinin sağlanması, hafıza ve bilincin ortaya çıkması gibi önemli hücresele aktivitelerde görev aldıklarını göstermektedir (Verkhatsky ve diğ., 2007; Aggarwal ve diğ., 2011).

Son yıllarda multipotent özellikte ve kendini yenileyebilen nöroepitelial GBM kök hücrelerinin varlığı ile astrosit farklılaşmasının düzenlendiği gösterilmiştir. Bu kök hücrelerden salgılanan birçok uyarıcı molekül glia hücrelerinin farklılaşmasına yol açmaktadır. Bu uyarıcı moleküllerin başlıcaları; epidermal çoğalma faktörü (EGF), fibroblast çoğalma faktörü (FGF), trombosit kaynaklı çoğalma faktörü (PDGF), siliar nörotrofik faktör/lösemi inhibitör faktör (CNTF/LIF), kemik morfogenetik protein, interlökin 6 (IL-6) ve Sonic hedgehog (SHH) proteini'dir. EGF, FGF ve PDGF nöral progenitör hücreler için mitojen olarak rol oynamakta ve farklılaşma sürecinde nöral kök hücrelerin kendini yenileme kapasitesini arttırmaktadır. EGF sinyali aynı zamanda astrosit farklılaşmasını da tetiklemektedir. Sıçan nöral progenitör hücrelerinde EGF reseptörü'nün (EGFR) aşırı

sentezinin astrosit sayısında artışa yol açtığı ve nöral progenitör hücrelerinde EGFR sentezi olmayan sıçanlarda astrosit sayısının ve farklılaşmasının azaldığı gösterilmiştir (Kitchens ve diğ., 1994; van Heyningen ve diğ., 2001; Kornblum ve diğ., 1998).

### 1.1.2. GBM İnsidansı, Sınıflandırılması ve Moleküler Genetiği

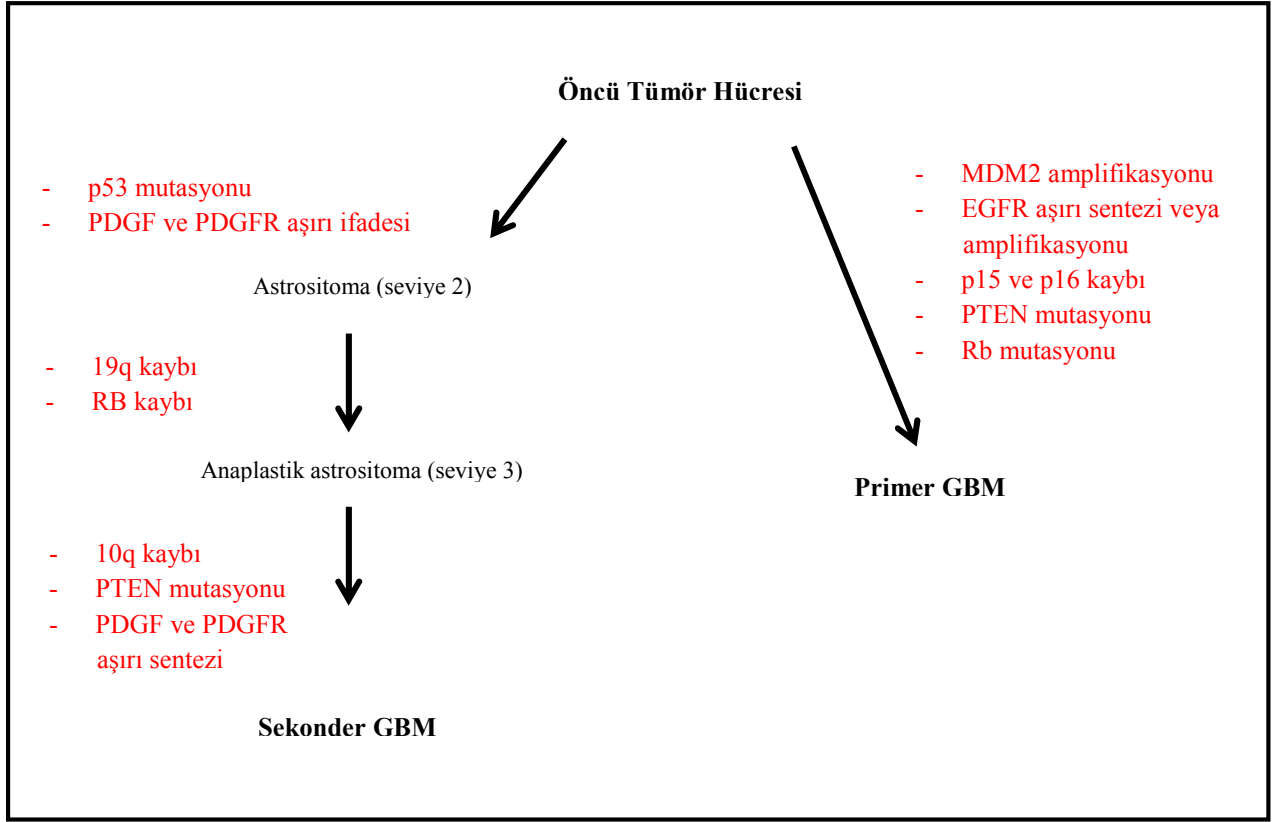
GBM %60 görülme sıklığıyla yetişkinlerde en sık rastlanan primer beyin tümörüdür. Yılda yaklaşık 10000-15000 arasında yeni GBM vakası ile karşılaşmaktadır. GBM insidansı yılda 100000 hastada 7.7 vakadır. Her yaş gurubunda görülebilmesine karşın GBM'ye genellikle yetişkinlerde rastlanmaktadır. 45 ve 70 yaş gurubu arası GBM'nin en sık rastlandığı aralıktır (Davis ve diğ., 1999).

GBM genel olarak tümörün genetik yapısı temel alınarak primer (vakaların %70'i) ve sekonder (vakaların %30'u) olmak üzere 2 sınıf altında incelenmektedir. Primer GBM'ler genellikle yaşça ilerlemiş bireylerde gözlenir. Birçok kanser türünde hücre bölünmesini teşvik eden bir reseptör tirozin kinaz olan proteinin kodlandığı EGFR geninin aşırı sentezlenmesi (tüm vakalarda %80) veya amplifikasyonu (tüm vakalarda %40) ile karakterize edilir (Galanis ve diğ., 1998; He ve diğ., 1995; Lang ve diğ., 1994). EGFR amplifikasyonu gözlenen primer GBM'lerde nedereyse hiç p53 mutasyonu gözlenmemesi dikkat çekicidir (Rasheed ve diğ., 1994). Primer GBM'lerin yaklaşık %10'unda p53'ün transkripsiyonel bir hedefi olan MDM2 (murine double minute 2) geninde amplifikasyon gözlenmiştir (Louis ve diğ., 1997). Primer GBM'lerdeki diğer genetik değişiklikler 12. kromozomdaki retinoblastoma (Rb) geninde mutasyon, 9. kromozomda p15 (CDKN2B) ve p16 (CDKN2A) kaybı ve 10. kromozomda PTEN (fosfataz ve tensin homolog) geninde mutasyon veya delesyondur. EGFR amplifikasyonu ve p15/p16 delesyonlarında bir ilişki saptanmış ve bu iki değişikliğin aynı anda görüldüğü ileri yaştaki hastalarda GBM'nin kötü seyretmesine yol açtığı gösterilmiştir (Kraus ve diğ., 2002). Yetişkinlerde ve çocuklarda görülen GBM'lerde genetik değişiklik motiflerinde farklılık bulunmaktadır. Çocuklardaki GBM'lerde EGFR veya MDM2 proto-onkogenlerinin amplifikasyonu ve p15/p16 delesyonu rastgele gözlenmektedir. Bu durumun yerine vakaların %50'sinde p53'te genetik değişiklik ile karşılaşılması ilgi çekicidir (Bredel ve diğ., 1999).

Sekonder GBM'ler genellikle genç popülasyonlarda düşük evreli gliomaların (WHO sınıflandırmasında evre 2 ve 3) ilerlemesi ile gözlenir ve GBM tümörlerinin %30'u bu sınıfa aittir. Sekonder GBM, p53 geninde mutasyon ve PDGF ligand ve reseptörünün aşırı sentezi ile karakterizedir. Bu iki basamak da sekonder GBM'lerin erken evresinde gerçekleşir. Bu değişiklikleri takiben 1, 9p, 13q ve 19q kromozomlarının kaybı gözlenir ve bu durumlar GBM'nin kötü seyirindeki majör süreç olarak bilinmektedir. Anaplastik astrositoma'dan (WHO seviye 3) sekonder GBM'ye (WHO seviye 4) geçiş kromozom 10q'nun kaybı (PTEN delesyonu) ile karakterizedir (Ohgaki ve diğ., 1995) (Şekil 1.1).

Primer - sekonder GBM'lerdeki bu farklılıklar göz önünde bulundurulduğunda ve gelişimin farklı evrelerindeki tümörlerinin bu derecede yüksek heterojeniteye sahip

olmasında genetik faktörlerle birlikte epigenetik faktörlerin ve düzenleyici RNA'ların da rol oynayabileceği düşünülebilir.



**Şekil 1.1:** Primer ve sekonder GBM tümörlerinde gözlenen genetik değişiklikler

### 1.1.3. GBM' de Tedavi Yaklaşımları

Tüm tümör tiplerinin tedavisi için kullanılan standart yaklaşımlar olan cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi GBM tedavisi için de geçerlidir. GBM tedavisinde cerrahi rezeksiyon (cerrahi yöntemle tümörü uzaklaştırma), tümörün nekrotik bölgeden çıkarılması ve bölgenin temizlenmesini kapsar. Tümörün konumu dolayısıyla oldukça zor uygulanan bu yöntemin yararları histolojik tanı için materyal elde edilmesi, tümör kütle etkisinin azaltılması ve sitoredüksiyondur (hücre sayısında azalma). GBM'de cerrahi rezeksiyon yararlı olmasına karşın bölgeden alınacak tümörün büyüklüğü tartışmalıdır (Hess ve diğ., 1999; Nazzaro ve diğ., 1990; Quigley ve diğ., 1991). Ayrıca literatüre bakıldığında cerrahi rezeksiyonun sağkalım süresini arttırdığına dair çalışma sayısı oldukça azdır. Son dönemde yapılan bir çalışmada 416 GBM hastası incelenmiş, cerrahi rezeksiyon ile tümör yoğunluğunun en az %98'inin alındığı kişiler ile lazerle kesim yöntemi kullanılarak tümörü alınan kişiler karşılaştırılmıştır. Cerrahi rezeksiyon ile tümörü alınan hastaların ortalama yaşam süresi 13.4 ay iken, bu oran lazerle kesim yöntemi kullanılan hastalarda 8.8 ay olarak bulunmuştur (Lacroix ve diğ., 2001). Sonuç olarak hastadan alınacak optimal tümör boyutu



hastanın genel ve nörolojik durumuna, tümörün yerleşimine, derecesine ve cerrahın tecrübesine bağlı olarak hesaplanmalıdır.

Kötü huylu gliomalarda cerrahi rezeksiyon sonrası radyoterapi etkisinin gösterildiği ilk çalışma 1976 yılında Brain Tumor Study Group (BTSG) veya diğer adıyla Brain Tumor Cooperative Group (BTCG) tarafından yapılmış randomize çalışmadır. BTSG, cerrahi rezeksiyon sonrası tüm beyine uygulanan radyoterapinin ortalama sağkalım süresini 37.5 haftaya kadar çıkardığını göstermiştir ve bu sonucun o dönemdeki konvansiyonel tedavi (ortalama sağkalım süresi 17 hafta) ve kemoterapi (BCNU, karmustin) (ortalama sağkalım süresi 25 hafta) ile kıyaslandığında anlamlı olduğu belirtilmiştir. Ardından, %90'ının GBM hastası olduğu çalışmada BCNU ve tüm beyine uygulanan radyoterapi birlikte denenmiş ve ortalama sağkalımın 40.5 haftaya çıktığı bulunmuştur (Walker ve diğ., 1978). Yeni tanı konmuş GBM hastalarında radyoterapi için standart radyasyon dozu 60 Gy'dir (Fulton ve diğ., 1992).

Son 20 yıl içerisinde radyasyon etkisini arttırmak için fraksiyonasyon (radyasyonu çoklu dozlarla uygulama), brakiterapi (radyoaktif kaynağı, tedavi bölgesinin yakınına koyma), üç boyutlu konformal radyoterapi ve stereotaktik yöntem gibi birçok strateji denenmiştir. Günümüzde ise GBM hastaları için tüm beyine uygulanan radyoterapinin yerini bölgesel radyoterapi almıştır. Tüm bu denemelere karşın ortalama sağkalım süresinde anlamlı bir değişiklik elde edilememiştir ve ne yazık ki günümüzde hastaların %90'ında primer radyoterapi uygulanan tümör bölgesinin 2 santimetre çapındaki alanda nüks görülmektedir (Hochberg ve diğ., 1980).

GBM hücrelerindeki düşük apoptotik cevap ve tümör içerisindeki hipoksik çevre nedeniyle radyoterapinin etki gösteremediği düşünülmektedir (Kerr ve diğ., 1994; Evans ve diğ., 2004). Radyasyon uygulaması sonrası glioma hücrelerinde Bax sentezinin arttığı veya Bcl-2 ve Bcl-XL sentezinin baskılandığı görülmektedir (Kraus ve diğ., 2000). Malign glioma hücrelerinde radyasyon sonrası p53, APAF-1 ve kaspaz-9'un eksojen transferi apoptotik cevabı arttıran stratejilere bir örnektir (Gomez-Manzano ve diğ., 1996; Lang ve diğ., 1998). Çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* kanser modellerinde radyasyonla indüklenen apoptozisin yabancıl-tip (wt) p53 ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmesine karşın GBM hücrelerinde p53'ün bulunup bulunmamasının radyosensitivitede önemli bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Haas-Kogan ve diğ., 1996; Barker ve diğ., 2001). Son zamanlarda, radyasyon ile tetiklenen GBM hücre ölümünde sitoplazmada asidofilik veziküller organellerin birikimi göze çarpmış ve bu ölümün otofaji ile olabileceği belirtilmiştir. wt-p53'e sahip GBM hücreleri radyasyona maruz bırakıldığında hücrelerin hücre döngüsünün G1 evresinde tutuklu kaldığı, birkaç hafta içerisinde ise tekrar bölünmeye başladıkları belirlenmiştir. Bu araştırmayla ilişkilendirilen klinik bir çalışmada ise GBM hastalarında radyoterapinin ardından 6-8 ay içerisinde tümörün tekrar geliştiği belirlenmiş ve hücre döngüsünde G1 evresinde tutuklu kalmanın bu duruma neden olabileceği ve radyasyona karşı gelişen dirençte rol oynayabileceği yorumu yapılmıştır (Haas-Kogan ve diğ., 1996; Yount ve diğ., 1996).

Standart tedavide kullanılan üçüncü yaklaşım da kemoterapidir. Kötü huylu beyin tümörlerinde en sık kullanılan ajanlar prokarbazin, nitrozürelere ve vinkristindir. Nüks eden gliomalarda oldukça etkili olduğu belirlenen alkilleyici bir ajan olan Temozolomid (TMZ; Schering-Plough), malign gliomaların tedavisinde bir adım öteye gidebilmeyi sağlamıştır. Ağızdan alınan TMZ neredeyse %100 biyoyararlanım ile emilebilmektedir (Newlands ve diğ., 1992). Kan beyin bariyerinden kolayca geçebilen TMZ, bu sayede serebrospinal sıvıya etkili konsantrasyonda ulaşabilmektedir. GBM hastalarının sağkalım süresini neredeyse yarı yarıya arttıran TMZ'nin hastaların %53'ünde klinik etki oluşturması dikkat çekmiştir. TMZ'ye karşı dirençteki en önemli rolü bir DNA tamir enzimi olan metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) 'ın oynadığı tespit edilmiştir. MGMT'nin TMZ bağımlı sitotoksistide belirleyici rol üstlendiği ve devamlı TMZ uygulamasının MGMT'de defektlere yol açtığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir. MGMT geninin promotör bölgesindeki metilasyonun TMZ uygulanan GBM hastalarında sağkalım süresini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Friedman ve diğ., 1998; Hegi ve diğ., 2004; Hegi ve diğ., 2005).

Kemoterapi etkinliğini azaltan en önemli faktör kan beyin bariyeridir. Kan-beyin bariyeri bu tümörlerle genel olarak bozulmamıştır fakat kan-tümör bariyeri birçok kemoterapötik ajanın etkili konsantrasyonda tümöre ulaşmasını engellemektedir. Kan-tümör bariyeri, doğası nedeniyle invazif özelliğe sahip olan GBM hücrelerinin perifere geçerek normal kan beyin bariyeri ile etkileşmesi ile oluşmaktadır. Kemoterapötiklerin intra-arteriyel olarak verilmesi de bölgede yüksek toksisiteye neden olarak tedaviyi sınırlandırmaktadır (Newlands ve diğ., 1992; Shapiro ve diğ., 1992; Dropcho ve diğ., 1998).

Standart terapilerin kombine edilerek uygulanması da son yıllarda yeni bir tedavi yaklaşımı olarak önerilmektedir. Bir kemoterapötik ajan ve radyasyon kombinasyonu, kemoradyoterapi olarak isimlendirilir. *In vitro* ve *in vivo* GBM modellerinde TMZ ve radyasyonun aditif veya sinerjistik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Wedge ve diğ., 1997; van Rijn ve diğ., 2000). TMZ ve radyasyonun etki mekanizması, TMZ'nin hücreleri radyosensitif faz olan hücre siklusundaki G2-M fazında tutuklu kalmaya sürükleyerek radyasyonun etkisini arttırmasıyla açıklanmaktadır (Hirose ve diğ., 2001). Kemoradyasyon yeni tanı konmuş GBM hastalarında standart tedavi olarak günümüzde uygulanmaktadır. Randomize yapılan klinik bir çalışmada TMZ kemoradyasyonunun, TMZ ve radyasyon uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında ortalama sağkalım süresini 3 ay ( $p < 0.0001$ ) kadar arttırdığı belirlenmiştir (Stupp ve diğ., 2004; Stupp ve diğ., 2005) .

#### **1.1.4. GBM'yi Araştırmada Kullanılan Model Hücre Hatları**

U-87 MG ve T98G hücre hatları, GBM'nin araştırıldığı *in vitro* çalışmalarda en yaygın kullanılan model sistemlerdir.

U-87 MG hücre hattı, 44 yaşında Kafkasya kökenli bir GBM hastasından 1966 yılında elde edilmiştir. Hücreler epiteliyal özellikte olup adherent hücrelerdir. Karakteristik olarak 44 kromozoma sahip hipodiploid hücrelerdir. Mutasyon analizleri sonucunda, 154 gende tek nükleotid varyasyonu, 178 gende küçük insersiyon/delesyonlar, 145 gende büyük

mikrodelesyonlar ve 35 gende interkromozomal translokasyonlar olmak üzere 512 genin homozigot mutant olduğu belirlenmiştir. 2010 yılında, Clark ve diğerleri bu hücre hattının genomik sekans analizini yapmıştır (Clark ve diğ., 2010).

T98G hücre hattı ise, 61 yaşında Kafkasya kökenli GBM beyin tümürlü bir hastadan 1979 yılında elde edilmiştir. T98G, yine kendisi gibi kökenini GBM'den almış T98 hücre hattının poliploid varyantıdır. Morfolojileri fibroblast hücrelerine benzemektedir. T98G hücreleri, hiperpentaploid hücreler olup, karakteristik olarak kromozom sayıları 128-132 arasındadır. Hücrelerin çoğunda N5, N7, N11, N13, N20, N21, ve N22 kromozomlarının 6 veya daha fazla sayıda kopyası bulunurken, X ve N15 kromozomlarının yalnızca birer kopyası bulunmaktadır (Stein ve diğ., 1979).

Çalışmalarda bu iki hücre hattının model sistem olarak seçilmesinin önemli nedenlerinden biri p53 genindeki mutasyon durumlarıdır. U-87 MG hücre hattında p53 geni yabancıl tip özellik gösterirken, T98G hücre hattında p53 geni mutant (237, Met →Ile) tiptedir (Clark ve diğ., 2007).

## **1.2. İyonize Radyasyon Kaynaklı DNA Hasarı ve Oluşan Hasarlara Tercihen Çalışan Tamir Yolakları**

Yaşamın devamlılığı, canlıların enerji döngüleri içerisinde sürekli olarak birbirleriyle ve çevre ile etkileşmelerine, süregelen değişikliklere uyum sağlamalarına doğrudan bağlıdır. Bu süreçte, canlıdaki hiyerarşik yapıda etkilenen birincil organize sistem ise hücrelerdir. Hücrelerin etkisi altında kaldıkları iç faktörlere örnek olarak normal metabolik süreç sırasında oluşan yan ürünler verilebilirken, dış faktörlere örnek olarak ise iyonize radyasyon ve kimyasal ajanlar verilebilir. Hücre içerisinde bu faktörlerin doğrudan hedefi DNA'dır ve sonuçta DNA hasarı meydana gelebilir. DNA 'da endojen veya eksojen olarak hasar oluşturan temel kimyasal reaksiyonlar hidroliz, oksidasyon ve alkilasyon reaksiyonlarıdır. Hücrelerde DNA hasarına doğru seviyede ve doğru zamanda cevap verebilecek birçok DNA hasar kontrol ve tamir mekanizması bulunmaktadır. Genel olarak DNA tamir mekanizmaları olarak adlandırılan bu yolaklar, çok çeşitli şekillerde meydana gelebilecek hasar çeşidini tanıyabilme ve tamir edebilme potansiyeline sahip, farklı hücresel ölçeklerde birbirleri tarafından da düzenlenebilen karmaşık bir organizasyona sahiptir. Bu yolaklar, oluşan DNA hasarına bağlı olarak aktive olurlar ve hasara uygun tamiri gerçekleştirirler. Bu kontrol ve tamir mekanizmalarına sahip olmayan veya bu mekanizmaları bir şekilde hasar görmüş olan organizmaların genomik bütünlükleri yüksek risk altındadır. Hücresel ölçekte hasarlı DNA'nın tam olarak tamir edilememesi genomik kararsızlık, apoptosis ve yaşlanma gibi organizmanın gelişim sürecini yakından ilgilendiren süreçleri etkiler. Daha da önemlisi genomik bütünlüğün bozulması bağışıklık sisteminde yetersizliklere, nörolojik hastalıklara ve kansere neden olabilir.

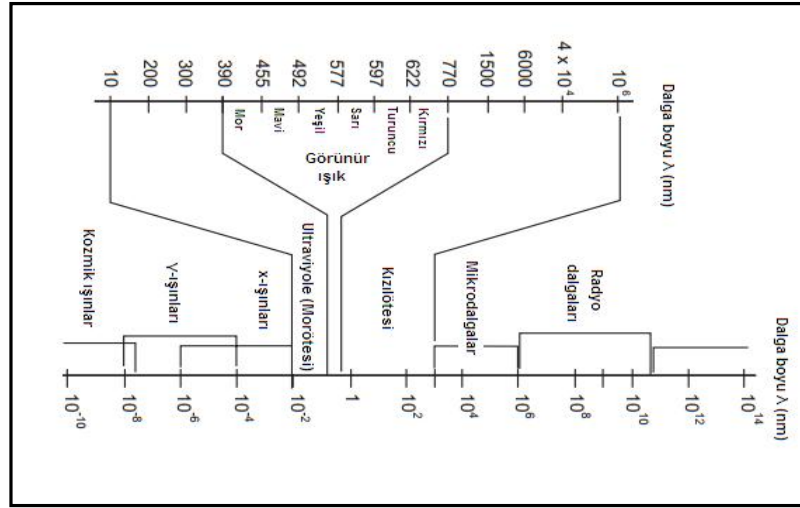
### 1.2.1. İyonize Radyasyon

Yaşamın oluşumu ve devamı enerjiye bağlıdır. Yeryüzündeki enerjinin kaynağı da güneştir. Bir kaynaktan ışın veya dalga formunda yayılan herhangi bir enerji çeşidi radyasyon olarak tanımlanır. Güneş dünyamızdaki radyasyonun birincil kaynağıdır ve canlı sistemler yaşamları boyunca değişen düzeylerde radyasyona maruz kalırlar. Bir atom veya bir molekülün sahip olduğu elektron sayısı değişmeden, elektronunun bulunduğu enerji seviyesinden bir üst düzeydeki enerji seviyesine çıkması “*uyarılma*” olarak adlandırılır. Canlılar dışarıdan radyasyona maruz kaldıklarında kendilerini oluşturan atom ve moleküllerinde bu uyarılma gerçekleşir. Radyasyon bir atom veya molekülün orbitalinde bulunan bir veya daha fazla elektronu fırlatabilecek yeterli enerjiye sahipse “*iyonize radyasyon*” (IR) adını alır. IR'nin karakteristik özelliği içerisinde yüksek miktarda enerji barındırmasıdır. Bir iyonizasyon olayında harcanan enerji yaklaşık 33 eV 'dir ve bu değer güçlü bir kimyasal bağı kırmak için gereken enerjiden çok daha fazladır. Örneğin, bir C=C bağı kırılmak için gereken enerji 4.9 eV 'dir (Hall, 1998).

IR, parçacık ve elektromanyetik olmak üzere iki alt sınıfta kategorize edilir. Parçacık tipi radyasyon elektron, proton, alfa-parçacıkları, döteron, negatif  $\pi$ -mesonlar ve ağır yüklü iyonlar gibi yüklü parçacıklarını içerir. Yüksüz olan nötronlar da parçacık tipi radyasyon sınıfına girer (Hall, 1998).

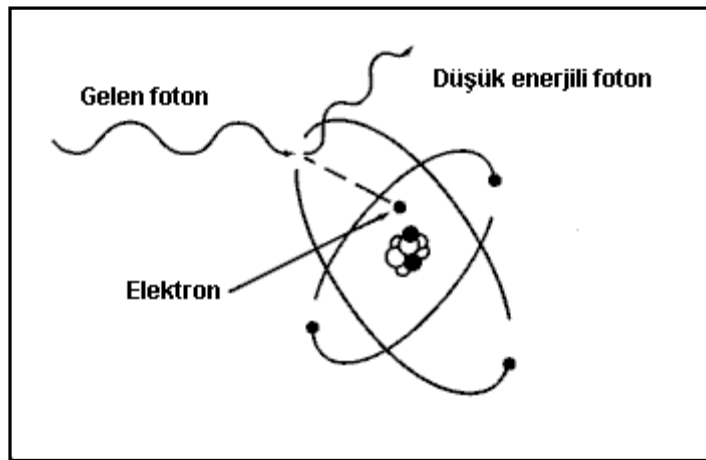
Elektromanyetik radyasyon x- veya  $\gamma$ - ışınları, radyo dalgaları, radar, radyan ısı ve görünür ışığı kapsar (Şekil 1.2). x- veya  $\gamma$ - ışınları, yapıları veya özellikleri açısından farklılık göstermezler. x- veya  $\gamma$ - ışınları arasındaki belirleyici fark söz konusu ışınları yaratan kaynaklardır. x-ışınları çekirdek dışında bulunan elektronlar tarafından üretilirken (ekstranükleer),  $\gamma$ - ışınları çekirdek içerisinde bulunan elektronlar tarafından üretilir (intranükleer). x-ışınları, elektronları yüksek enerji kazanmaları için hızlandıran ve aniden istenilen bir hedefte yavaşlatan, genellikle volframdan veya altından yapılan elektrikli aletler ile üretilmektedir. Bu sayede elektrondaki kinetik enerjinin bir kısmı x-ışınına dönüştürülür (Hall, 1998).

IR nicelik olarak röntgen, rad veya gray ile ifade edilir. Röntgen (R), normal koşullarda havanın 1 kg'ında  $2,58 \times 10^{-4}$  coulombluk elektrik yükü değerinde pozitif ve negatif iyonlar oluşturan x- ve  $\gamma$ - ışını miktarı olarak tanımlanır. Rad, ışınlanan maddenin 1 kg'ına  $10^{-2}$  joule'lük enerji veren radyasyon miktarıdır. Gray (Gy) ise, ışınlanan maddenin 1 kg'ına 1 joule'lük enerji veren radyasyon miktarıdır. Geçmişte radyasyon birimi olarak “rad” kullanılırken, son 30 yıldır bu tanımlamada “gray” kullanılmaktadır. Sonuçta 1 Gy, 100 rad'a eşittir (1 Gy=100 rad) (Hall, 1998).



**Şekil 1.2:** Elektromanyetik radyasyon çeşitleri

Biyolojik sistemlerde foton akışı veya enerji paketi olarak tanımlanan x- ve  $\gamma$ - ışınları benzer şekilde davranırlar. Bu ışınlar canlı organizmalar tarafından emildiklerinde, içerdikleri enerji dokular ve hücreler içerisinde birikir. Bu enerji, bir kimyasal bağı kolaylıkla kırabilecek ve zincirleme biyolojik olayların başlamasıyla sonuçlanabilecek çok sayıda enerji paketine düzensiz olarak ayrılır. Radyoterapide kullanılan yüksek enerjili radyasyon (100 keV- 25 meV) ile dokularda tetiklenen enerji birikimi “ Compton olayı (veya Compton saçılması) ” ile gerçekleşir. Bu olay, yüksek enerjili x- veya  $\gamma$ - ışınlarının fotonu ile karbon atomunun serbest elektronunun çarpışması sonucu elektronun ve fotonun saçılması ile açıklanabilir. Foton enerjisinin bir kısmı elektronlara kinetik enerji olarak aktarılır ve foton kalan enerjisiyle yönünden saparak yoluna devam eder (Şekil 1.3). Yüksek enerjili radyasyon kullanıldığında Compton olayı gerçekleşirken düşük enerjili radyasyon kullanıldığında fotoelektrik olay gerçekleşir (Tjong, 2009).



**Şekil 1.3:** Compton olayı

### 1.2.2. İyonize Radyasyonla İndüklenen DNA Hasar Çeşitleri

Radyasyonun keşfinden beridir süregelen çalışmalarda DNA, radyasyonun biyolojik etkisindeki temel hedef olarak belirtilmiştir. Radyasyon ile tetiklenen hücre ölümünde DNA'daki hasarlar sonucu oluşan mutasyonlar ve kromozomal bozukluklar, hücre ölümü, hücre farklılaşması ve karsinogenez gibi süreçlerde gözlenen en temel değişikliklerdir.

Radyasyon etkisi ile oluşan serbest radikallerin (1) bazıları modifiye etmesiyle ve (2) DNA tek zincir kırıkları oluşumu ile de DNA hasarı meydana gelebilir. Fakat radyasyonun hücre için en ölümcül etkisi (3) DNA çift zincir kırıkları oluşturmasıdır. 1 Gy radyasyon, DNA'da ortalama 1000 baz hasarı, 1000 tek zincir kırığı hasarı, 40 çift zincir kırığı hasarı oluşturmaktadır (Helleday ve diğ., 2007).

Radyasyon etkisi ile hücrelerde depolanan enerjinin çok büyük bir kısmı su tarafından emilir ve bu durum hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikalinin oluşmasına neden olur. Hidroksil radikali DNA ile etkileşerek baz modifikasyonu oluşumuna yol açar. Baz modifikasyonu ile 20'ye yakın baz hasar çeşidi ve baz kayıpları oluşabilir (Çizelge 1.1) (Te'oule, 1987; Nicoloff ve Hoekstra, 1996; Ward, 1998). Bu hasarların çok büyük kısmı baz kesip-çıkarma tamir (BER) yolağı üzerinden tamir edilir. Hücreler, radyasyonun dolaylı etkisi ile oluşan hasarlardan korunmak için bazı savunma sistemleri geliştirmiştir. Sülfidril grupları içeren glutatyon ve sistein gibi tiol bileşikler, serbest radikallerle etkileşerek onların hasar verme potansiyellerini düşürür. C, E vitaminleri ve manganaz süperoksit dismutaz da serbest radikalleri temizleyebilme kapasitesine sahip moleküllere örnektir (Tjong, 2009).

**Çizelge 1.1:** İyonize radyasyonla indüklenen baz değişiklikleri ve bu değişikliklerin görülme sıklıkları

Ürün	Molekül sayısı/10 <sup>5</sup> DNA bazı
Formamidopirimidin (FaPy) Guanin	34.4
8-hidroksiguanidin	23.3
5-hidroksihidantoin	23.2
Timin glikol	10.2
FaPy Adenin	10
8-hidroksiadenin	5.5
2-hidroksiadenin	4.9
5-hidroksisitozin	4.7
5,6-hidroksisitozin	4.1

Radyasyon, DNA'da tek zincir kırıkları oluşturarak da hasar meydana getirebilir. Tek zincir kırıkları, DNA bazlarında meydana gelen hasarların nükleotiddeki N-glikozidik bağın kaybına yol açması ve sonuçta abazik deoksiriboz birimlerinin oluşması ile meydana gelir (Sonntag, 1987; Ward, 1998). Bu tipteki DNA hasarlarının memeli hücreleri için öldürücü olmadığı birçok çalışma ile gösterilmiştir. 0 °C sıcaklıkta hidrojen peroksit ile muamele edilen memeli hücrelerinde DNA tek zincir kırığı olduğu fakat hücre ölümünün gerçekleşmediği tespit edilmiştir (Ward, 1985). Öte yandan hidroksil radikalının azaltıldığı ortamda DNA tek zincir kırıkları sayısının da azaldığı gözlenmiş ve bu radikalın DNA tek zinciri kırığı oluşumunda önemli rolü olduğu gösterilmiştir. İyonize radyasyon ile tetiklenen DNA tek zincir kırıklarının çok büyük bir kısmının baz kesip-çıkarma tamir mekanizması ve DNA ligasyon basamağında tamir edildiği bilinmektedir (von Sonntag, 1987).

İyonize radyasyon ile tetiklenen üçüncü ve hücre için en ölümcül olan DNA hasarı ise DNA çift zincir kırıklarıdır (DSB). Bu kırıkların büyük bir bölümü diğer etkilerde olduğu gibi hidroksil radikali oluşması ve bu radikalın DNA ile etkileşmesi ile meydana gelir. Bir hücrede iyonize radyasyonla oluşan DNA tek zincir kırığı sayısının çift zincir kırığı sayısına oranı yaklaşık 25'e 1 dir. Diğer hasarlara göre göreceli olarak daha az oluşsa da, tek bir DSB lezyonu genetik bilgide yaklaşık 100 milyon baz çiftinin kaybına neden olur (Helleday ve diğ., 2007). İyonize radyasyon ile karşılıklı iki DNA zincirinde de kırık oluşması, tamir için gerekli tamamlayıcı DNA dizisinin kaynak olarak kullanılmasını engellemekte ve tamiri zorlaştırmaktadır. Tamir edilemeyen veya hatalı tamir edilen DSB'ler, replikasyon ve transkripsiyon süreçlerinde bozukluklara, mutasyonlara ve kromozom anomalilerine, nihayetinde genomik kararsızlığın artmasına ve kansere yol açabilir (Pfeiffer ve diğ., 2000; Hoeijmakers, 2001; Willers ve diğ., 2004). Potansiyel olarak çift zincir kırıkları çok zararlı olmasına rağmen, immün sistem hücrelerinde DSB hasarları immüno globulin genlerinin olgunlaşması sırasında yeniden düzenlenmenin (V(D)J rekombinasyonu) başlatılmasında rol alarak biyolojik fonksiyon görür. Ayrıca DSB oluşumu mayoz sırasında homolog kromozomlar arasında genetik rekombinasyon için gereklidir (Jackson ve Jeggo, 1995). Hücrelerde DSB hasarlarının onarımı için evrimsel süreçte korunmuş iki farklı mekanizma (homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi) tanımlanmıştır.

### **1.2.3. İyonize Radyasyon Aracılı DNA Çift Zincir Kırıklarına Hücrenin Cevabı**

İyonize radyasyonun hücre üzerindeki ölümcül etkisi DNA çift zincir kırıkları oluşumu ile gerçekleşmektedir. DSB hasarlarına verilen hücresel cevabın başlatılması, MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) kompleksi tarafından DSB'nin kesilmesi ve oluşan tek iplikli DNA'nın RP-A (replikasyon proteini A) ile bağlanması ile gerçekleşir (D'Amours ve Jackson, 2002). Bu bağlanma hem DNA'yı olası yapısal ters dönmelerden ve oluşabilecek ikincil yapılardan korur; hem de ATM, ATR ve DNA-PK gibi cevabın oluşturulması için gerekli proteinlerin hasarlı bölgeye konuşlanmasını sağlar. MRN kompleksi, DNA üzerindeki DSB bölgelerine konuşlandığı ve bunu takiben PI3K ile ilişkili kinaz (PIKKs) ailesinden ATM'nin (Ataxia telangiectasia mutated) aktivasyonu gerçekleşir (Su, 2006). ATM'nin aktivasyonu,

dimer/oligomerlerin monomerizasyonu veya ATM yapısındaki Ser1981'deki fosforilasyon ile meydana gelir. Buna ek olarak DNA-PK (DNA bağımlı protein kinaz) ve ATR (ATM - RAD3 ilişkili proteini) de aktif hale gelir. Dakikalar içerisinde aktif ATM, ATR veya DNA-PK, DNA hasarına cevapta rol alan proteinleri fosforiller. Bu proteinlerin başında H2AX gelmektedir. Serin139'dan fosforillenen H2AX'e,  $\gamma$ -H2AX adı verilir. Bu fosforillenme, kromatinin yeniden düzenlenmesi işleminin başlamasını sağlar (Su, 2006).  $\gamma$ -H2AX floresan boyalarla boyanabildiğinden deneysel çalışmalarda DSB hasarının belirteci olarak kullanılabilir (Tjong, 2009). DSB bölgelerinde bulunan proteinlerin tamamı (MDC1, 53BP1 ve BRCA1) ATM'nin substratıdır (Su, 2006). Bu proteinler, homolog rekombinasyon yolağının düzenlenmesinde de rol alır. MDC1 ve 53BP1, tamirde rol oynayan proteinlerin MRN kompleksine bağlanmasında görevlidir. BRCA1 bulunmayan hücrelerde homolog rekombinasyon (HR) sırasında yanlış eşleşmelerin meydana geldiği ve genomik kararsızlığın indüklendiği gösterilmiştir. BRCA1, DSB formasyonun ardından H2AX bölgesine gelir ve aktive olur. BRCA2 ise özellikle Rad51'in DSB bölgesine gelmesini sağladığından önemlidir. ATR ise Claspin, RAD17, BRCA1 gibi proteinleri fosforilleyerek HR tamir yolağını indükler (Su, 2006; Tjong, 2009).

ATM, ATR ve DNA-PK G1/S fazı, S-fazı ve G2/M fazı kontrol noktaları için gereklidir ve genomik bütünlüğün korunmasında rol oynayan kritik moleküllerdir. ATM veya ATR'deki bozukluklar kendilerine has hastalıklar ile ilişkilendirilir. ATM mutasyonları otozomal çekinik bir hastalık olan Ataxia telangiectasia hastalığına; ATR mutasyonu ise yine otozomal çekinik bir hastalık olan Seckel sendromuna neden olur. ATM ve ATR ile kıyasla DNA-PK'ya ait bir hastalık olmaması dikkat çekici olmasına karşın; fare modellerinde yapılan araştırmalar DNA-PK'deki mutasyonların bağışıklık sistemi yetmezliğine yol açtığını göstermektedir (O'Driscoll and Jeggo, 2006).

#### **1.2.4. DNA Çift Zincir Kırıklarının (DSB) Onarımı**

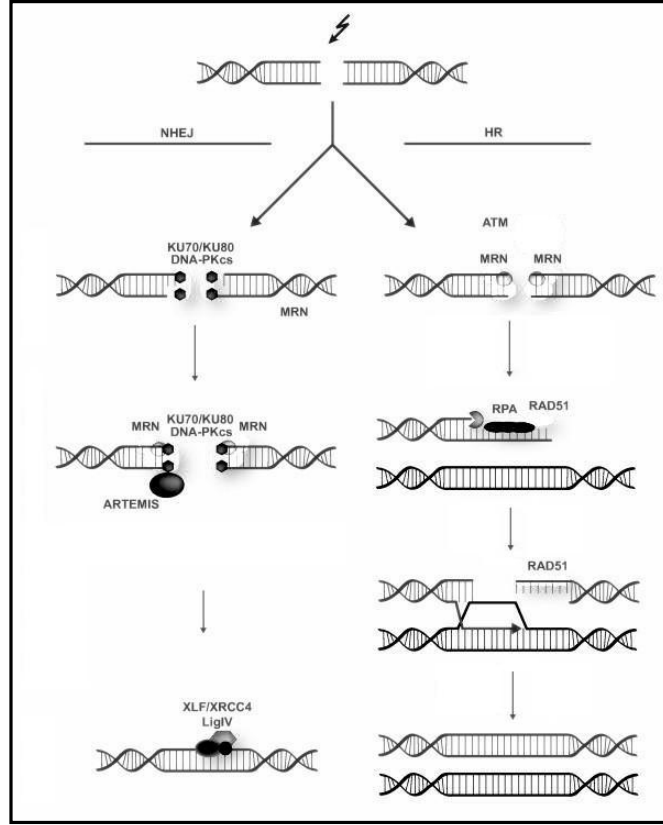
DNA'daki çift zincir kırıkları, homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) olmak üzere iki ana tamir yolağı ile onarılır. Bakterilerde ve mayalarda DSB'ler, tercihen HR ile onarılırken, memelilerde DSB'lerin %90'ından fazlası NHEJ ile onarılır (Krogh ve Symington, 2004).

HR onarım işleminde hasar tamiri, hücre döngüsünün S veya G2 fazlarında hasar görmemiş kardeş kromatidi veya homolog kromozomu kullanarak yapılır. Onarımın S veya G2 fazında gerçekleşmesinin nedeni, bu evrelerin kardeş kromatidin onarım için kalıp olarak kullanılabilir olduğu evreler olmasıdır. HR'de izlenen yol, hasarlı DNA'nın tamirinde, hasarlı olmayan DNA'nın kalıp olarak kullanılıp, doğru homolog dizinin eşleştirilmesidir. Memelilerde HR, Rad52 epitasis grubu proteinleri [Rad50, Rad51, Rad52, Rad54, NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome-1) ve MRE11 (Meiotic Recombination-11)] ile oluşturulan moleküler makine kompleksleri ile düzenlenir (Khanna ve Jackson, 2001).



HR'daki ilk basamak, Rad52 tarafından DSB'nin tanınması ve MRN (Mre11- Rad50-Nsb1) kompleksi ile 5'-3' yönünde hatalı bölgenin kesimi ile başlar. Rad52 proteinlerinden oluşan heptamerik halka kompleksi, tek iplikli DNA'nın 3' ucuna bağlanarak onu eksonukleolitik kesimlerden korur. Rad51 tek iplikli DNA'ya bağlanarak nukleoprotein filamenti oluşturur. RPA, Rad52, Rad54, BRCA1, BRCA2 ve diğer Rad52 ilişkili proteinler filament oluşumuna ve Rad51'in aktivitesini göstermesine destek sağlarlar. Sonuçta homolog rekombinasyonla tamirin moleküler makinası (Rad51 nukleoprotein filamenti) oluşturulur. Rad51 nukleoprotein filamenti ile kardeş kromatid üzerinde hasarsız homolog DNA dizisi bulunur. Homolog dizi bulunduğu, hasarlı DNA hasarsız DNA çift ipliğinin arasına yerleştirilir. DNA polimeraz (genellikle pol $\delta$ ), yerleştirilen DNA'nın 3' ucundan başlayarak doğru DNA dizisini sentezler. Ardından iplikler çözülür ve DNA ligaz 1 ile boşluklar kapatılır. Bu rekombinasyon işlemi ile DSB hatasız bir şekilde onarılmış olur (Şekil-4) (Khanna ve Jackson, 2001).

Diğer bir onarım mekanizması olan NHEJ isimli tamir mekanizmasında ise hasarlı DNA zincirinin uçları komplementer diziye homolog olup olmadığına bakılmaksızın doğrudan bağlanır. Tamir sisteminin endojenik hata üretim mekanizmasıyla da küçük delesyonların oluşumuna izin verilir. İlk aşamada, Ku70(XRCC6) ve Ku80(XRCC5) heterodimerik protein kompleksi, çift zincir kırığı oluşan DNA'ya sırasıyla yakın ve uzak uçlardan bağlanır ve onu eksonukleotik yıkımdan korur. Ku heterodimeri serin/treonin aktivitesine sahip olan DNA-PK'nın katalitik alt ünitesine bağlanır. XRCC4/ligaz 4 kompleksi kırık uçlara bağlanır ama aktif değildir. Aktivasyon için (kırık uçların enzimatik yolla birbirine bağlanabilmesi için) kırık uçların önceden modifiye edilerek hazırlanması gerekir. MRN kompleksi veya FEN1 (flap endonuclease 1) kırık uçlardaki ligasyona engel oluşturan kısımları uzaklaştırarak ligasyon işlemine olanak sağlar. Hasarlı bölgedeki NHEJ faktörleri, DNA-PKcs'nin otofosforilasyonu ve/veya DNA-PK bağımlı fosforilasyonu ile hasarlı bölgeden uzaklaştırılır. Bu işlemlerin sonunda bağlı olan XRCC4/DNA ligaz 4 kompleksi aktifleşir ve zincirleri komplementer uçlardan birleştirir (Şekil 1.4) (Lieber, 2010).



**Şekil 1.4:** DSB tamir mekanizmaları

DSB onarımı konusunda merak edilen önemli sorulardan biri, hücrenin hasarı hangi sistemle tamir edeceğinin seçimidir. Genel olarak uzlaşılan görüş, kalıp komplementer dizi kullanılabilir ve erişilebilir olduğu sürece onarımın HR üzerinden yapıldığı, aksi durumlarda ise NHEJ üzerinden yapıldığıdır. Örneğin; S fazında kardeş kromatid fiziksel olarak hasarlı bölgeye çok yakındır ve bu nedenle hasar HR ile onarılır. S ve G2 evreleri dışındaki evrelerde ise onarım NHEJ üzerinden gerçekleştiği söylenebilir (Lieber, 2010).

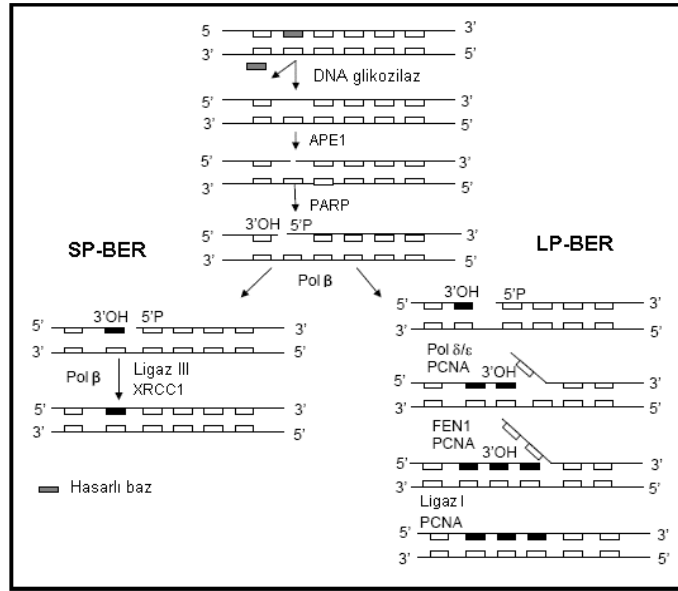
Homolog rekombinasyonda rol oynayan moleküllerden Rad51'in baskılanmasının, glioblastoma hücrelerinde radyasyona hassasiyeti arttırmak için kullanılacak bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir. Rad51'in düzenlenmesinde rol oynayan bir protein olan c-Abl'nin spesifik inhibitörü olan Gleevec kullanımı bu yaklaşım için güzel bir örnektir. Glioma hücre hatları Gleevec ile ön muamele edildiğinde hücrelerde radyasyona hassasiyetin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca BRCA1 ve DNA-PKcs'nin de bu hücrelerde radyasyon cevabını etkilediği bulunmuştur (Guido F, 2009).

### 1.2.5. Baz kesip çıkarma onarım (BER) mekanizması

DNA'da en sık gözlenen hata baz hasarlarıdır. Bunların tamiri BER mekanizması ile yapılır (Wilson ve Bohr, 2007). Bu mekanizma iki farklı şekilde gerçekleşir. Birincisi kısa-yamalı (short-patch) BER (SP-BER) olup sadece hasarlı olan nükleotid değiştirilir. İkincisi ise uzun-yamalı (long-patch) BER (LP-BER) olup hasarı kapsayan 2-13 nükleotidlik parça

değiştirilir. Her ikisinde ortak olan basamak, hasarlı bazın uygun bir N-glikozilaz (Ogg1 ve Mutyh gibi) tarafından uzaklaştırılmasıdır. Glikozilazlar ile hasarlı bazın uzaklaştırılması sonrası apürinik/apirimidinik (AP) bölge oluşur ve APE1 (APEX1) ile bu bölgede çentik oluşturularak AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu sağlanır. DNA N-glikozilazlar ayrıca AP liyaz aktiviteleriyle AP bölgedeki 3'-OH ucunda DNA omurgasını keserler ve bir sonraki adımda uygun nükleotidin yer alması için abazik deoksiribozu uzaklaştırırlar. PARP, DNA çentik sensörü görevi görür; doğru bazı sentezleyecek polimerazın çentiğin yakınına konuşlanmasını sağlar. PCNA proteini ise, bu reaksiyonların sağlıklı yürütülmesi için destek sağlar (Hakem, 2008).

Kısa-yamalı BER tamirinde daha sonra DNA polimeraz- $\beta$  uygun bazı bölgeye ekler ve hasarlı DNA zincirindeki boşluklar, XRCC1 (X-ray cross-complementing group 1) ve LigIII (Ligase III) enzimleri ile giderilir. Uzun-yamalı BER tamirinde ise DNA polimeraz  $\delta$  veya  $\epsilon$  uygun bazı bölgeye ekler. Ardından 5' endonükleaz ve 5'-3' ekzonükleaz aktivitelere sahip olan FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1), 2-13 nükleotidlik parçanın çıkartılmasını sağlar. Çentik Lig I ligaz ile kapatılır (Şekil 1.5) (Hakem, 2008).



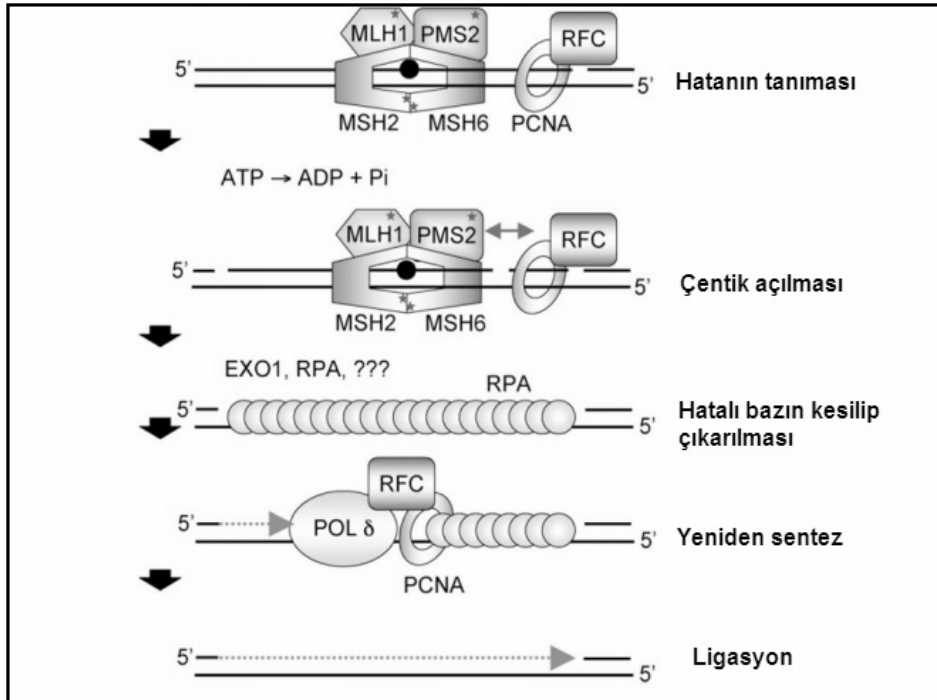
**Şekil 1.5:** BER mekanizması

Glioblastomalarda BER mekanizmasının alkilleyici ajanlara karşı direnç oluşumunda rol aldığını belirten çalışmalar bulunmaktadır (Guido, 2009). Bu mekanizmada rol alan enzimlerden biri olan PARP-1 baskılanmasının, glioblastoma hücre hatlarında TMZ'nin sitotoksik aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Glikozilazların aktif rol aldığı BER mekanizmasının baskılandığı hücrelerde sitotoksitede artış gözlenmiştir. MGMT tarafından tanınamayan N7-metilguanin ve N3-metiladenin kaynaklı DNA hasarlarının bu artışta rolü olduğu gösterilmiştir (Jann ve diğ., 2008).

### 1.2.6. Yanlış Eşleşme Onarım Mekanizması (MMR)

MMR mekanizması, DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşmiş bazların onarımını yapar. Bu mekanizma, *E.coli*'de ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. İnsanlarda da bu mekanizmada rol oynayan proteinlerin homologları bulunmasına karşın MMR mekanizması henüz ayrıntılı olarak açıklanmamıştır (Jiricny, 2006). Çizelge 1.2'de, *E.coli*'de ve ökaryotik organizmalarda MMR tamirinde rol oynayan enzimlerin görevleri ayrıntılı olarak verilmiştir (Hakem, 2008).

Yanlış eşleşme, MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ ) veya MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ ) ve MLH1-PMS2 (MutL $\alpha$ ) tarafından tanınır. Bu protein-protein / protein-DNA üçlü kompleks etkileşimleri ATP bağımlı olarak gerçekleşir. PCNA, MSH6 veya MSH3'ün PIP (PCNA-interacting protein) motifleri ile etkileşerek onarıma destek sağlar. PMS2'nin endonükleaz fonksiyonu ile ATP bağımlı olarak çentik açılır ve kesip çıkarma işlemi EXO1 ile gerçekleştirilir. Tek iplikli DNA, RPA ile kaplanarak korunur. DNA Polimeraz  $\delta$  ile bölgeye doğru baz eklenir ve ligasyon basamağıyla işlem tamamlanır (Şekil 1.6) (Martin ve diğ., 2010).



Şekil 1.6: MMR mekanizması

Son yıllarda, Çin hamster hücre hatlarında, insan lenfoblastoid hücrelerinde, kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarla *MSH6* inaktivasyonunun kemosenitivitede rol oynadığı gösterilmiştir (Cahill ve diğ., 2007).

Çeşitli kemoterapötiklerin MMR üzerindeki etkileri yaygın olarak araştırılmaktadır. İyonize radyasyonun MMR mekanizmasını etkileyip etkilemediği tartışmalıdır. MMR'nin, IR ile tetiklenen DNA hasarlarını tanımda ve hücre döngüsünün G2 fazında duraksamada rolü olduğuna işaret eden çalışmalar daha fazladır (Martin ve diğ., 2010).

**Çizelge 1.2:** MMR mekanizmasında rol alan tanımlanmış proteinler ve görevleri

<i>E.coli</i>	Görevi	Ökaryotlardaki Homologu	Görevi
MutS	Yanlış eşleşmelere bağlanır	MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ )	Tek baz yanlış eşleşmelerini ve 1-2 bazlık IDL*'leri onarır
		MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ )	Tek baz yanlış eşleşmelerini ve 2 bazdan büyük IDL'leri onarır
MutL	MMR'nin çoklu basamaklarını koordine eder, moleküllerin bölgeye konuşlanmasını sağlar	MLH1-PMS2 (MutL $\alpha$ )	MutS homologuna bağlanacak moleküllerin bölgeye konuşlanmasını sağlar
		MLH1-MLH2 (MutL $\beta$ )	Bilinmiyor
		MLH1-MLH3 (MutL $\gamma$ )	Bazı IDL'lerin oluşumunu engellediği düşünülüyor
MutH	Hasarlı hemi-metillenmiş zincirde çentik açar	Bilinmiyor	Bilinmiyor
$\gamma$ - $\delta$ Kompleksi	$\beta$ -clamp'i DNA bağlar	RFC kompleksi	PCNA'yı bağlar
$\beta$ -clamp	MutS ile etkileşerek tamire pozitif destek sağlar ve DNA polimeraz III'ün işlem hızını arttırır	PCNA	MutS ve MutL homologu ile etkileşir
Helikaz II	MutS ve MutL tarafından DNA'da oluşturulan çentiğe yüklenir ve tek zincirli DNA'nın kesimi için DNA'yı gevşetir	Bilinmiyor	Bilinmiyor
ExoI, ExoX	Tek zincirli DNA'da 3'-5' yönde kesip çıkarmada rol alır	EXO1(Rth1)	Çift zincirli DNA'da kesip çıkarma
RecJ	Tek zincirli DNA'da 5'-3' yönde kesip çıkarmada rol alır.	Pol $\delta$ 'nın 3'eksonükleaz	Tek zincirli DNA'da kesip çıkarma

		aktivitesi	
DNA pol III	Doğru bazı ekleyerek onarımı yapar	DNA polδ	Doğru bazı ekleyerek onarımı yapar
SSB	Baz kesip çıkarılmasında ve DNA sentezinin düzgün ilerlemesinde rol alır	RPA	Baz kesip çıkarılmasında ve DNA sentezinin düzgün ilerlemesinde rol alır
DNA ligase	DNA sentezi sonunda çentiği kapatır	DNA ligase	DNA sentezi sonunda çentiği kapatır

\* IDL: İnsersiyon-Delesyon loop

### 1.2.7. İyonize Radyasyon ile Tetiklenen Hücre Döngüsündeki Duraksama

Memeli hücrelerinde hücre döngüsü G1, S, G2 ve M olmak üzere 4 ana fazdan oluşur. Hücrelerin radyasyona karşı hassasiyeti de bu fazlara göre değişkenlik gösterir. Hücrenin radyasyona farklı duyarlılık düzeyleri, hücrenin durumu hakkında ön bilgiler sunar. Örneğin, hücrelerin radyasyona en hassas olduğu fazlar G2 ve mitotik evrelerdir. G1 evresinin normale göre uzaması, direnç oluştuğunu ima eder (Sinclair, 1968; Su, 2006).

Hücre döngüsünde bir fazdan bir sonrakine geçiş siklin bağımlı kinazların (Cdk) fosforilasyonu veya defosforilasyonu ile düzenlenir. Faz geçişlerindeki kontroller organizmalarda evrimsel süreçte korunmuş olmasına rağmen memeli hücrelerinde gözlenen çoklu basamaklar ve mekanizmalar henüz ayrıntılı olarak anlaşılammıştır. ATM, ATR ve DNA-PK bilinen en önemli faz geçişi kontrol proteinleridir. Bu proteinlerin hedef proteini olan p53, hücre için kritik kararın verilmesinde rol oynar. Hücre, hücre döngüsünde kalıcı olarak duraksayabilir, hücre döngüsündeki faz geçişlerinde geçici bir süre duraksayabilir ve son olarak hasar tamir edilemeyecek düzeyde ise de apoptozis üzerinden ölüme gidebilir (Ute ve Oleksi, 2003).

DNA hasar tamiri gerçekleşmez ise hücrenin yaşam döngüsü duraksayabilir. Duraksamayı tetikleyen ilk olay aktive olmuş ATM ve ATR'nin, sırasıyla Chk1 (checkpoint kinase 1) ve Chk2'yi (checkpoint kinase 2) fosforile ederek aktifleştirmesidir. Aktive olan Chk1 ve Chk2, CDC25A'yı (cell division cycle 25 homolog A) fosforile ederek bu molekülün yıkımını başlatır (Su, 2006). CDC25A'nın kaybı CDC45'in (cell division cycle 45 homolog) replikasyon orjinine yetersiz bağlanmasına ve G1/S geçişinde duraksamaya neden olur. Buna ek olarak, aktive olmuş ATM, ATR, DNA-PK, Chk1 ve Chk2 p53'ün fosforilasyon ve aktivasyonuna yol açar. ATM, p53'ü 15. serin birimleri başta olmak üzere birçok bölgesinden fosforilleyerek aktive eder. Tüm tümör tiplerinde %40 mutasyona uğramış olan p53, DNA hasar kontrolünde anahtar niteliğinde bir proteindir. Aktive olmuş p53, G1/S geçişini teşvik edici iki siklin bağımlı kinaz olan CDK2 ve CDK4'ü baskılayan p21'i transaktive eder. Bu durum G1 fazından tutuklu kalmaya neden olur ve hasarlı DNA'nın replike olmasını engeller (Su, 2006). Öte yandan p53, Mdm2 tarafından düzenlenmektedir. Mdm2, p53'ün amino ucuna bağlandığında onu ubiquitinasyon için hedef hale getirir ve yıkımına neden olur. Mdm2'nin baskılandığı hücrelerde aşırı p53 artışına bağlı olarak ölüm gerçekleşirken, p53 ve

Mdm2'nin birlikte baskılandığı hücrelerin canlılığını sürdürdüğü gösterilmiştir (Ute ve Oleksi, 2003).

Hücre içerisinde duraksamaya yol açan paralel bir mekanizma da p53 ve p21 üzerinden yürütülür. p21, siklin bağımlı kinazları baskıladığından G1/S faz geçişi için gerekli olan temel proteindir. p53 ise bir transkripsiyon faktörü olarak görev alarak p21'i doğrudan düzenler. p21, bir yandan siklin D ve siklin E ile ilişkili kinazları baskımlarken diğer yandan da DNA replikasyonu için gerekli olan proliferatif hücrelerel nuklear antijeni (PCNA) baskılayarak hücrelerin S fazına geçmesini önlemiş olur (Su, 2006). Radyasyon sonrası tetiklenen G1/S faz geçişinin hücre yaşamına etkisi olmadığı belirlenmiştir (Lee, 1993).

Hücre döngüsünün S ve M fazlarındaki duraksamalar G1/S faz geçişindeki duraksama kadar iyi anlaşılammış olsa da bu süreçlerde de benzer moleküllerin rol oynadığı gösterilmiştir. Hücre döngüsünün S fazında gerçekleşen duraksama, radyasyon aracılı DNA hasarlarının tamir edilemeyecek kromozomal kırıklar oluşturmasını önlemek için önemlidir ve DNA'nın replikasyon sırasında tamir edilmesi sürecini içerir. G2/M fazında ise amaç, replikasyon sonrası oluşabilecek genomik hasarların önlenmesidir. Erken S fazı duraksamasında ATM'nin, geç S fazı duraksamasında ise ATR'nin rol oynadığı gösterilmiştir. ATM sentezlemeyen hücrelere radyasyon uygulandığında, hücrelerin her iki fazda da duraksamaya gitmeyerek radyasyona dirençli bir fenotipik özellik gösterdikleri belirtilmiştir. Her iki duraksamada da G1/S fazındaki duraksamaya benzer süreçlerin işlediği görülmektedir. Etkili bir radyasyon cevabının oluşturulması için Chk1 ve Chk2'nin ATM tarafından fosforillenmesi, ardından CDC25A yıkımı ve dengeli olarak p53 sentezi sağlanması bu süreçler için gerekli olaylardır (Tjong, 2009).

## **1.2.8. İyonize Radyasyon ile Tetiklenen Hücre Ölüm Tipleri**

### **1.2.8.1. Apoptozis**

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozis, çok hücreli organizmalarda embriyonik gelişim, bağışıklık sistemi ve doku homeostazının korunması için gerekli fizyolojik bir olaydır. Apoptotik mekanizmalardaki bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar, ototimmunité ve kanser gibi çok sayıda patolojik durum ile ilişkilendirilmiştir. Memeli hücrelerinde apoptozis, kaspazlar olarak da bilinen sistein proteaz ailesi üyeleri ile gerçekleştirilir. Hücrede pro-kaspaz formunda bulunan kaspazlar, oligomerizasyon ile aktive olurlar. Aktive olmuş efektör kaspazlar, hücreyi apoptozise götürecektir olan bir seri biyokimyasal ve morfolojik değişikliğe neden olurlar. Kaspazlar, intrinsik veya ekstrinsik apoptotik yollar ile tetiklenirler ve pro-apoptotik/anti-apoptotik moleküllerdeki artış ve aktivasyon ile apoptozisin düzenlenmesinde rol alırlar. Hücrelerin apoptozise yönlendirilmesinde çok sayıda iç ve dış faktör rol oynar (Elmore, 2007). Bu faktörlerden biri iyonize radyasyondur.

### 1.2.8.1.2. İyonize Radyasyon Aracılı Apoptozis

Radyasyona (farklı şiddet ve sürelerde) maruz bırakılan hücreler, DNA hasarına bağımlı / bağımsız olarak, hücre döngüsünün farklı evrelerinde (pre-mitotik / post-mitotik) apoptozise gidebilirler.

DNA hasarı-bağımlı apoptoziste (intrinsik apoptozis), hücre mitokondri üzerinden kaspazlar aracılığıyla apoptozise sürüklenir (Elmore, 2007). Radyasyon, toksinler, hipoksi ve serbest radikaller gibi DNA-hasarını tetikleyen etkenler iç-mitokondriyal membran potansiyelini azaltıp pro-apoptotik proteinlerin sitosole salgılanmasını sağlayabilir (Saelens ve diğ., 2004). Bu proteinlerin ilk grubu olan sitokrom-c, Smac/DIABLO ve Htra2/Omi proteinleri kaspaz bağımlı mitokondriyal apoptozisi aktive ederler (Du ve diğ., 2000). Ayrıca sitokrom-c, Apaf-1'e ve pro-kaspaz 9'a bağlanıp apoptozom kompleksini oluşturur (Chinnaiyan, 1999). Smac/DIABLO ve Htra2/Omi ise, apoptozisi baskılayan proteinleri baskılayarak apoptozisi indükler. Mitokondriden salınan ikinci grup pro-apoptotik proteinler ise AIF, endonukleaz G ve endonukleaz CAD'dır. Bu proteinlerin salınımı apoptozisin geç fazlarında olur ve iki yolla DNA fragmentasyonu gerçekleşir. İlk yolda AIF, DNA fragmentleri (yaklaşık 50-300 kb) oluşumuna ve kromatin kondensasyonuna neden olur (Joza ve diğ., 2001). Endonukleaz G ise, nuklear kromatini keserek oligonukleozomal DNA fragmentleri oluşturur (Li ve diğ., 2001). İkinci yolda ise kaspaz-3 tarafından kesilen CAD, doğrudan oligonukleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Enari ve diğ., 1998).

Bcl-2 ailesi üyeleri, apoptotik süreçteki mitokondriyal olayları kontrol eder ve düzenler. Bcl-2 ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirerek pro-apoptotik veya anti-apoptotik cevap oluşturabilir (Cory ve Adams, 2002) . Bu protein ailesinin düzenlenmesi ise p53 üzerinden olur (Schuler ve Green, 2001).

DNA hasarından-bağımsız apoptozis (esktrinsik apoptozis), hücre membranında bulunan ve tümör nekroz faktör (TNF) süperailisi üyeleri olan ölüm ligandları ve reseptörleri ile tetiklenir. Bu ölüm ligand ve reseptörlerinden en iyi tanımlananları FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'tir. TNF reseptör ailesi üyelerinin hepsi, ölüm reseptörleri olarak adlandırılan sisteince zengin ekstraselüler domaine sahiptir. Bu domainler ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi yollara iletilmesini sağlar (Locksley ve Killeen, 2001).

Ekstrinsik apoptozis yolağı reseptöre bağlanma ve kaspaz-8 aktivasyonu basamaklarını içerir. Ligand bağlandığında, reseptöre bağlı olan sitoplazmik adaptör proteinler (ölüm domainleri) aktifleşir. Örneğin; Fas ligandının reseptöre bağlanması Fas-ilişkili ölüm domaini (FADD) proteininin, TNF ligandının reseptöre bağlanması TNF reseptör ilişkili ölüm domaininin (TRADD) aktifleşmesini sağlar. Ardından adaptör proteinler dimerize olur ve prokaspaz-8 ile etkileşir. Sonuçta pro-kaspaz 8'in otokatalitik aktivasyonu gerçekleşir apoptozis tetiklenir (Kischkel ve diğ., 1995).

Radyasyona maruziyet ile oluşan DNA hasarına bağımlı apoptozis hücre döngüsünün farklı evrelerinde (pre-mitotik, post-mitotik) gerçekleşebilir (Shinomiya, 2001).



Hücre bölünmesinden önce gerçekleşen pre-mitotik apoptozis S fazında gerçekleşir, kaspaz-3'ün hızlı (1 saatten az sürede) aktivasyonu ile başlatılır ve mitokondriyal membran potansiyeli düşer. Hücrelere yüksek dozda (hücre hatlarında 20 Gy) radyasyon uygulaması genellikle pre-mitotik apoptozis ile ilişkilendirilir. Pre-mitotik apoptozis, hücre ölümünün daha hızlı gerçekleştiği tiptir. Shinomiya ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, kaspaz-3 aktivasyonunun pre-mitotik apoptoziste çok hızlı gerçekleştiği gösterilmiştir (Shinomiya ve diğ., 2000).

En az bir hücre bölünmesinin ardından hücrelerin apoptozise (post-mitotik) uğraması ikinci bölünmenin G2/M fazından sonra gerçekleşir. Radyasyon sonrası ilk bölünmede, G2/M fazında hücre döngüsü duraksayabilir fakat kaspaz aktivasyonu gerçekleşmediğinden hücre ölüme gitmez. Düşük doz radyasyonun (hücre hatlarında 5 Gy) post-mitotik apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Shinomiya ve diğerlerinin yaptığı aynı çalışmada hücreler, 5 Gy radyasyona maruz bırakılmıştır ve kaspaz-3 inhibitörünün eklendiği hücrelerde apoptozis oranının değişmediği bulunmuştur (Shinomiya ve diğ., 2000).

### 1.2.8.2. Otofaji

Otofaji, apoptozise benzer şekilde, fizyolojik şartlar altında gerçekleşen bir hücre içi olaydır. Doku veya organizmada enerji yetmezliği durumunda bu mekanizma aktive edilir ve doku veya organ bütünlüğüne katkı sağlanır. Örneğin; bozulmuş veya görevini yerine getiremeyen organellerin, uzun süre kullanılmış proteinlerin ve patojenlerin lizozomlarda yıkımı otofaji ile gerçekleşir. Otofajik hücre ölümünün apoptozisten farkı, organellerin lizozomlarda yıkılmasındaki artışa bağlı olarak hücrenin ölüme sürüklenmesidir. Ancak otofaji, normal fizyolojik şartların dışında çeşitli etkenlerle de uyarılabilir. İyonize radyasyonun bu uyarılardan biri olduğu son yıllarda gösterilmiştir (Kiang ve diğ., 2010).

Hücre içi yapıların lizozomlara hangi yolla taşındığına bağlı olarak otofaji farklı oluş biçimleri vardır; (1) mikrootofaji, (2) şaperonlar aracılı otofaji ve (3) makrootofaji (Kiang ve diğ., 2010).

Mikrootofaji, lizozom membranının içe çökmesi ile sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan yıkılmasıdır. Şaperonlar aracılı otofaji ise Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) motifli proteinlerin lizozom zarına seçici biçimde taşınması ile gerçekleşir (Arslan ve diğ., 2011).

Makrootofaji (mAG) patolojik durumlarda otofajinin en sık gözlenen formudur. mAG, sitoplazmanın parçalarının ve organellerin çift zarlı vakuollerde paketlenmesi ve yıkım için lizozomlara veya endozomlara taşınmasını sağlayan otofagozom oluşumu ile karakterizedir. Çok basamaklı bir süreç olan mAG'deki diğer bir basamak, LC3-I'in (hafif zincir protein 3 tip I), redoks duyarlı Atg4 serin proteazla veya Atg7 ve Atg3 ile tip II'ye (LC3-II) dönüştürülmesidir. LC3, Atg4, Atg7, DRAM (DNA hasarıyla-indüklenen otofaji düzenleyici proteinin) ve DAPK1 (ölüm ile ilişkili protein kinaz 1) proteinleri mAG çalışmalarında belirteç olarak kullanılmaktadır (Kiang ve diğ., 2010).

İyonize radyasyonun hücrelerde mAG'ı tetiklediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Radyasyonun hücrede serbest radikaller üreterek, mAG'ı aktive ettiği bilinen, DRAM, DAPK1, Atg4 ve LC3-II proteinlerini aktive ettiği gösterilmiştir (Kiang ve diğ., 2010).

### 1.2.8.3. Nekrozis

Hücre ölüm tiplerinden bir diğeri olan nekrozis, belli bir organizasyon göstermeyen ve hücre membranının bozulması, organel degradasyonu ve hücrede şişme gibi kendine özgü belirgin morfolojik özellikler içeren travmatik bir hücre ölümü sürecidir. Nekroz genel olarak enfeksiyon, inflamasyon ve iskemi (belli bir bölgede kan akımının kesilmesi) gibi patofizyolojik durumlarda gözlenir (Tjong, 2009).

## 1.3. Trabectedin Kaynaklı DNA Hasarı ve Oluşan Hasarlara Tercihen Çalışan Tamir Yolakları

Trabectedin'in etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır fakat sitotoksik etkisini birincil olarak DNA'da oluşturduğu hasarlar üzerinden gösterdiği bilinmektedir.

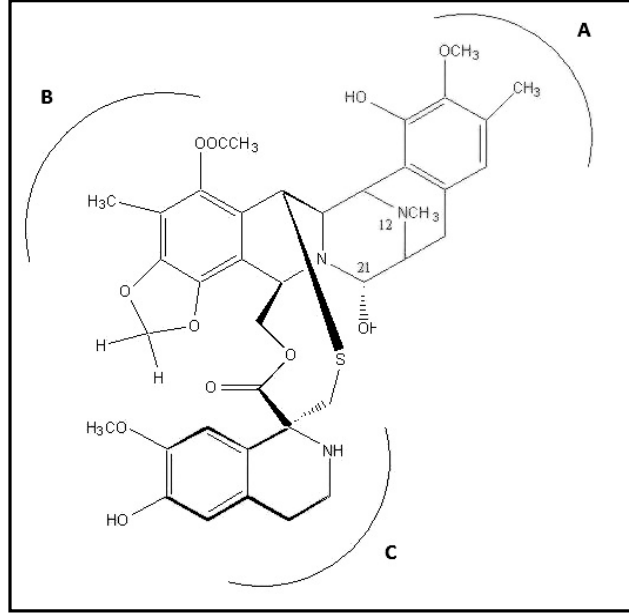
### 1.3.1. Trabectedin (Yondelis, Ecteinascidin 743, ET-743)

Ulusal Kanser Enstitüsü'nün 1950'li yıllarda başlattığı "bitkisel ve denizel kaynaklı antikanser madde tarama çalışmaları" kapsamında, Karayip Denizi'nde yaşayan bir tunikat olan *Ecteinascidia turbinata*'nın (Deniz Fıskiyesi) etanolik ekstraktında yüksek anti-kanser aktivite belirlenmiştir. Ardından bu tunikatın içeriğindeki aktif maddelerin belirlenmesine yönelik çalışmalar başlamıştır. KL Rinehart, deniz fıskiyelerini toplamış ve *Ecteinascidia turbinata* ekstraktının içerdiği etken maddeleri belirlemeye yönelik çalışmalar yapmıştır. Ekstraktın içeriğinde belirlenen maddeler arasında en aktif olanı, günümüzdeki ismiyle Trabectedin'dir. Trabectedin'in kimyasal yapısı, 1984 yılında Rinehart tarafından ortaya konmuştur (Rinehart, 2000).

İspanyol PharmaMar şirketi 1994 yılında Trabectedin'in lisansını almış ve üretimi için deniz fıskiyelerini kültüre etmeye başlamıştır. Bir ton tunikattan ancak 1 gram Trabectedin elde edilebilmesi, şirketi Trabectedin'in sentetik veya yarı-sentetik üretimi için çalışmaya zorlamıştır. E.J. Corey ve grubu, 1996 yılında Trabectedin'i sentetik olarak üretmeyi başarmıştır. Aynı grup, daha sonraki yıllarda Trabectedin'i yarı-sentetik olarak da üretebilmiştir. PharmaMar şirketi günümüzde Trabectedin'in satışını Johnson&Johnson firması üzerinden, "Yondelis" adıyla yapmaktadır. Trabectedin, Avrupa birliği ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından yumurtalık kanserlerinde ve yumuşak doku sarkomlarında kullanılmak üzere onay almıştır ve prostat ve meme kanserlerinde faz II çalışmaları devam etmektedir. ((Maurizio ve Galmarini, 2010).)

Trabectedin molekülünün kimyasal yapısına bakıldığında üç tane tetrahidroizokinolin halkasına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 1.7). A ve B halkaları, tek köprülü pentasiklik

iskeletle birleşmiştir. C halkası ise A ve B alt ünitelerine benzilik sülfid bağının oluşturduğu lakton köprüsü ile bağlanır. A ve B halkalarının DNA'nın küçük oluğu ile etkileşime girdiği, C halkasının ise transkripsiyon faktörleri ve DNA tamir enzimleri gibi moleküllerle etkileştiği bilinmektedir (Gago ve Hurley, 2002).



**Şekil 1.7:** Trabectedin'in kimyasal yapısı

### 1.3.2 Trabectedin ve Kan Beyin Bariyeri

Glioblastomalarda kemoterapötiklerin etkinliğini azaltan önemli bir faktör kan beyin bariyeri (KBB) dir. KBB'deki kılcal damarlardan doku içine madde geçişi birkaç yolla kontrol edilir. Birincisi, endotelial hücreler arası bağlantı moleküllerinin oluşturduğu fiziksel bariyer veya geçirgenliktir. Hücreler arası madde geçişi, bağlantı moleküllerinin izin verdiği ölçüde gerçekleşir. İkinci yol ise, endotelial hücrelerin hücre zarına yerleşmiş olan ve enzimatik pompa görevi gören P-glikoproteini (P-gp), çoklu ilaç direnci proteinleri (MDR) ve meme kanseri direnç proteini (BCRP) gibi taşıyıcı proteinler ile kontrol edilir. Kullanılan kemoterapötik ajan bu proteinlerden birinin substratı değil ise KBB'den geçemez ve dolayısıyla tümör hücrelerine etkin dozda ulaşamaz (Chen ve diğ., 2012).

Beumer JH ve diğ.leri, Trabectedin'in P-gp substratı olduğunu ve bu sayede KBB'den geçtiğini göstermiştir (Beumer ve diğ., 2007).

### 1.3.3. Trabectedin - DNA etkileşimi

Trabectedin birçok çalışmada alkilleyici ajanlar ve DNA'da çapraz bağlantı oluşturan ajanlar sınıfları altında incelenmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan alkilleyici ajanlar (örn: cisplatin) genellikle DNA'nın büyük oluğundaki N7 veya O6 pozisyonundaki guaninlere

bağlanmaktadır. Trabectedin ise, DNA heliks yapısının küçük oluğundaki guaninlerin N2 pozisyonundaki amino gruplarına bağlanarak G-C'ce zengin dizileri alkiler ve DNA'yı büyük oluğa doğru bükür. Ayrıca, A ve B halkaları ile komşu dizideki nükleotidlere Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları ile bağlanarak, iki DNA zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur (Gago ve Hurley, 2002).

Trabectedin'in etkisinde DNA ile etkileşimlerinde açıklığa kavuşturulan mekanizmalar şunlardır: (1) alkilasyon ile DNA'da baz hasarlarına ve çapraz bağlanmalara yol açarak, DNA'ya bağlanan proteinlerin görevlerini yapmasını engeller. Bu durum, DNA replikasyonu ve transkripsiyon gibi süreçlerin başlayamamasıyla sonuçlanır. (2) DNA'da çapraz bağlantılar oluşturarak, devam eden replikasyon çatalının ilerlemesinde görev alan birçok proteinin (örn: topoizomerazlar) görevini yerine getirememesine ve sonuçta replikasyonun duraksamasına neden olur. (3) DNA'da oluşturduğu hasarlar sonucu devreye giren onarım mekanizmalarında, onarımda rol alan proteinlerle doğrudan etkileşerek bölgeye bağlanmalarını engeller (Herrero ve diğ., 2006).

### **1.3.3.1. Trabectedin ile Tetiklenen DNA Hasarlarının Tamirinde Rol Alan Mekanizmalar**

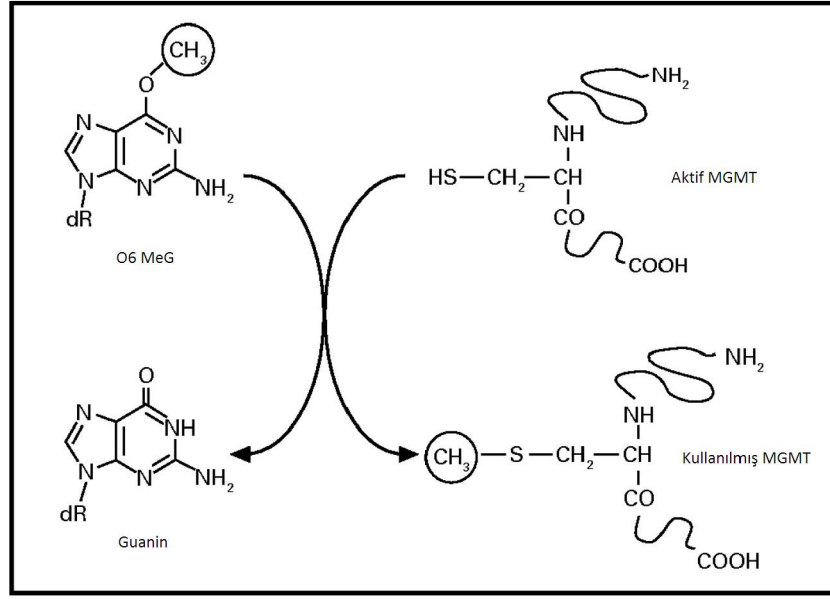
Trabectedin'in DNA'da alkilasyon, baz hasarları ve zincir içi/zincirler arası çapraz bağlantılar oluşturarak etki ettiği bilinmektedir. Trabectedin ile tetiklenen bu hasarlar, hücrede sırasıyla "DNA hasarının doğrudan geri çevrilmesi, Baz kesip-çıkarma onarım mekanizması ve Nükleotid kesip-çıkarma onarım mekanizması ile ilişkilendirilebilir. Yapılan çalışmaların çoğunda Trabectedin'in NER mekanizmasında hasar oluşturarak etkisini gösterdiği belirtilmiştir. Trabectedin'in etkisinde BER mekanizması ve hasarın doğrudan geri çevrilmesi mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

#### **1.3.3.1.1. DNA Hasarının Doğrudan Geri Çevrilmesi**

DNA hasarının doğrudan geri çevrilmesi yoluyla tamir mekanizması, diğerleri ile kıyasla çok basamaklı değildir ve çok sayıda protein etkileşimi gerektirmez. Glioblastoma tümörlerinde bu mekanizma ile onarılan hasarların en önemlisi guaninin 6. oksijen atomundan alkillenmesi ile oluşan O<sup>6</sup>-alkilguanin'dir. Bu hasar tamir edilmediği takdirde nokta mutasyonları ve kromozom anomalileri oluşturabilir. Alkilleiyici ajanlar guanine metil veya etil grupları ekleyerek bu bazın DNA replikasyonu sırasına sitozinle eşleşmesini engelleyebilirler (Sedgwick ve diğ., 2007). DNA'daki O<sup>6</sup>-alkilguanin hasarı, O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) ile onarılır. MGMT, guanine bağlı pro-mutajenik alkil gruplarını kendi sistein akseptör bölgesine transfer ederek guaninde oluşabilecek mutasyonları engelleyen bir enzimdir. Alkil grubunun transferi sonrasında MGMT'nin aktif bölgesi yenilenemez ve proteinin alkillenmesi sonucu ubiquitinasyon işlemi ile enzim yıkıma uğrar. Bundan dolayı bu mekanizma "intihar mekanizması" olarak da bilinir (Şekil 1.8) (Tsuzuki ve diğ., 1996). MGMT bulunmayan hücrelerde O<sup>6</sup>-metilguanin (O<sup>6</sup> MeG) tamiri mümkün olmayacağından, bu hücreler, alkilleiyici ajanların mutajenik ve sitotoksik etkilerine daha duyarlıdır. MGMT aktivitesinin kaybolması, glioblastomalarda sık gözlenen (%50) bir durumdur (Silber ve diğ.,

2012). Literatürde henüz Trabectedin ve MGMT arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

DNA hasarının doğrudan geri çevrilmesi mekanizmasında görev alan diğer enzimler *E.coli*'de bulunmuş AlkB homologu olan ABH2 (alkB, alkylation repair homolog 2) ve ABH3'tür (alkB, alkylation repair homolog 3). Deoksijenaz özelliği gösteren bu enzimler özellikle 1-metiladenin ve 3-metilsitozin hasarlarının tamirinde rol alırlar. İki enzim arasındaki fark hasarı onardıkları DNA zincirleridir. ABH2 bu işlemi çift zincirli DNA da gerçekleştirirken, ABH3 tek zincirli DNA'yı tercih eder. ABH2 ve ABH3'ten yoksun sıçanlarda kendiliğinden kanser gelişimi gözlenmediği rapor edilmiştir (Duncan ve diğ., 2002; Aas ve diğ., 2003).



**Şekil1.8:** O<sup>6</sup>-MeG hasarının MGMT ile onarılması

#### 1.3.3.1.2. Baz Kesip Çıkarma Onarım (BER) Mekanizması

BER mekanizması iyonize radyasyon ile tetiklenen DNA hasarlarının tamirinde de rol oynamaktadır. Bu mekanizma bölüm 2.5.'te ayrıntılı olarak açıklandığından burada tekrar değinilmeyecektir (Bkz: Bölüm: 1.2.5 - Sayfa 15).

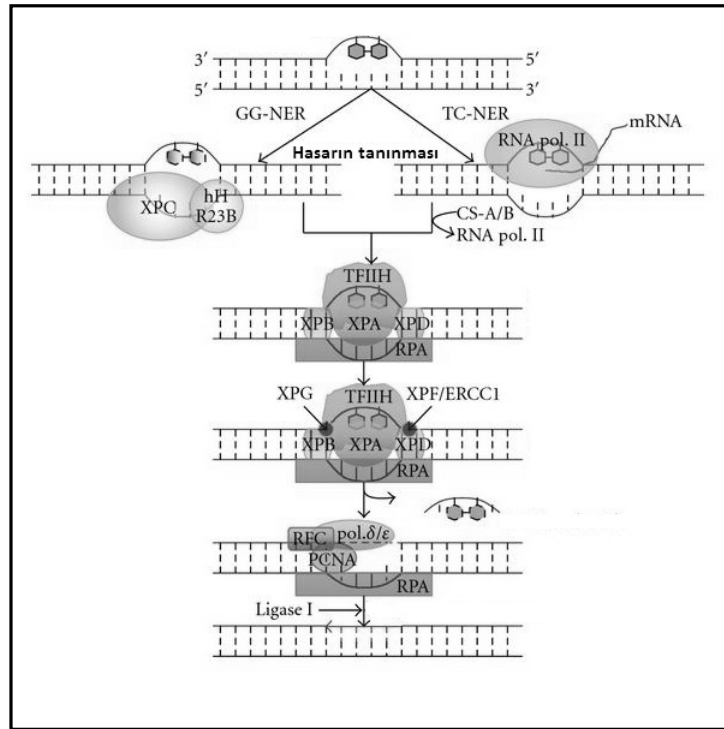
Ana B. Herrero ve diğerleri, mayalar üzerinde yaptıkları çalışmada, BER ve HR mekanizmalarında görev alan ve FEN1 proteininin homologu olan Rad13 proteininin Trabectedin'e karşı gelişen dirençte rol oynayabileceğini göstermiştir (Herrero ve diğ., 2006).

#### 1.3.3.1.3. Nükleotid Kesip Çıkarma Onarım Mekanizması (NER)

NER mekanizması çoğunlukla mutajenik kimyasalların ve kemoterapötik ajanların oluşturduğu DNA eklentilerden kaynaklanan hasarların onarımını yapar. Ayrıca UV radyasyon kaynaklı hasarlar da NER mekanizması ile onarılır. Memeli NER mekanizmasında

30'un üstünde farklı protein rol alırken prokaryotlarda bu mekanizma sadece 3 protein (UvrA, UvrB, UvrC) ile yürütülür (Leibeling, 2006).

NER mekanizması 2 alt yolak ile gerçekleşebilir. Bunlardan ilki, hasarı tüm genomda bulup onaran Global Genom NER (Global Genome NER)/(GG-NER) iken, diğeri aktif olarak transkribe olan genlerde bu işi yapan Transkripsiyon Bağımlı NER (Transcription Coupled NER)/(TC-NER)dir. İki mekanizma arasındaki farklılık hasarın tanınma mekanizmasından kaynaklanır. GG-NER'de DNA hasarı XPC-Rad23B ve DDB1-DDB2/XPE protein kompleksleri ile tanınırken, TC-NER'de hasarın tanınmasında CSA (ERCC8) ve CSB (ERCC6) (Cockayne syndrome group A) proteinleri görevlidir. Bundan sonraki basamaklar iki alt yolda da aynı şekilde yürütülür. XPA, RPA ve XPB (3'-5') / XPD (5'-3')'den oluşan TFIIH'nin kompleksi ile hasarlı bölgeyi de içeren DNA'nın açılması sağlanır. Açılan DNA bölgesi, XPG (3' uçtan kesilir) ve XPF/ERCC1 (5' uçtan kesilir) nukleazları ile kesilir ve 24-32 nukleotidlik bölüm çıkartılır. Zincirde oluşan boşluk RFC, PCNA ve DNA polimerazlar ( $\delta$  ve  $\epsilon$ ) ile doğru nükleotidler sentez edilerek doldurulur. Son olarak ise zincirler arasındaki boşluklar ligaz I enzimi ile birleştirilir (Şekil 1.9) (Kulaksız ve Sancar, 2007; Hakem, 2008).



**Şekil 1.9:** NER mekanizması

Yapılan çalışmalarda, Trabectedin'in sitotoksik etkisinin, NER mekanizması çalışan hücrelerde çalışmayanlara göre 2-10 kat fazla olduğu gösterilmiştir. (Erba ve diğ., 2001; Takabayashi ve diğ., 2001; Damia ve diğ., 2001). Trabectedin normal NER fonksiyonu olan hücrelerde RNA polimeraz II'nin hızlı bir şekilde yıkımına neden olur. XPD, XPA, XPG ve XPF-yoksunu hücrelerde bu etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Aune ve diğ., 2008).

## 2. AMAÇ

Bu çalışmanın öncelikli amacı, GBM hücre kültürlerine (U-87 MG ve T98G) Trabectedin'in ve düşük dozlarda iyonize radyasyonun ardışık olarak uygulanması ile, sitotoksik ve apoptotik etkinliğin zenginleştirilip zenginleştirilemeyeceğini test etmektir. İkincil amaç ise, Trabectedin aracılı zenginleştirilmiş etkide, DNA tamir mekanizmalarının rolünü araştırmaktır. Bu çalışmada aşağıdaki soruların cevapları aranacaktır:

- 1) a) Trabectedinin GBM hücre hatlarında zamana ve doza bağlı sitotoksik etki (hücre canlılığının ölçülerek) düzeyinin belirlenmesi ve IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanması,  
b) İyonize radyasyonun GBM hücre hatlarında zamana ve doza bağlı sitotoksik etki düzeyinin belirlenmesi ve IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanması,
- 2) İyonize radyasyon ve trabectedin GBM hücre kültürlerine ardışık olarak uygulandıklarında,  
a) Ardışık uygulamanın sitotoksik etki düzeyinin belirlenmesi,  
b) Olası antagonistik/additif/sinerjistik etki gözlemlendiği takdirde, bu etkinin kombinasyon indeksi (CI) hesaplama yöntemiyle ortaya konması,
- 3) Olası additif/sinerjistik sitotoksik etkinin apoptozis/nekrozis aracılı olup olmadığının, nekrozisi ve apoptozisi ayırt edebilen ELISA tabanlı bir kit ile belirlenmesi ve apoptozis sonuçlarının kaspaz 3/7 aktivitesi ölçülerek doğrulanması,
- 4) Olası additif/sinerjistik etkide DNA tamir mekanizmalarının rolünün, bu mekanizmalar ile ilişkili 85 geni içeren PCR array (SABiosciences, Frederick, MD, ABD) kullanılarak araştırılması.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Hatlarının Temini, Çoğaltımı ve İdamesi

İnsan glioblastoma multiforme hücre hatları U-87 MG ve T98G, Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı'nın Interlab Cell Line Collection (ICLC, İtalya) ve American Type Culture Collection (ATCC) (Wesel, Almanya)'den temin ettiği hücre hatları stoğundan temin edildi.

Hücre kültür işlemleri ultraviyole ile sterilize edilen laminar hava akımlı çalışma kabinlerinde (NuAire, USA) gerçekleştirildi. -80 °C'de saklanan hücreler, 37 °C su banyosunda çözüldü ve 75 cm<sup>2</sup>'lik filtreli hücre kültür flasklarına aktarıldı.

T-98G hücreleri, DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) besiyerine % 10 fetal sığır serumu, 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek, U-87 MG hücreleri ise RPMI 1640 besiyerine % 10 fetal sığır serumu, 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek, 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörlerde çoğaltıldı. Hücre hatları canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak izlendi. Flasklarda %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözleendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.

#### 3.2. Hücrelerin Sayımı

Tripan mavisi ile muamele edilen hücreler canlı ise boyanmazlar ve mikroskopta incelendiklerinde parlak görülürler. Ölü hücreler ise boyanırlar ve mikroskopta incelendiğinde koyu renkte görülürler. Bu nedenle Tripan mavisi, hücre canlılığının belirlenmesinde de yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Deneilerde hücre sayısının belirlenmesinde Tripan mavisi yöntemi ile sayım yapan T4 cellometer otomatik sayım cihazı (Cellometer, Nexcelom, ABD) kullanıldı. U-87 MG ve T-98G hücrelerini içeren flasklardaki besiyerleri çekilip, 4 ml Tripsin EDTA eklenerek ~ 10 dakika inkübatörde bekletildi. Flask zemininden ayrılan hücreler 1:1 oranında besiyeri ile nötralize edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Santrifüjlenen hücrelerin süpernatantları atılarak dibe çöken hücre pelleti 10 ml besiyeri içinde tekrar homojenize edildi. Bu süspansiyondan tripan mavisi ile hücre süspansiyonu 1:1 oranında karıştırıldı. Bu karışım otomatik sayım cihazının lamına aktarıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı otomatik olarak belirlendi.



### **3.3. Trabectedin'in Stok Solüsyonlarının Hazırlanması**

Trabectedin lyofilize halde, üretici firma olan Pharma Mar (Madrid, İspanya) yetkililerinden Dr. Carlos Galmarini'den temin edildi. 1.4 mg toz Trabectedin, 1 ml DMSO (dimetilsülfoksit) içinde çözülerek Trabectedin'in 1.8 mM'lık stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonlar 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi ve 100 µl'lik parçalar halinde - 20°C 'de saklandı. Her deney için taze stok kullanıldı.

### **3.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler**

Trabectedin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence) ile belirlendi. İyonize radyasyon ve sıralı deneylerde ise, hücre canlılığının belirlenmesinde Tripan mavisi yöntemi kullanıldı.

### **3.5. Trabectedin'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin xCELLigence Sistemi ile Belirlenmesi**

xCELLigence sisteminde kullanılmak üzere üretilmiş olan E-plaka kuyucuklarına 50 µl besiyeri eklendikten sonra her kuyucukta  $10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı. E-plaka oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra inkübatörde bulunan gerçek zamanlı hücre analiz cihazına yerleştirildi. Hücrelerin logaritmik çoğalım durumları istenilen zaman aralıklarında ve devamlı olarak RTCA analiz cihazı ile gözlendi. 24 saat inkübasyon sonunda, kuyucuklara Trabectedin'in artan konsantrasyonları (0.1-100 nM) eklendi. Tüm kuyucuklardaki son hacim 150 µl olacak şekilde ayarlandı. Deneyin iç kontrolü olarak sadece besiyeri ve besiyeri+DMSO içeren kuyucuklar kullanıldı. Trabectedin eklendikten sonra, hücrelerin çoğalım durumları 72 saat boyunca cihaz tarafından kaydedildi. Cihaz, hücrelerin Trabectedin'e verdikleri kısa süreli cevabı ölçebilmesi için bir saat boyunca her 2 dakikada bir, uzun süreli hücresel cevabı ölçebilmesi için ise deney süresince her 30 dakikada bir hücre çoğalımını ölçecek şekilde ayarlandı. Trabectedin'in  $IC_{50}$  değeri cihaza entegre veri analiz yazılımı kullanılarak hesaplandı.

### **3.6. İyonize Radyasyon Uygulaması**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı uzmanlarından Dr. Özlem AKAGÜNDÜZ danışmanlığında hücrelere uygulanacak iyonize radyasyon dozları, 4, 6, 8, 10, 12, 16 Gy şeklinde belirlendi. İyonize radyasyon uygulaması, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, Electa Marka Precise Model Lineer Hızlandırıcı 6MV Foton ile flask kalınlığı göz önünde bulundurularak 1cm bolus konulup posteriyor sahadan doz oranı 4Gy/dk olacak şekilde gerçekleştirildi.

### **3.7. İyonize Radyasyonun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Tripan Mavisi Yöntemiyle Belirlenmesi**

Hücreler, radyasyon uygulanacak her doz için 500.000 hücre/flask olacak şekilde 25 cm<sup>2</sup> flasklara ekildi ve flasklar 1 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, flasklara radyasyonun artan dozları ile (4, 6, 8, 10, 12, 16 Gy) muamele edildi ve flasklar 24, 48 ve 72 saat sürelerince inkübasyona bırakıldı. İyonize radyasyon uygulamasının her bir doz ve zamanı için 3 ayrı flask hazırlandı. Hücre canlılığının belirlenmesinde, 3 ayrı flasttaki hücre sayılarının ortalama değeri kullanıldı. İyonize radyasyonun hücre canlılığı üzerindeki etkisi Tripan mavisi yöntemi ile belirlendi. Bunun için 24., 48. ve 72. saatlerde, U-87 MG ve T-98G hücrelerini içeren flasklardaki besiyerleri çekilip, 2 ml Tripsin EDTA eklenerek ~ 10 dakika inkübatörde bekletildi. Flask zemininden ayrılan hücreler 1:1 oranında besiyeri ile nötralize edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Santrifüjlenen hücrelerin süpernatantları atılarak dibe çöken hücre pelleti 10 ml besiyeri içinde tekrar homojenize edildi. Bu süspansiyondan tripan mavisi ile hücre süspansiyonu 1:1 oranında karıştırıldı. Bu karışım otomatik sayım cihazının (Cellometer, Nexcelom, ABD) lamına aktarıldı ve hücre sayımı otomatik olarak yapıldı. Hücreler otomatik hücre sayım cihazıyla paralel olarak ışık mikroskopunda Thoma lamı ile sayıldı. Tüm sayımların ortalamaları alınarak mililitredeki canlı hücre sayısı hesaplandı. İyonize radyasyon uygulanan flasklardaki canlı hücre sayısının ortalaması, kontrol flasklarındaki canlı hücre sayısının ortalamasına oranlandı. Bu oran 100 ile çarpılıp yüzde (%) hücre canlılığı hesaplandı. Yüzde sitotoksiste, ölçümlenen hücre canlılığı verilerinden dolayı olarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ sitotoksiste} = 100 - \left[ \left( \frac{\text{İlaç (veya radyasyon) uygulanmış flasklardaki canlı hücre sayısının ortalaması}}{\text{Pozitif Kontrol Flasklarındaki canlı hücre sayısının ortalaması}} \right) \times 100 \right]$$

### **3.8. Trabectedin ve İyonize Radyasyon Ardışık Uygulanmasının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi**

Hücreler, sıralı deneylerde uygulanacak her doz için 500.000 hücre/flask olacak şekilde 25 cm<sup>2</sup> flasklara ekildi ve flasklar 1 gün inkübasyona bırakıldı. Sıralı deneylerde, Trabectedin'in 24. saatteki IC<sub>50</sub> değerinin altındaki konsantrasyonlar flasklara eklendi ve flasklar 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından besiyerleri yenilenip, flasklara 24. saatteki IC<sub>50</sub> değerinin altındaki konsantrasyonlarda iyonize radyasyon uygulandı ve flasklar 24 saat inkübasyona bırakıldı (Çizelge 3.1). Bu uygulamanın ardından, flasklarda canlı hücre sayımı yapılarak sitotoksiste hesaplandı. Aynı deney düzeneği, Trabectedin ve iyonize radyasyonun hücre kültürlerinde eklenme sırası değiştirilerek de gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.1:** Trabectedin ve iyonize radyasyonun ardışık deneylerde uygulanan dozları

	<b>U-87 MG hücre kültürü</b>	<b>T98G hücre kültürü</b>
Trabectedin dozları	3 ve 5 nM	7.5 ve 13 nM
İyonize radyasyon dozları	6 ve 8 Gy	6 ve 8 Gy

### **3.9. Ardışık Deneylerde Olası Antagonistik/Additif/Sinerjistik Etkilerinin Hesaplanması**

Trabectedin ve iyonize radyasyonun sıralı uygulamalarının etkilerini (sinerjistik, antagonistik veya aditif) araştırmak için CalcuSyn 2.1 (Biosoft, Cambridge, İngiltere) yazılımı kullanıldı. Bu yazılım otomatik olarak kombinasyon indeksi (CI) değeri hesaplayıp, iki veya daha fazla faktörün olası sinerjistik, antagonistik veya aditif etkilerini analiz edebilmeye olanak sağlamaktadır. Hücre canlılığının ölçümünden hesaplanan sitotoksikite değerleri CalcuSyn 2.1 yazılımına girilerek analiz edildi ve CI değerleri belirlendi. CI değeri 0.9'dan küçük ise sinerjistik etkileşimi, 0.9 - 1 arasında ise additif etkileşimi, 1'den büyükse antagonistik etkileşimi ifade etmektedir (Chou ve Talalay, 1984).

### **3.10. DNA Fragmentasyon Miktarının Ölçümü ile Apoptozisin Gösterilmesi**

Hücreler kitin içerdiği lizis solüsyonu ile oda sıcaklığında 30 dakika muamele edildi. Elde edilen hücre lizatları, kitin içerdiği streptavidin kaplı mikropalakalara eklendi. Histon proteinleri ve nükleozomlara bağlanmayı sağlayacak (Anti-histon biotin ve Anti-DNA-Peroksidaz) antikoları içeren reaktiften 80 µl eklenen mikropalaka, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında anti-histon antikoru bir taraftan nükleozomlardaki histonlara tutunurken bir taraftan da oluşan immunokompleks streptavidin kaplı plakalara tutunmaktadır. Anti-DNA-Peroksidaz antikoru ise nükleozomlar arasındaki DNA'lara bağlanmaktadır. Bağlanmayan bileşenlerin yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılmasının ardından, nükleozom miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesi immunokomplekslere tutunmuş olan peroksidaz'ların ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Peroksidaz, ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit]) substratı ile 405 nm ve 490 nm referans dalga boyunda mikro plaka okuyucuda (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter, ABD) ölçüldü. Kitin ihtiva ettiği %100 apoptotik hücrelerin absorbans değeri baz alınarak, hücre lizatlarında meydana gelen histon ve nükleozom miktarındaki artış, apoptozis miktarındaki artışla doğru orantılı olarak değerlendirildi.

### **3.11. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Ölçümü ile Apoptozisin Doğrulanması**

U-87 MG ve T98G hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesinin belirlenmesi amacı ile Caspase-Glo 3/7 Assay kiti (Promega, Madison, WI, ABD) kullanıldı. Hücreler toplam hacim 200 µl olacak şekilde 96 kuyucuk içeren hücre kültürü plakalarına ekildi. Kitin ihtiva ettiği 2,5

ml Caspase-Glo 3/7 Buffer, Caspase-Glo 3/7 substratı ile karıştırılarak substratın tamamen çözünmesi sağlandı. Elde edilen bu karışımdan her kuyucuğa 100 µl eklenerek hücre kültürü plakası, oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. Bir saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşan lüminesans miktarı çok modüllü plaka okuyucu ile ölçüldü.

Hazırlanan Caspase-Glo 3/7 karışımı, kaspaz 3/7 substratı olan DEVD Asp-Glu-Val-Asp dizisinin yanı sıra, hücre lizisini sağlayan bir tampon çözelti de içerir. Bu karışımın hücrelere eklenmesi ile önce hücreler lize olur, ardından da kaspaz substratının yıkımına bağlı olarak lüminesans sinyal oluşumu başlar. Oluşan lüminesans sinyal miktarı, hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesiyle doğru orantılı olarak değerlendirilir.

### **3.12. Human DNA Repair PCR Array Uygulamaları**

PCR Array Uygulamaları, RNA İzolasyonu, PCR uygulaması ve analiz basamaklarını içerir.

#### **3.12.1. RNA İzolasyonu**

25 cm<sup>2</sup> flasklara ekilen U-87MG ve T98G hücrelerinin Trabectedin ve iyonize radyasyon ardışık uygulamasının sinerjistik bulunan dozları, 24 saat (Trabectedin) ve 8 saat (radyasyon) sürelerince uygulandı. RNA izolasyonu için besiyeri dökülen örnekler 1ml Tridity G (Applichem, Almanya) eklendi. Mikrosantrifüj tüplerine alınan örnekler 500 µl kloroform eklendi 15-20 sn. çalkalayıcıda çalkalandı. Daha sonra, 200 µl izopropanol eklenerek 15 dk oda sıcaklığında bekletildi ve sıvıdaki faz oluşumu gözlemlendi. 4 °C'de 12.000 g'de santrifüjlenen örnekler ethanol eklendi ve tekrar santrifüj edildi. Elde edilen RNA pelletinin üzerindeki ethanol pipetörle çekildikten sonra RNA pelleti 50 µl RNA içermeyen su içinde çözüldü. RNA miktarları spektrofotometrede ölçüldü. A260:A280 oranı 2.0'dan büyük olan örnekler array çalışması için kullanıldı.

#### **3.12.2. PCR Array Uygulamaları ve Analiz**

PCR Array uygulaması için Sabiosciences firmasının DNA hasarının tamirinde rol alan 85 geni içeren "Human DNA Repair PCR Array" kullanıldı. Her örnekten 4 µg RNA kullanılarak "QuantiTect Reverse Transcription Kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Her primer için 2,5 µl RT2 SYBR Green qPCR Master Mix , 10,5 µl DNaz-RNaz içermeyen su, 1,0 µl gene-spesifik 10 µM PCR primerleri [QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Hilden, Almanya)] ve 1,0 µl cDNA örneği karıştırılarak PCR karışımı hazırlandı. 96 kuyuklu plakaların her kuyucuğuna bu karışımdan 25 µl eklendi ve 96 kuyucuklu plaka Light Cycler 480 (Roche Applied Science, Almanya) cihazına yüklendi. PCR işlemi 95 °C'de 10 dk, 95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 1 dk, 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi.

PCR array uygulamaları sonunda Light Cycler 480 cihazından elde edilen CT değerleri Excel dosyasına kopyalandı ve firmanın online data analiz programı kullanılarak analiz edildi.

Human DNA Repair PCR Array'in içerdđđ genler ařađđda gđsterilmektedir:

**Baz kesip çıkarma tamiri (BER):** APEX1, APEX2, CCNO, LIG3, MPG, MUTYH, NEIL1, NEIL2, NEIL3, NTHL1, OGG1, PARP1, PARP2, PARP3, POLB, SMUG1, TDG, UNG, XRCC1.

**Nukleotid kesip çıkarma tamiri (NER):** ATXN3, BRIP1, CCNH, CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, LIG1, MMS19, PNKP, POLL, RAD23A, RAD23B, RPA1, RPA3, SLK, XAB2, XPA, XPC.

**Yanlış eşleşme tamiri (MMR):** MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PMS1, PMS2, POLD3, TREX1.

**Çift zincir kırıklarının (DSB) tamiri:** BRCA1, BRCA2, DMC1, FEN1, LIG4, MRE11A, PRKDC, RAD21, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51B, RAD51D, RAD52, RAD54L, XRCC2, XRCC3, XRCC4, XRCC5, XRCC6.

**DNA tamiri ile ilişkili diğer genler:** ATM, ATR, EXO1, MGMT, RAD18, RFC1, TOP3A, TOP3B, XRCC6BP1.

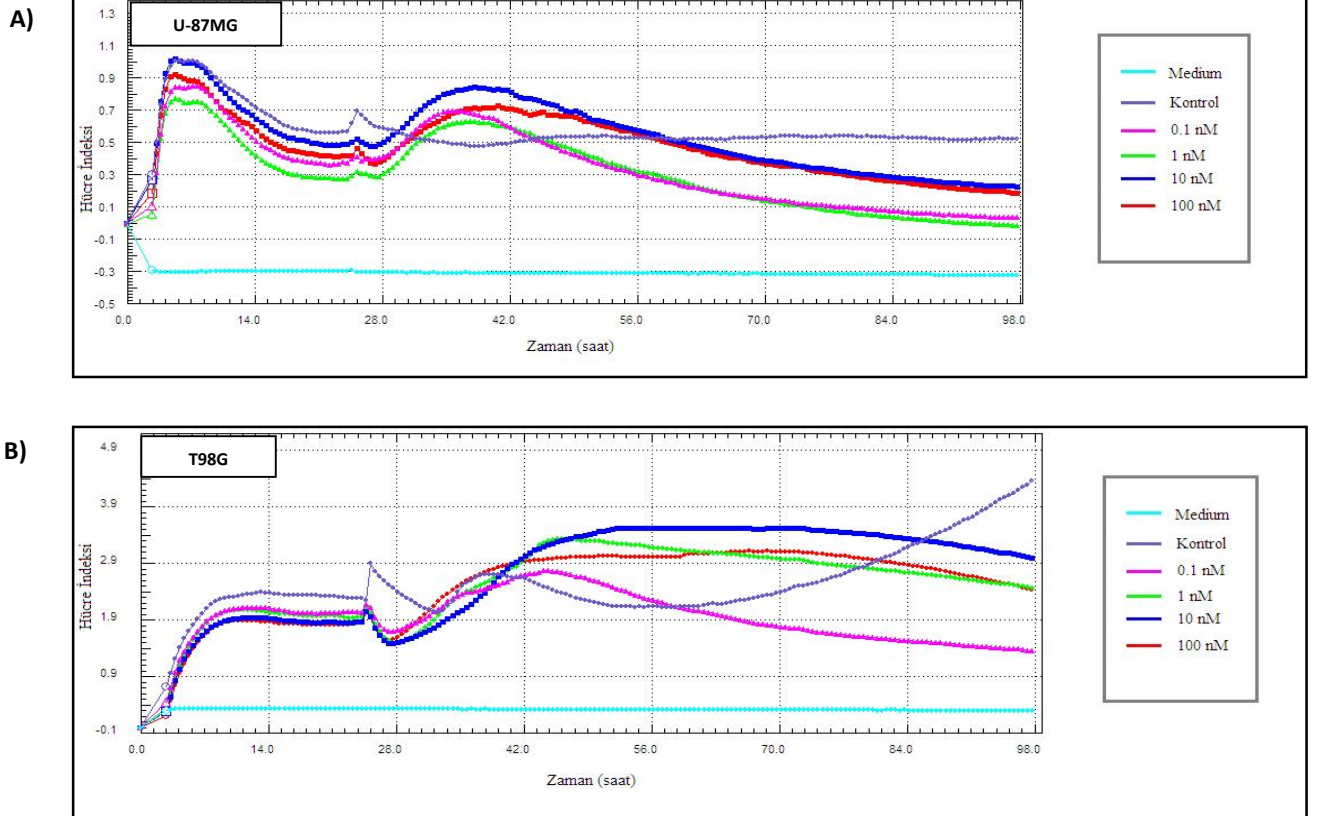
### 3.13. İstatistiksel Analiz

Deneylerde Trabectedin'in ve iyonize radyasyonun artan konsantrasyonları üçer kuyucukta/flaskta test edildi ve her deney üç defa tekrarlandı. Her kuyucuğa ait absorbans/floresans değerleri, mikropłaka okuyucu tarafından ortalama ve  $\pm$  SD değerleri olarak hesaplandı. Deney sonuçlarından elde edilen değerler Excel'de tasarlanan sitotoksik yüzde şablonuna transfer edildi. Hesaplanan sitotoksik yüzde değerlerinin sinerjistik, additif veya antagonistik etkilerini saptamak üzere veriler CalcuSyn (Sürüm 2.1) programına aktarıldı. CalcuSyn'de hesaplanan doz-etki değerleri Graphpad Prism 6.0 istatistik yazılımında istatistiksel analize tabi tutuldu. Grafikler Graphpad Prism 6.0 kullanılarak çizildi. İstatistiksel analizlerde ANOVA ve ardından Dunnett's t-testleri kullanıldı. xCELLigence deneylerinin analizi, sisteme entegre bilgisayardaki RTCA yazılımıyla yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Trabectedin'in GBM Hücre Kültürlerinde Doza ve Zamana Bağlı Etkileri

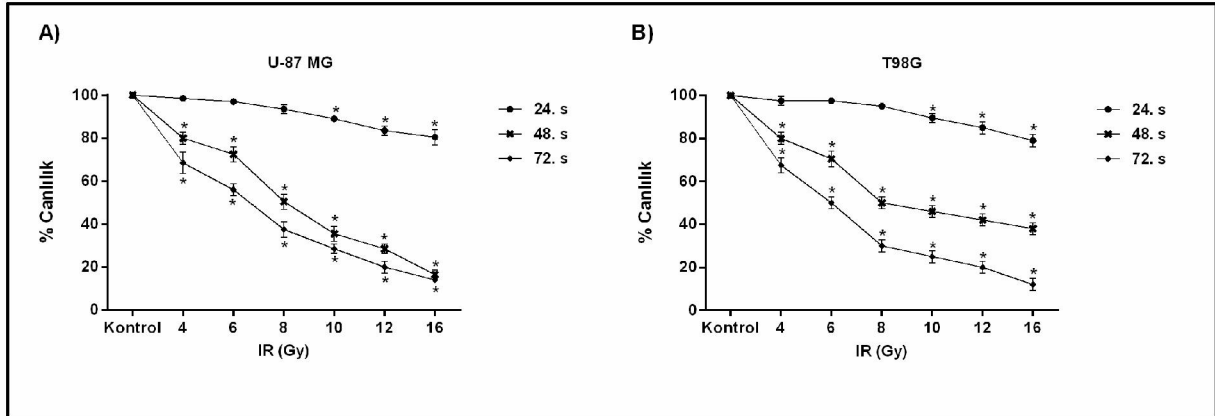
Trabectedin'in artan dozları (0.1-100 nM) ile muamele edilmiş U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinin çoğalımında artan doza ve zamana bağlı olarak anlamlı azalma gözlemlendi (Şekil 4.1 A ve B) ( $p < 0.05$ ). Trabectedin'in U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde 24. saatteki  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 8.4 nM ve 17 nM; 48. saatteki  $IC_{50}$  değerleri ise sırasıyla 5 ve 13 nM hesaplandı.



#### 4.2. İyonize Radyasyonun GBM Hücre Kültürlerinde Doza ve Zamana Bağlı Etkileri

İyonize radyasyonun artan dozları ile muamele edilmiş U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinin çoğalımında artan doza ve zamana bağlı olarak azalma gözlemlendi (Şekil 4.2 A ve B). İyonize radyasyonun her iki hücre kültüründe de, 24. saatte 10, 12 ve 16 Gy dozlarında; 48. ve 72. saatlerde ise tüm dozlarda canlılık yüzdelerinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi (\*p<0.05). IR'nin 4, 6, 8, 10, 12 ve 16 Gy dozları uygulanan U-87 MG hücre kültürlerinin 48. saatteki canlılık yüzdeleri sırasıyla, 80, 72.5, 50.5, 35.5, 28.5 ve 16.5 iken; T98G hücre kültürlerinin canlılık yüzdeleri sırasıyla, 80, 70.5, 50, 46, 42 ve 38 olarak hesaplandı.

İyonize radyasyon'un U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde 24. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla 22Gy ve 25 Gy; 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla 8 Gy ve 9.8 Gy; 72. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri ise, sırasıyla 6.2 Gy ve 5.7 Gy hesaplandı.



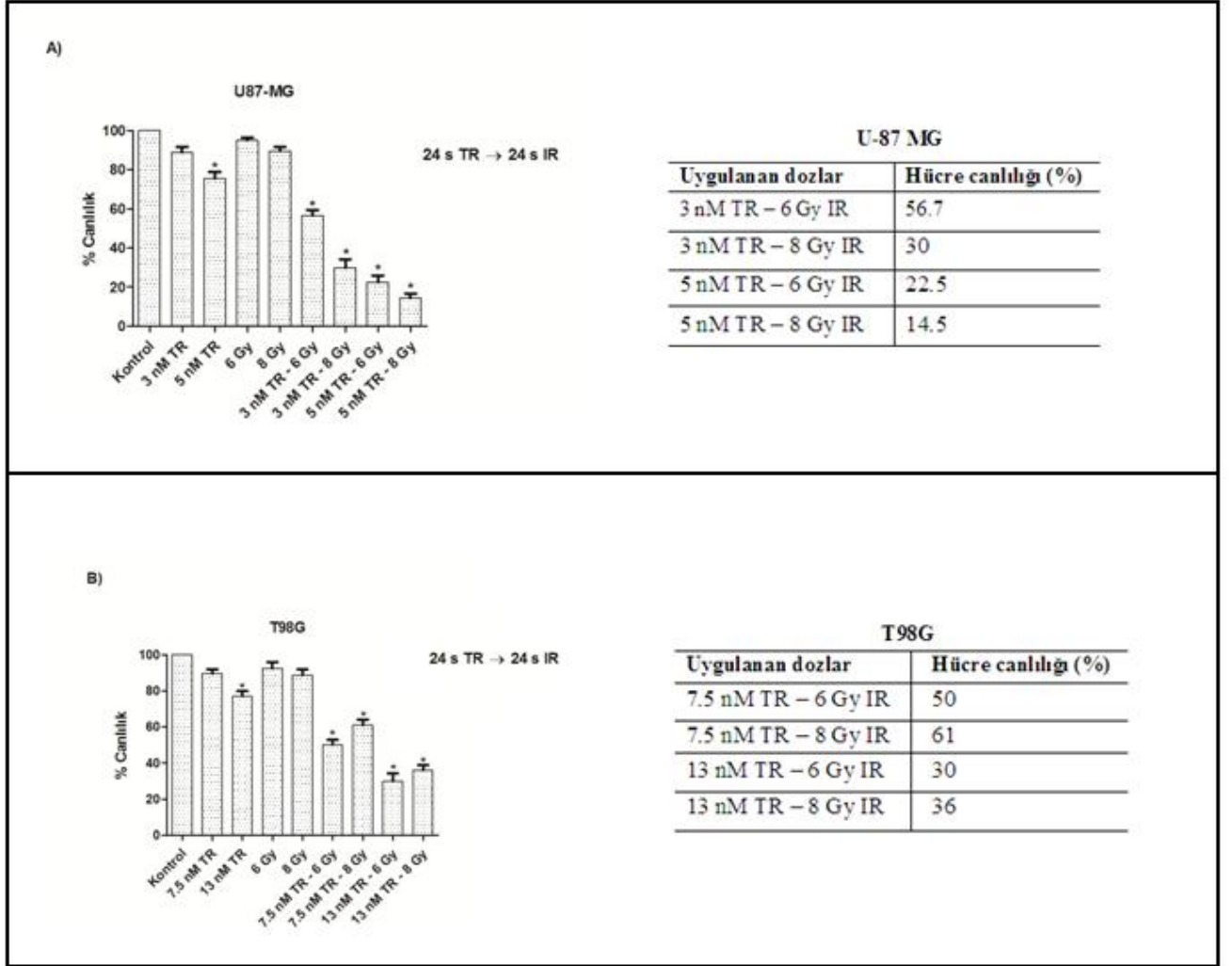
Şekil 4.2: İyonize radyasyonun U-87 MG (A) ve T98G (B) hücre kültürlerinin canlılık yüzdelerine etkileri (IR: İyonize Radyasyon)

#### 4.3. Ardışık Uygulamalı Trabectedin ve İyonize Radyasyonun GBM Hücre Kültürleri Üzerindeki Etkileri

IC<sub>50</sub> değerlerinin altındaki dozlarda 24'er saat süreyle ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonun GBM hücre kültürlerinin çoğalımında anlamlı azalmaya yol açtığı gözlemlendi (Şekil 4.3 A ve B) (p<0.05).

Yirmi dört saat Trabectedin (3 ve 5 nM) muamelesinin ardından 24 saat IR (6 ve 8 Gy) ile muamele edilen U-87 MG hücre kültürlerinin canlılık yüzdeleri Şekil 4.3 A' da gösterildi.

Yirmi dört saat Trabectedin (7.5 ve 13 nM) muamelesinin ardından 24 saat IR (6 ve 8 Gy) ile muamele edilen T98G hücre kültürlerinin canlılık yüzdeleri ise Şekil 4.3 B' de gösterildi.



**Şekil 4.3:** Ardışık uygulamalı Trabectedin ve IR'nin U-87 MG (A) ve T98G (B) hücre kültürlerinin canlılık yüzdelerine etkileri (TR: Trabectedin, IR: İyonize Radyasyon)

Her iki hücre kültüründe de, 24 saat Trabectedin ve 24 saat iyonize radyasyon ardışık uygulamasının sitotoksik etkiyi zenginleştirdiği saptandı. Zenginleştirilmiş sitotoksik etkisi belirlenen dozlar ve kombinasyon indeksi değerleri Çizelge 4.1'de gösterildi. Trabectedin ve iyonize radyasyonun hücre kültürlerinde eklenme sırası değiştirildiğinde ise additif/sinerjistik sitotoksik etki gözlenmedi.



**Çizelge 4.1:** 24 saat Trabectedin ve 24 saat iyonize radyasyon ardışık uygulamasının CI değerleri

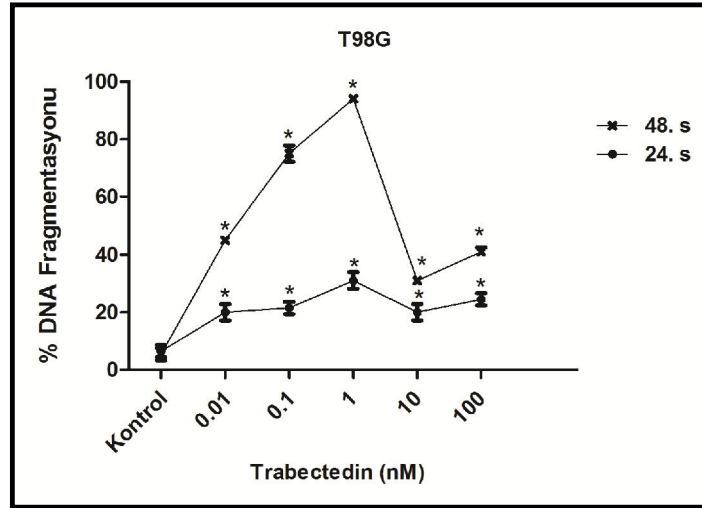
U-87 MG				T98G			
Trabectedin (nM)	IR (Gy)	CI değeri	Sinerji Durumu	Trabectedin (nM)	IR (Gy)	CI değeri	Sinerji Durumu
3	6	0.769	Sinerjizm	7.5	6	0.693	Sinerjizm
3	8	0.552	Sinerjizm	7.5	8	0.648	Sinerjizm
5	6	0.531	Sinerjizm	13	6	0.557	Sinerjizm
5	8	0.488	Sinerjizm	13	8	0.864	Sinerjizm

#### 4.4. DNA Fragmentasyon Düzeyleri Üzerinden Trabectedinin GBM Hücre Kültürlerindeki Apoptotik Etkisi

Trabectedin'in artan konsantrasyonları (0.01-100 nM) ile muamele edilmiş T98G hücre kültürlerinin DNA fragmentasyon miktarında artan doza ve zamana bağlı olarak artış gözlemlendi (Şekil 4.4) ( $p < 0.05$ ). Aynı konsantrasyonlar uygulanmış U-87 MG hücre kültürlerinde ise DNA fragmentasyon miktarında anlamlı değişim gözlenmedi.

Trabectedin'in 0.01, 0.1 ve 1 nM dozları ile 24 saat muamele edilen T98G hücre kültürlerinin DNA fragmentasyon yüzdeleri sırasıyla 20, 21.5 ve 31 olarak hesaplanırken 10 ve 100 nM dozlarda DNA fragmentasyon yüzdeleri 20 ve 24.5 olarak hesaplandı.

Trabectedin'in 0.01, 0.1 ve 1 nM dozları ile 48 saat muamele edilen T98G hücre kültürlerinin DNA fragmentasyon yüzdeleri sırasıyla 45, 75 ve 94 olarak hesaplanırken 10 ve 100 nM dozlarda DNA fragmentasyon yüzdeleri 31 ve 41 olarak hesaplandı.



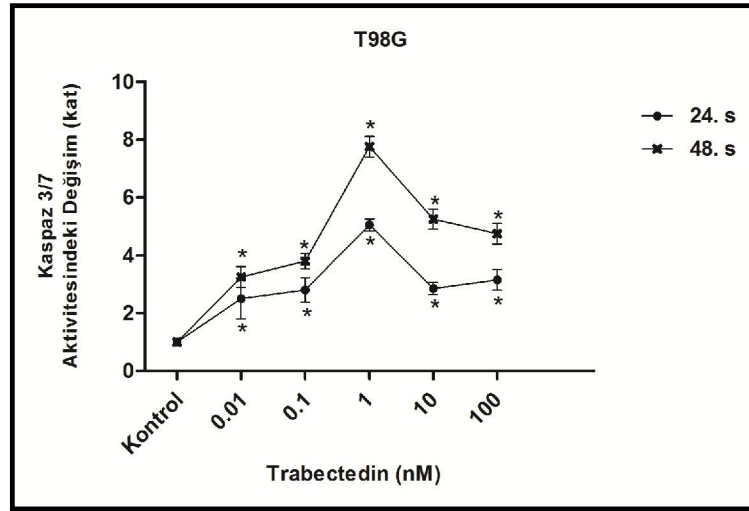
**Şekil 4.4:** Trabectedin'in ile muamele edilmiş T98G hücre kültürlerinde DNA fragmentasyonu yüzdeleri

#### 4.5. Trabectedinin GBM Hücre Kültürlerinde Kaspaz 3/7 Aracılı Apoptotik Etkisi

Trabectedin'in artan konsantrasyonları (0.01-100 nM) ile muamele edilmiş T98G hücre kültürlerinin kaspaz 3/7 aktivasyonunda artan doza ve zamana bağlı olarak anlamlı artış gözlemlendi (Şekil 4.5) ( $p < 0.05$ ). Aynı konsantrasyonlar uygulanmış U-87 MG hücre kültürlerinde ise kaspaz 3/7 aktivasyonunda anlamlı değişim gözlemlenmedi.

Trabectedin'in 0.01, 0.1 ve 1 nM dozları ile 24 saat muamele edilen T98G hücre kültürlerinde kaspaz 3/7 aktivasyonunda kontrole göre sırasıyla 2.5, 2.8 ve 5.1 kat artış saptanırken, 10 ve 100 nM dozlarında 2.85 ve 3.15 kat artış saptandı.

Trabectedin'in 0.01, 0.1 ve 1 nM dozları ile 48 saat muamele edilen T98G hücre kültürlerinde kaspaz 3/7 aktivasyonunda kontrole göre sırasıyla 3.25, 3.8 ve 7.75 kat artış saptanırken, 10 ve 100 nM dozlarında 5.25 ve 4.75 kat artış saptandı.

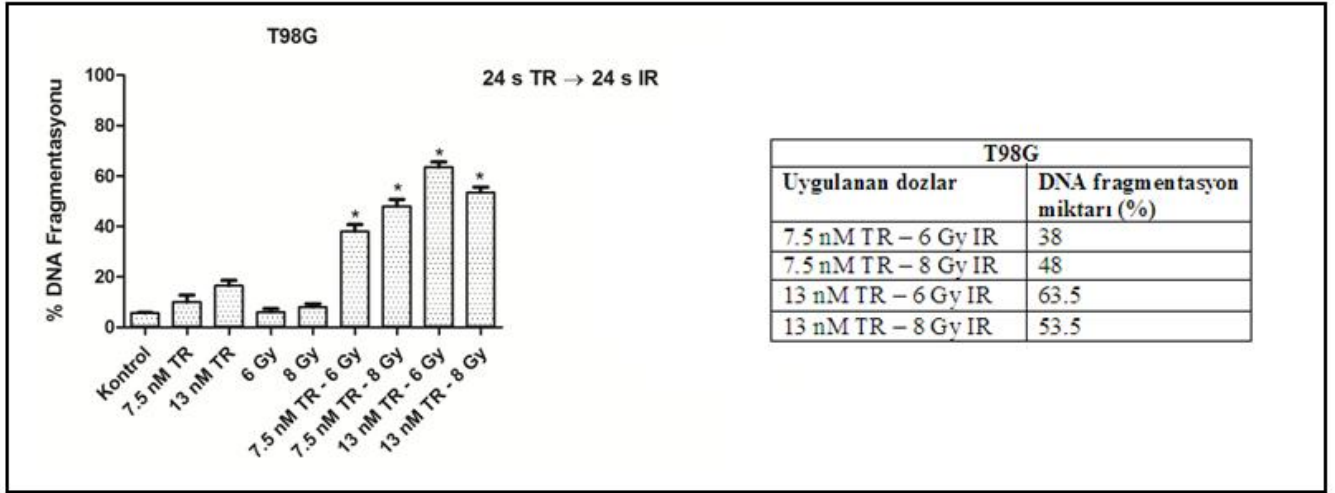


Şekil 4.5: Trabectedin ile muamele edilmiş T98G hücre kültürlerinde kaspaz 3/7 aktivite düzeyleri

#### 4.6. GBM Hücre Kültürlerindeki Apoptotik Etkinin Ardışık Uygulanan Etkin Trabectedin ve İyonize Radyasyonla Zenginleştirilmesi

$IC_{50}$  değerlerinin altındaki dozlarda 24'er saat süreyle ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonun T98G hücre kültürlerinde DNA fragmentasyon miktarlarında anlamlı artışa yol açtığı gözlemlendi (Şekil 4.6) ( $p < 0.05$ ).

Yirmi dört saat Trabectedin (7.5 ve 13 nM) muamelesinin ardından 24 saat IR (6 ve 8 Gy) ile muamele edilen T98G hücre kültürlerinin % DNA fragmentasyon miktarları Şekil 4.6' da gösterildi.

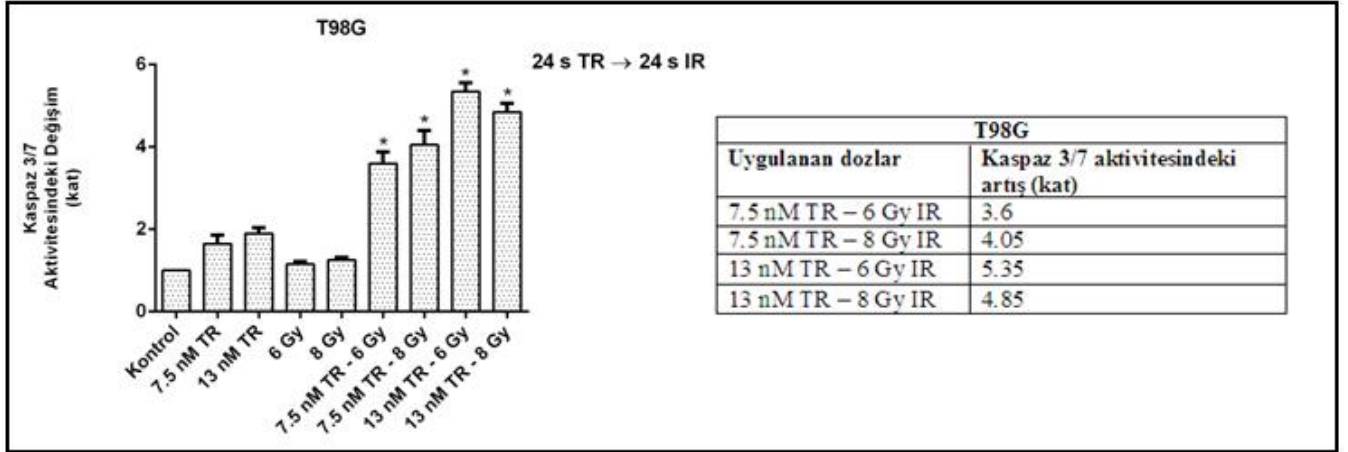


**Şekil 4.6:** Ardışık uygulamalı Trabectedin ve IR'nin GBM hücre kültürlerinde DNA fragmentasyonu yüzdeleri (TR: Trabectedin, IR: İyonize Radyasyon)

#### 4.7. Ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonun GBM hücre kültürlerinde Kaspaz 3/7 aracılı apoptotik etkisi

$IC_{50}$  değerlerinin altındaki dozlarda 24'er saat süreyle ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonun T98G hücre kültürlerinde kaspaz 3/7 aktivasyon düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığı belirlendi (Şekil 4.7) ( $p < 0.05$ ).

Yirmi dört saat Trabectedin (7.5 ve 13 nM) muamelesinin ardından 24 saat IR (6 ve 8 Gy) ile muamele edilen T98G hücre kültürlerinin kaspaz 3/7 aktivasyonunun kontrole göre değişimi Şekil 4.7' de gösterildi.



**Şekil 4.7:** Ardışık uygulamalı etkin Trabectedin ve IR'nin GBM hücre kültürlerinde kaspaz 3/7 aktivasyon düzeyleri (TR: Trabectedin, IR: İyonize Radyasyon)

#### 4.8. Ardışık Uygulanan Etkin Trabectedin ve İyonize Radyasyonun Etkilediği DNA Tamiri ile İlişkili Genlerin mRNA Düzeyindeki Değişiklikler

U-87 MG hücre kültürlerinde 8 Gy, T98G hücre kültürlerinde 6 Gy doz IR uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişikliklere yol açtığı belirlendi (Çizelge 4.2 ve 4.3) ( $p < 0.05$ ).

U-87 MG hücre kültürlerinde 5 nM, T98G hücre kültürlerinde ise 13 nM doz Trabectedin uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişikliklere yol açtığı belirlendi (Çizelge 4.4 ve 4.5) ( $p < 0.05$ ).

U-87 MG hücre kültürlerinde 5 nM Trabectedin ve 8 Gy IR, T98G hücre kültürlerinde ise 13 nM Trabectedin ve 6 Gy IR ardışık uygulamalarının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişikliklere yol açtığı belirlendi (Çizelge 4.6 ve 4.7) ( $p < 0.05$ ).

**Çizelge 4.2:** U-87 MG hücre kültürlerinde 8 Gy doz IR uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler

Baz Kesip Çıkarma Tamiri (BER)		Nukleotid Kesip Çıkarma Tamiri (NER)		Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)		DNA çift zincir kırıklarının Tamiri (DSBR)		Diğer Genler	
Gen Sembölü	Değişim oranı	Gen Sembölü	Değişim oranı	Gen Sembölü	Değişim oranı	Gen Sembölü	Değişim oranı	Gen Sembölü	Değişim oranı
OGG1	+2.4203	ATXN3	+6.2127	MLH1	+1.6879	LIG4	+3.4948	ATR	+2.5407
PARP1	+2.7042	BRIP1	+9.1591	MLH3	+2.6486	MRE11A	+2.4372	EXO1	+1.6879
POLB	+2.4036	CCNH	+2.107	MSH2	+1.9796	PRKDC	+1.6191	MGMT	+1.5532
SMUG1	+2.0353	CDK7	+1.5212	MSH3	+2.4712	RAD21	+2.742	RAD18	+5.1167
TDG	+2.8191	DDB1	+2.1663	MSH4	+5.2242	RAD50	+2.3057	TOP3A	+2.5761
		DDB2	+2.4884	MSH5	+4.8407	RAD51	+1.6996	TOP3B	+2.0212
		ERCC2	+2.7042	MSH6	+2.2118	RAD51B	+2.4203		
		ERCC3	+3.5191	PMS1	+1.8728	RAD51C	+2.0353		
		ERCC4	+6.7985	PMS2	+3.8243	RAD51D	+4.8743		
		ERCC5	+1.847	POLD3	+2.9798	RAD52	+5.446		
		ERCC6	+2.8584			XRCC2	+4.774		
		ERCC8	+3.0005			XRCC3	+3.1279		
		LIG1	+2.7042			XRCC5	+2.4372		
		PNKP	+2.1217						
		POLL	+1.6762						
		RAD23A	+3.0849						
		RAD23B	+4.0705						
		RPA1	+2.4203						
		SLK	+5.2605						
		XPA	+1.5424						
		XPC	+3.2834						

**Çizelge 4.3:** T98G hücre kültürlerinde 6 Gy doz IR uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler

Baz Kesip Çıkarma Tamiri (BER)		Nukleotid Kesip Çıkarma Tamiri (NER)		Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)		DNA çift zincir kırıklarının Tamiri (DSBR)		Diğer Genler	
Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı
CCNO	-2.027	CCNH	-2.084	MLH1	-1.7646	BRCA1	-1.7283	ATM	-3.3854
NEIL2	-1.5793	CDK7	-2.3446	MSH2	-2.2028	BRCA2	+2.2826	ATR	-4.1105
NEIL3	-4.3751	DDB2	-1.9991	MSH3	-1.8395	DMC1	-2.1426	EXO1	-2.9268
NTHL1	-2.2335	ERCC6	-3.5784	MSH4	-2.1426	FEN1	-1.5468	RFC1	-2.027
PARP1	-1.6464	LIG1	-2.0411	MSH5	-1.9991	LIG4	-2.7689	TOP3A	-2.9883
PARP2	-3.362	MMS19	-2.4611	MSH6	-3.2251	MRE11A	-1.8782	TOP3B	-2.7119
UNG	-2.8468	POLL	-1.7646	PMS1	-3.5292	PRKDC	-3.2701		
XRCC1	-1.7646	RAD23A	-1.5684	TREX1	-1.8652	RAD21	-2.9677		
		RAD23B	-1.9853			RAD50	-3.7046		
		RPA3	-2.8076			RAD51B	-2.1575		
		XAB2	-2.2181			RAD52	-2.5835		
		XPA	-2.2028			RAD54L	-3.5784		
						XRCC4	-2.5303		
						XRCC6	-2.0985		

**Çizelge 4.4:** U-87 MG hücre kültürlerinde 5 nM Trabectedin uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler

Baz Kesip Çıkarma Tamiri (BER)		Nukleotid Kesip Çıkarma Tamiri (NER)		Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)		DNA çift zincir kırıklarının Tamiri (DSBR)		Diğer Genler	
Gen Sembolü	Değişim	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı
NTHL1	+2.6674	ATXN3	-4.3607	MSH3	-2.9578	FEN1	+1.6999	EXO1	+2.0076
PARP1	-1.8082	BRIP1	-2.1803	MSH4	+3.8516	MRE11A	-1.641	MGMT	+3.8516
PARP2	+1.5427	CCNH	+1.6765	MSH5	-2.1803	PRKDC	-1.7833	RAD18	-1.5851
SMUG1	-1.7107	CDK7	+1.7117	PMS2	-1.859	RAD51B	-3.7962		
TDG	-1.9925	DDB2	+2.4716	TREX1	+2.1817	RAD54L	+1.6082		
		ERCC2	-1.771			XRCC4	-6.5639		
		ERCC3	-1.8334			XRCC6	+1.6999		
		ERCC4	-2.3531						
		ERCC5	+1.532						
		ERCC8	-1.7107						
		LIG1	+1.3245						
		RAD23B	-1.6639						
		RPA3	+1.7844						
		SLK	-1.5311						
		XAB2	+1.9937						
		XPA	+1.7236						
		XPC	+3.0641						

**Çizelge 4.5:** T98G hücre kültürlerinde 13 nM Trabectedin uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler

Baz Kesip Çıkarma Tamiri (BER)		Nukleotid Kesip Çıkarma Tamiri (NER)		Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)		DNA çift zincir kırıklarının Tamiri (DSBR)		Diğer Genler	
Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı
APEX1	+1.7168	BRIP1	-5.8169	MLH1	-3.3875	BRCA1	-1.7414	ATM	-28.6455
NEIL3	-3.0956	CCNH	-1.9456	MSH2	-3.1389	BRCA2	-4.3162	ATR	-4.7907
OGG1	+2.0276	CDK7	-1.9188	MSH3	-31.5647	FEN1	+3.2037	MGMT	-9.5814
UNG	-2.1291	DDB1	-1.8664	PMS1	-16.0027	LIG4	-1.7174	RFC1	-5.1346
XRCC1	-1.516	DDB2	-3.1827			MRE11A	-2.189	TOP3B	-2.2505
		ERCC1	-1.7414			PRKDC	-21.8603		
		ERCC2	+2.4619			RAD50	-11.3943		
		ERCC3	+2.9277			RAD51B	-8.5756		
		ERCC4	-2.0709			RAD51C	+2.0846		
		ERCC6	-5.7368			RAD51D	+2.0991		
		ERCC8	-2.5673			RAD52	-1.6024		
		LIG1	-1.8028			XRCC2	+2.4449		
		MMS19	-3.053			XRCC3	+1.9316		
		RAD23A	-1.5803			XRCC4	-27.2888		
		RAD23B	-2.0142			XRCC6	-1.9592		
		XPC	+1.7898						



**Çizelge 4.6:** U-87 MG hücre kültürlerinde 5 nM Trabectedin ve 8 Gy IR uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler

Baz Kesip Çıkarma Tamiri (BER)		Nukleotid Kesip Çıkarma Tamiri (NER)		Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)		DNA çift zincir kırıklarının Tamiri (DSBR)		Diğer Genler	
Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı
NTHL1	+1.6173	ATXN3	-2.0942	MSH2	+2.911	FEN1	+3.0814	ATR	+1.6977
OGG1	-4.5517	CCNH	+4,4493	MSH4	+9.4714	LIG4	+2.3031	EXO1	+2.895
PARP1	-1.7368	CDK7	+3,3026	MSH5	-1.5871	RAD50	+1.6061	MGMT	+9.4714
PARP2	+1.9911	DDB1	-1,5437	MSH6	+2.1193	RAD51B	-5.5651	RFC1	+3.0814
UNG	+2.2093	DDB2	+2,5911	PMS1	+1.5195	RAD51C	+2.0189	TOP3A	-1.6317
		ERCC1	-2,7443	TREX1	+2.3679	RAD54L	+2.4514	TOP3B	-2.229
		ERCC2	-1,995			XRCC2	+1.6061		
		ERCC3	-2,2601			XRCC3	-1.9405		
		ERCC4	-1,5762			XRCC4	-6.8991		
		ERCC5	+2,664			XRCC6	+1.9637		
		LIG1	+1,6977						
		PNKP	-2,9209						
		POLL	-1,6893						
		RAD23A	-1,6545						
		RAD23B	+1,6513						
		RPA3	+2,6273						
		SLK	+2,8355						
		XAB2	+1,584						
		XPA	+4,4493						
		XPC	+3,7674						

**Çizelge 4.7:** T98G hücre kültürlerinde 13 nM Trabectedin ve 6 Gy IR uygulamasının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki anlamlı değişiklikler

Baz Kesip Çıkarma Tamiri (BER)		Nukleotid Kesip Çıkarma Tamiri (NER)		Yanlış Eşleşme Tamiri (MMR)		DNA çift zincir kırıklarının Tamiri (DSBR)		Diğer Genler	
Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı	Gen Sembolü	Değişim oranı
APEX1	+2.1855	BRIP1	-4.4139	MLH1	-3.816	BRCA1	-2.3328	ATM	-21.2893
LIG3	-2.3167	CCNH	-1.5074	MSH2	-3.0358	BRCA2	+5.7675	ATR	-9.5935
NEIL2	-3.0781	DDB1	-3.3684	MSH3	-25.8493	FEN1	+4.9862	MGMT	-14.9498
NEIL3	-3.9233	DDB2	-2.7742	MSH5	-2.3654	LIG4	-3.0148	RFC1	-3.2991
PARP1	-2.1024	ERCC1	-2.8129	PMS1	-11.811	MRE11A	-3.6605	TOP3A	-3.7116
UNG	-1.5074	ERCC3	+1.9972	TREX1	+2.6536	PRKDC	-14.4406	TOP3B	-3.1867
XRCC1	-2.0168	ERCC4	-1.5714			RAD50	-10.1405		
		ERCC6	-3.978			RAD51	+1.6911		
		ERCC8	-3.5114			RAD51B	-6.8783		
		LIG1	-2.0592			RAD51C	+1.7629		
		MMS19	-3.2312			RAD51D	+1.6794		
		POLL	-2.6983			XRCC4	-29.2843		
		RAD23A	-2.349						
		RAD23B	-2.7742						
		SLK	-1.5714						

## 5. TARTIŞMA

Glioblastoma multiforme tümörlerinin tedavisinde, kemoterapi/radyoterapi ardışık uygulamasının etkinliği uzun yıllardır tartışılmaktadır. Gelişen teknolojiye paralel olarak mikronörocerrahi, iyonize radyasyon terapisi, radyolojik görüntüleme sistemleri ve yeni kemoterapötikler başarıyla geliştirilmiş olmasına karşın, GBM tümörlerinin tedavisi bulunamamıştır. GBM tedavisine katkı sağlayacak yeni yaklaşım ve tedavi protokollerinin geliştirilmesinde önemli bir basamak, *in vitro* hücre kültürlerinde antikanser aktivitesi bilinen ajanlar kullanılarak radyoterapinin yararlılığının artırılıp artırılamayacağını araştırılmasıdır. İlk defa bu tez çalışmasında, GBM hücre kültürlerinde (U-87 MG ve T98G) Trabectedin ve iyonize radyasyonun ardışık uygulamasının sitotoksik ve apoptotik etkiyi arttırdığı gösterilmiştir.

*In vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere üretilmiş ve özellikleri tanımlanmış çok sayıda insan GBM hücre hattı bulunmaktadır. Bunlar içerisinde, 2000'in üzerinde yayında (Clark ve diğ., 2010) kullanılan U-87 MG ve T98G GBM hücre hatları seçildi. Bu tez çalışmasında U-87 MG ve T98G hücre hatlarının seçilmesinin nedeni, Trabectedin'in yumuşak doku sarkomu, melanom, küçük hücreli akciğer kanseri, yumurtalık kanseri ve meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkilerine dair veriler olmasına rağmen GBM hücre hatlarına dair herhangi bir verinin olmayışıdır. (Reid ve diğ., 1996; Hendriks ve diğ., 1998; Izbicka ve diğ., 1998; Li ve diğ., 2001; Scotlandi ve diğ., 2002).

Bu çalışmada, literatür ile benzer şekilde Trabectedin'in sitotoksik aktivitesinin nanomolar konsantrasyonlarda (0.1 - 100 nM) gerçekleştiği bulundu. Trabectedin ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, kullanılan hücre kültürüne, muamele süresine ve kullanılan yöntemle bağlı olarak küçük farklılıklar oluşmasına karşın, çalışmaların büyük bölümünde Trabectedin'in nanomolar ve nanomolar altındaki (0.1 - 100 nM) konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Ghielmini ve diğ., 1998; Erba ve diğ., 2000; Erba ve diğ., 2001; Takahashi ve diğ., 2002).

Yansıtıcı araştırmalardaki dikkat edilmesi gereken hususlardan biri, çalışılan *in vitro*/*in vivo* modele uygulanan ilaç konsantrasyonlarının, klinikte kullanılan dozlara yakın veya örtüşüyor olmasıdır. Bu çalışmada kullanılan Trabectedin konsantrasyonlarının, klinik dozlarla örtüşmesi, çalışmanın kliniğe uygulanabilirliğini arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda, hücre kültürlerine nanomolar konsantrasyonlarda uygulanan Trabectedin'in, klinikte hastalara uygulanan dozlar ile örtüştüğü belirtilmiştir (van Kesteren ve diğ., 2000; Twelves ve diğ., 2003; Romero ve diğ., 2008).

Bu çalışmada, Trabectedin ile 48 saat muamele edilen U-87 MG hücre kültüründe IC<sub>50</sub> değeri 5 nM, T98G hücre kültüründe ise 13 nM hesaplandı. Itamochi ve diğerlerinin yaptığı çalışmada ise, Trabectedin ile 48 saat muamele edilen RMG1 ve RMG2 hücre

kültürlerinde IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 37 ve 34 nM bulunmuştur (Itamochi ve diğ., 2002). Takahashi ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, Trabectedin ile 96 saat muamele edilen MCF-7 hücre kültürlerinde IC<sub>50</sub> değeri 1.5 nM bulunmuştur (Takahashi ve diğ., 2002). IC<sub>50</sub> değerlerindeki bu farklılıkların, çalışmada kullanılan hücre kültürü çeşidi, Trabectedin ile muamele süresi ve sitotoksikite ölçümü için kullanılan yöntemlerden kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir.

Seçilen iyonize radyasyon dozları (4, 6, 8, 10, 12, 16 Gy) ve uygulama sürelerinin (72 saat), literatür ile uyumlu olduğu belirlendi. Kawakami ve diğerleri, U-87 MG'yi de içeren GBM hücre kültürlerine, iyonize radyasyonu 2.5, 5 ve 10 Gy dozlarda 72 saat süresince uygulamıştır (Kawakami ve diğ., 2005). Fujiwara ve diğerleri U-87 MG hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada 2, 5 ve 10 Gy iyonize radyasyonu 72 saat süresince uygulamışlardır (Fujiwara ve diğ., 2007). Sarcar ve diğerleri ise, U-87 MG ve T98G hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmada 2, 4, 6, 8, ve 10 Gy iyonize radyasyonu 72 saat süreyle uygulamışlardır (Sarcar ve diğ., 2011).

Hall ve Giaccia; hücrelerde etkin dozda iyonize radyasyona maruziyete rağmen, protein sentezi ve DNA replikasyonu gibi süreçlerin devam edebileceğini, hücrelerin bir veya iki defa daha mitoz geçirebileceğini belirtmiştir (Hall ve Giaccia, 2006). Bu bilgiler ışığında, iyonize radyasyonun hücre kültürlerinin canlılık düzeylerine etkilerini, hücre içi ATP miktarı (örn: ATP testi) ve metabolik aktivite ölçümü (örn: MTT, XTT, WST) gibi yöntemlerle saptamaya çalışmanın, yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceği düşünülerek bu çalışmada tripan mavisi yöntemi uygulandı. Literatürde de iyonize radyasyonun hücre canlılığı üzerindeki etkilerini tripan mavisi yöntemi ile ölçen çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Sun ve diğ., 2005; Fujiwara ve diğ., 2007; Schiewer ve diğ., 2012). Bu çalışmada, iyonize radyasyon'un U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde 24. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla 22 Gy ve 25 Gy; 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla 8 Gy ve 9.8 Gy; 72. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri ise, sırasıyla 6.2 Gy ve 5.7 Gy hesaplandı. Clark ve diğerlerinin çalışmasında, IR'nin U-87 MG hücre kültürlerinde 168. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ~6 Gy, T98G hücre kültürlerindeki 120. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ise 7 Gy bulunmuştur. Bu tez çalışmasında 48. saatte elde edilen veriler ile benzerlik gösteren değerler Clark ve diğerlerinin çalışmasında ancak 120. ve 168. saatlerde saptanmıştır (Clark ve diğ., 2007). Sürelerdeki bu farklılığın, Clark ve diğerlerinin ölçümlerde ATP assay kullanmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir.

Bu tez çalışmasında, 24'er saat süreyle 5 nM Trabectedin ve 8 Gy IR ile ardışık olarak muamele edilen U-87 MG hücre kültürlerinde, hücre canlılığının % 85.5 azaldığı belirlendi. Benzer şekilde 13 nM Trabectedin ve 6 Gy iyonize radyasyon ile muamele edilen T98G hücre kültürlerinde ise, hücre canlılığının % 70 azaldığı belirlendi. Literatürde, iyonize radyasyon ve Trabectedin'in birlikte uygulandığı yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada Romero ve diğerleri DU145, HeLa, HT29 ve HOP62 hücre kültürlerini model sistem olarak kullanmıştır. Ardışık uygulamanın HeLa ve DU-145 hücre kültürlerinde zenginleştirilmiş sitotoksik etkiye yol açtığını, diğer hücre kültürlerinde ise bu etkinin gözlenmediğini rapor etmiştir. Bu durum, ardışık uygulamanın yol açtığı etkilerin hücre

kültürlerine bağılı olarak değişebileceğini göstermektedir ve bu nedenle uygulamanın farklı hücre kültürlerinde de araştırılması hususunda gereklilik oluşturmaktadır. Romera ve diğerlerinin çalışmasında da, en yüksek etki bu çalışmaya benzer şekilde, hücre kültürlerine ardışık olarak IC<sub>50</sub> konsantrasyonunda (DU-145: 2.5 nM, HeLa: 30 nM) 24 saat Trabectedin ve 24 saat 4 Gy iyonize radyasyon uyguladığında saptanmıştır (Romero ve diğ., 2008). Bu tez çalışmasında, Romera ve diğerlerinininkinden farklı olarak 6 ve 8 Gy iyonize radyasyon uygulanması, GBM hücrelerinin tüm kanser tipleri içinde radyoterapi uygulamalarına en dirençli olmasından dolayı olabilir.

Literatürde Trabectedin aracılı sitotoksitenin hücre ölüm tiplerinden hangisi ile gerçekleştiğinin araştırıldığı çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. GBM hücre kültürlerinde ise tezin yazımı süreci içerisinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmalar çoğunlukla Trabectedin'in hücreyi apoptozis üzerinden ölüme götürdüğü yönünde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmada da Trabectedin ile muamele edilen T98G hücre kültürlerinde, apoptozis belirgin ölçüde artarken, U-87 MG hücre kültürlerinde ise anlamlı değişiklik gözlenmedi. Bu yüzden U-87 MG hücre kültürlerinde diğer hücre ölüm tiplerinin araştırılması konusunda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. T98G hücre kültürlerinde, ölçülen her iki apoptotik belirteçte de Trabectedin'in nanomolar konsantrasyonlarda en yüksek etkiyi gösterdiği saptanırken, daha düşük ve yüksek konsantrasyonlarda apoptotik etkinin azaldığı belirlendi. Gajate ve arkadaşları, Trabectedin'in lösemi hücre kültürlerinde sitokrom-c salınımını artırarak apoptozisi indüklediğini göstermiştir (Gajate ve diğ., 2002). Romera ve diğerleri de Trabectedin'in, nanomolar konsantrasyonlarda HeLa ve DU-145 hücre kültürlerinde apoptotik etki gösterdiğini belirlemiştir (Romero ve diğ., 2008).

Bu tez çalışmasında, ardışık olarak 24'er saat 13 nM Trabectedin ve 6 Gy iyonize radyasyon ile muamele edilen T98G hücre kültürlerinde, DNA fragmentasyonu (% 63.5) ve kaspaz 3/7 aktivasyonunun (kontrole kıyasla 5.35 kat) anlamlı şekilde arttığı belirlenirken U-87 MG hücre kültürlerinde bu etki gözlenmedi. Romera ve diğerleri de, ardışık uygulanan Trabectedin ve iyonize radyasyonun HeLa ve DU-145 hücre kültürlerinde zenginleştirilmiş apoptotik etkide anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını rapor etmiştir. Ardışık uygulanan Trabectedin ve radyasyonun T98G hücrelerinde apoptozisi hangi moleküller üzerinden indüklediğinin araştırılması hususunda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Beş nanomolar Trabectedin uygulanan U-87 MG hücre kültürlerinde, ATXN3 (NER mekanizmasında hasarın tanınmasında görevli), RAD51B (DSBR mekanizmasında kardeş kromatid üzerinde hasarsız homolog DNA dizisinin bulunmasında görevli) ve XRCC4 (homolog zincirlerin komplementer uçlardan birleştirilmesinde görevli) genlerinin mRNA düzeylerindeki anlamlı azalış, Trabectedin'in NER ve DSBR mekanizmalarında bozulmalara yol açarak etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Sekiz gray iyonize radyasyon uygulanan U-87 MG hücre kültürlerinde, ATXN-3, BRIP1, RAD23B, SLK (NER mekanizmasında hasarın tanınmasında görevli), ve ERCC4/XPF'nin (hasarlı bölgenin kesilmesinde görevli) mRNA düzeylerindeki anlamlı artış, NER mekanizmasının aktive olduğunu; MMR mekanizmasıyla ilişkili, MSH4 ve MSH5 (MutS ailesi üyeleri olan ve heterodimer oluşturup

aktifleşerek kromozomların ayrılmasında görevli) genlerinin mRNA düzeyindeki anlamlı artış, MMR mekanizmasının aktive olduğunu; RAD51D, RAD52 ve XRCC2' (DSBR mekanizmasında kardeş kromatid üzerinde hasarsız homolog DNA dizisinin bulunmasında görevli) genlerinin mRNA düzeyindeki anlamlı artış, DSBR mekanizmasının aktive olduğunu; RAD18 (replikasyonun ardından gerçekleşen tamir sistemleri için gerekli protein) geninin mRNA düzeyindeki anlamlı artış ise replikasyon sonrası tamir sistemlerinin uyarıldığını göstermektedir. İyonize radyasyon uygulaması sonrası, neredeyse tüm mekanizmalara ait genlerin mRNA düzeylerinde artış belirlenmesi, iyonize radyasyon aracılı hasarın hücre tarafından tamir edilmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ardışık uygulamada ise, OGG1 (BER mekanizmasında hasarlı bazın uzaklaştırmasında görevli), RAD51B ve XRCC4 genlerinin mRNA düzeylerinde anlamlı azalış, Trabectedin'in U-87 MG hücre kültürlerinde NER ve DSBR mekanizmalarında bozulmalara yol açarak, hücreleri iyonize radyasyona karşı hassaslaştırdığı yorumu yapılabilir.

On üç nanomolar Trabectedin uygulanan T98G hücre kültürlerinde, MGMT (hasarın doğrudan geri çevrilmesi mekanizmasında görevli) geninin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış, hasarın doğrudan geri çevrilmesi mekanizmasının baskılandığını; ERCC6 ve BRIP (NER mekanizmasında hasarın tanınmasında görevli) genlerinin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış NER mekanizmasının baskılandığını; MSH3 (MMR mekanizmasında hasarın tanınmasında görevli) ve PMS1 (MMR mekanizmasında çentiğin açılmasında görevli) genlerinin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış; MMR mekanizmasının baskılandığını; BRCA2 (DSBR mekanizmasında Rad51 nükleoprotein filamentinin görevini yapmasına destek sağlamada görevli), PRKDC, RAD50, (MRN kompleksinin bir üyesi olan RAD50 proteini kodlanır) RAD51B ve XRCC4 (homolog zincirlerin komplementer uçlardan birleştirilmesinde görevli) genlerinin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış, DSBR mekanizmasının baskılandığını; ATM ve ATR (DNA hasarına oluşturulan cevabın başlatılmasında görevli) genlerinin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış, DNA hasarına oluşturulan cevabın engellendiğini; RFC1 (DNA polimerazın görevini gerçekleştirmesine destek sağlar) geninin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış, DNA polimerazın görevini gerçekleştiremediğini göstermektedir. Bu bulgulara dayanılarak, Trabectedin'in hücrelerde DNA hasarına karşı oluşan cevapta, hasarın doğrudan geri çevrilmesi tamiri, MMR, NER ve DSBR mekanizmalarında bozulmalara yol açarak hücreyi apoptozise sürükleyebileceği yorumu yapılabilir. Altı gray iyonize radyasyon uygulanan T98G hücre kültürlerinde, NEIL3 (BER mekanizmasında hasarlı bazın çıkarılmasında görevli proteini kodlayan) geninin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış BER mekanizmasının baskılandığını; RAD50 ve ATR genlerinin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış, DSBR mekanizmasının baskılandığını ve DNA hasarına oluşturulan cevabın engellendiğini göstermektedir. Bu bulgulara dayanılarak iyonize radyasyonun hücrelerde DNA hasarına karşı oluşan cevapta, BER ve DSBR mekanizmalarında bozulmalara yol açarak etki gösterdiği yorumu yapılabilir. Ardışık uygulamada ise, MGMT (hasarın doğrudan geri çevrilmesi mekanizmasında görevli) geninin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış, hasarın doğrudan geri çevrilmesi mekanizmasının

baskılandığını; NEIL3 geninin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış, BER mekanizmasının baskılandığını; BRIP, ERCC6 ve ERCC8 (NER mekanizmasında hasarın tanınmasında görevli) genlerinin mRNA düzeylerindeki anlamlı azalış, NER mekanizmasının baskılandığını; MSH3 ve PMS1 genlerinin mRNA düzeylerindeki anlamlı azalış, MMR mekanizmasının baskılandığını; PRKDC, RAD50, RAD51B ve XRCC4 (DSBR mekanizmasında görevli) genlerinin mRNA düzeylerindeki anlamlı azalış, DSBR mekanizmasının baskılandığını; ATM ve ATR genlerinin mRNA düzeylerindeki anlamlı azalış, DNA hasarına oluşturulan cevabın engellendiğini; TOP3A (transkripsiyon sırasında DNA'nın 3 boyutlu yapısını değiştirmede görevli) geninin mRNA düzeyindeki anlamlı azalış, DNA süperheliks yapısının bozulduğunu göstermektedir. Bu bulgulara dayanılarak, Trabectedin'in T98G hücre kültürlerinde DNA hasarına karşı oluşan cevapta, hasarın doğrudan geri çevrilmesi tamiri, MMR, NER ve DSBR mekanizmalarında bozulmalara yol açarak hücreleri iyonize radyasyona karşı hassaslaştırdığı ve apoptozise yönlendirdiği yorumu yapılabilir.

## 6. SONUÇ

GBM hücre kültürlerinde (U-87 MG ve T98G) Trabectedin ve iyonize radyasyonun ardışık uygulamasının sitotoksik ve apoptotik etkileri, DNA tamir mekanizmalarını nasıl etkilediği ilk defa bu çalışma ile ortaya konuldu.

- Trabectedin'in U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde 24. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 8.4 nM ve 17 nM; 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri ise sırasıyla 5 ve 13 nM hesaplandı.

- İyonize radyasyon'un U-87 MG ve T98G hücre kültürlerinde 24. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla 22Gy ve 25 Gy; 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri, sırasıyla 8 Gy ve 9.8 Gy; 72. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri ise, sırasıyla 6.2 Gy ve 5.7 Gy hesaplandı.

- IC<sub>50</sub> değerlerinin altındaki dozlarda 24'er saat süreyle ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonun GBM hücre kültürlerinin çoğalımında anlamlı azalmaya yol açtığı gösterildi.

- Her iki hücre kültüründe de, 24 saat Trabectedin ve 24 saat iyonize radyasyon ardışık uygulamasının sitotoksik etkiyi zenginleştirdiği saptandı.

- Trabectedin'in artan konsantrasyonları (0.01-100 nM) ile muamele edilmiş T98G hücre kültürlerinin DNA fragmentasyon miktarında artan doza ve zamana bağlı olarak artış tespit edildi.

- Gözlenen apoptotik etkilerin doğrulanması için kaspaz 3/7 aktivitesi de ölçüldü. T98G hücre kültürlerinde, artan kaspaz 3/7 aktivitesi ile apoptozisi düzeyi arasında pozitif korelasyon gözlemlendi.

- IC<sub>50</sub> değerlerinin altındaki dozlarda 24'er saat süreyle ardışık uygulanan etkin Trabectedin ve iyonize radyasyonun T98G hücre kültürlerinde DNA fragmentasyon miktarlarında anlamlı artışa yol açtığı gözlemlendi.

- Gözlenen apoptotik etkilerin doğrulanması için kaspaz 3/7 enzim aktivitesi de ölçüldü. T98G hücre kültürlerinde, artan kaspaz 3/7 aktivitesi ile apoptozisi düzeyi arasında pozitif korelasyon gözlemlendi.

- U-87 MG hücre kültürlerinde 5 nM Trabectedin ve 8 Gy IR'ile, T98G hücre kültürlerinde ise 13 nM Trabectedin ve 6 Gy IR ardışık uygulamalarının DNA tamir mekanizması ile ilişkili genlerin mRNA düzeylerindeki anlamlı değişikliklere yol açtığı belirlendi.

- Her iki hücre kültüründe de Trabectedin'in, DNA tamir mekanizmaları ile ilişkili genlerin mRNA düzeylerinde anlamlı değişikliğe yol açarak iyonize radyasyon uygulamasına karşı hassaslaştırdığı belirlendi.



Bu tez çalışması, Trabectedin'in GBM hastalığının tedavisinde hücreleri radyoterapiye uygulaması için hassaslaştırmada kullanılacak etkin bir kemoterapötik olabileceğine dair temel veriler içermektedir. Bu verilerin etki mekanizmalarının aydınlatılacağı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

**Aas,, P.,A., Otterlei, M., Falnes, P.,O., Vagbo, C.,B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., Krokan, H.,E.,** 2003. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, Vol. **42**, pp. 859–863.

**Aggarwal, S., Yurlova, L., Simons, M.,** 2011. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol*, Vol. **21**, no.10, pp. 585-93.

**Arslan, D.,Ö., Korkmaz, G., Gözüaçık, D.,** 2011. Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, Vol **2**, no. 4, pp. 184-194.

**Atmaca, H., Bozkurt, E., Uzunoglu, S., Uslu, R., Karaca, B.,** 2013. A Diverse Induction Of Apoptosis By Trabectedin In Mcf-7 (Her2-/Er+) And Mda-Mb-453 (Her2 + /Er-) Breast Cancer Cells. *Annals of Oncology* Vol. **24**, pp. i30–i32.

**Aune, G., J., Takagi, K., Sordet, O., Guirouilh-Barbat, J., Antony, S., Bohr, V.,A., Pommier, Y.,** 2008. Von Hippel-Lindau-coupled and transcription-coupled nucleotide excision repair-dependent degradation of RNA polymerase II in response to trabectedin. *Clin Cancer Res*, Vol.**14**, pp. 6449–55.

**Barker, F., G., Simmons, M., L., Chang, S., M., Prados, M., D., Larson, D., A., Sneed, P., K., Wara, W., M., Berger, M., S., Chen, P., Israel, M., A., and Aldape, K., D.,** 2001. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. **51**, pp. 410-418.

**Beumer, J.,H., Buckle, T., Ouwehand, M., Franke, N.,E., Lopez-Lazaro, L., Schellens, J.,H., Beijnen, J.,H., van Tellingen, O.,** 2007. Trabectedin (ET-743, Yondelis) is a substrate for P-glycoprotein, but only high expression of P-glycoprotein confers the multidrug resistance phenotype. *Invest New Drugs*, Vol **25**, no.1, pp.1-7.

**Bredel, M., Pollack, I., F., Hamilton, R., L., and James, C., D.,** 1999. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res*, Vol. **5**, pp. 1786-92.

- Cahill, D.,P., Levine, K.,K., Betensky, R.,A., Codd, P.,J., Romany, C.,A., Reavie, L.,B., Batchelor, T.T., Futreal, P.,A., Stratton, M.,R., Curry, W.,T., Lafrate, A.,J., Louis, D.,N.,** 2007. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment. *Clin Cancer Res*, Vol. **1**, no.13, pp. 2038-45.
- Chen, Y., Liu, L.,** 2012. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, Vol. **64**, no. 7, pp. 640-665.
- Chinnaiyan, A.,M.,** 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, Vol. **1**, no. 1, pp. 5-15.
- Chou, T.,C., Talalay, P.,** 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, Vol. **22**, pp. 27-55.
- Clark, A.,J., Chan, D.,C., Chen, M.,Y., Fillmore, H., Dos Santos, W.,G., Van Meter, T.,E., Graf, M.,R., Broaddus, W.,C.,** 2007. Down-regulation of Wilms' tumor 1 expression in glioblastoma cells increases radiosensitivity independently of p53. *J Neurooncol*. Vol. **83**, no. 2, pp. 163-72.
- Clark, M.,J., Homer, N., O'Connor, B.,D., Chen, Z., Eskin, A., Lee, H., Merriman, B., Nelson, S.,F.,** 2010. U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. *PLoS Genet* Vol. **6**, no. 1, pp. e1000832.
- Cory, S., Adams, J.,M.,** 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. Vol. **2**, no. 9, pp. 647-56.
- Damia, G., Silvestri, S., Carrassa, L., Filiberti, L., Faircloth, G.,T., Liberi, G., Foiani, M., D'Incalci, M.,** 2001. Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. *Int J Cancer*, vol. **92**, pp. 583-588.
- D'Amours, D., and Jackson, S., P.,** 2002. The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. **3**, pp. 317-27.
- Davis, F., G., McCarthy, B., J., and Berger, M., S.,** 1999. Centralized databases available for describing primary brain tumor incidence, survival, and treatment: Central Brain Tumor Registry of the United States; Surveillance, Epidemiology, and End Results; and National Cancer Data Base. *Neuro-oncol* Vol. **1**, pp. 205-11.

**Dropcho, E., J., Rosenfeld, S., S., Vitek, J., Guthrie, B., L., and Morawetz, R., B.,** 1998. Phase II study of intracarotid or selective intracerebral infusion of cisplatin for treatment of recurrent anaplastic gliomas. *J Neurooncol*, Vol. **36**, pp. 191-198.

**Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X.,** 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):33-42.

**Duncan, T., Trewick, S.,C., Koivisto, P., Bates, P.,A., Lindahl, T., Sedgwick, B.,** 2002. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. **99**, pp. 16660–16665.

**Elmore, S.,** 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, Vol. **35**, no. 4, pp. 495-516.

**Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S.,** 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, Vol. **1**, no. 391, pp. 43-50.

**Erba, E., Bergamaschi, D., Bassano, L., Damia, G., Ronzoni, S., Faircloth, G.,T., D'Incalci, M.,I.,** 2001. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur J Cancer*, Vol. **37**, pp. 97–105.

**Erba, E., Bergamaschi, D., Bassano, L., Ronzoni, S., Di Liberti, G., Muradore, I., Vignati, S., Faircloth, G., Jimeno, J., D'Incalci, M.,** 2000. Isolation and characterization of an IGROV-1 human ovarian cancer cell line made resistant to Ecteinascidin-743 (ET-743). *Br J Cancer*, Vol. **82**, pp. 1732–9.

**Evans, S., M., Judy, K., D., Dunphy, I., Jenkins, W., T., Nelson, P., T., Collins, R., Wileyto, E., P., Jenkins, K., Hahn, S., M., Stevens, C., W., Judkins, A., R., Phillips, P., Georger, B., and Koch, C., J.,** 2004. Comparative measurements of hypoxia in human brain tumors using needle electrodes and EF5 binding. *Cancer Res*, Vol. **64**, pp. 1886-92.

**Friedman, H., S., McLendon, R., E., Kerby, T., Dugan, M., Bigner, S., H., Henry, A., J., Ashley, D., M., Krischer, J., Lovell, S., Rasheed, K., Marchev, F., Seman, A., J., Cokgor, I., Rich, J., Stewart, E., Colvin, O., M., Provenzale, J., M., Bigner, D., D., Haglund, M., M., Friedman, A., H., and Modrich, P., L.,** 1998. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol*, Vol. **16**, pp. 3851-7

**Fujiwara, K., Iwado, E., Mills, G.B., Sawaya, R., Kondo, S., Kondo, Y.,** 2007. Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy. *Int J Oncol*, Vol. **31**, no. 4, pp. 753-60.

**Fulton, D.S., Urtasun, R., C., Scott-Brown, I., Johnson, E.S., Mielke, B., Curry, B., Huyser-Wierenga, D., Hanson, J., Feldstein, M.,** 1992. Increasing radiation dose intensity using hyperfractionation in patients with malignant glioma. Final report of a prospective phase I-II dose response study. *J Neurooncol*, vol. **14**, pp. 1.

**Gago, F., Hurley, L.H.,** 2002. Devising a structural basis for the potent cytotoxic effects of ecteinascidin 743. In: Demeunynck, M., Bailly, C., Wilson, W., D., (ed), Small molecule DNA and RNA binders: From synthesis to nuclear acid complexes. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, pp. 643-675.

**Galanis, E., J., Buckner, D., Kimmel, R., Jenkins, B., Alderete, J., O'Fallon, C., H., Wang, B., Scheithauer, W., and James, C., D.,** 1998. Gene amplification as a prognostic factor in primary and secondary high-grade malignant gliomas. *Int J Oncol*, Vol **13**, pp. 717-24.

**Gajate, C., An, F., Mollinedo, F.,** 2002. Differential cytostatic and apoptotic effects of ecteinascidin-743 in cancer cells. Transcription-dependent cell cycle arrest and transcription-independent JNK and mitochondrial mediated apoptosis. *J Biol Chem*. Vol. **1**, no, 277, pp. 41580-9.

**Ghielmini, M., Colli, E., Erba, E., Bergamaschi, D., Pampallona, S., Jimeno, J., Faircloth, G., Sessa, C.,** 1998. *In vitro* scheduledependency of myelotoxicity and cytotoxicity of Ecteinascidin 743 (ET-743). *Ann Oncol*, Vol. **9**, pp. 989-93

**Gomez-Manzano, C., J., Fueyo, A., P., Kyritsis, P., A., Steck, J., A., Roth, T., J., McDonnell, K., D., Steck, V., Levin, A., and Yung, W., K.,** 1996. Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. *Cancer Res*, Vol. **56**, pp. 694-9.

**Guido, F.,** 2009. DNA Repair and Resistance of Gliomas to Chemotherapy and Radiotherapy. *Mol Cancer Res*, Vol. **7**, pp. 989.

**Haas-Kogan, D., A., Yount, G., Haas, M., Levi, D., Kogan, S., S., Hu, L., Vidair, C., Deen, D., F., Dewey, W., C., and Israel, M., A.,** 1996. p53-dependent G1 arrest and p53-

independent apoptosis influence the radiobiologic response of glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. **36**, pp. 95-103.

**Hakem, R.**, 2008. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO Journal*, Vol. **27**, pp. 589–605.

**Hall, E., J.**, 1988. Radiobiology for the Radiologist, Third ed. Lippincott Company, Philadelphia. USA.

**Hall, E.,J., Giaccia, J.,A.**, 2006. Radiobiology for the Radiologist: 6th edition. Lippincott Williams and Wilkins Publishing. Philadelphia. USA.

**He, J., Olson, J., J., and James, C., D.**, 1995. Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines. *Cancer Res*, Vol. **55**, pp. 4833-6

**Hegi, M., E., Diserens, A., C., Godard, S., Dietrich, P., Y., Regli, L., Ostermann, S., Otten, P., Van Melle, G., de Tribolet, N., and Stupp, R.**, 2004. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*. Vol. **10**, pp. 1871-1874.

**Hegi, M., E., Diserens, A., C., Gorlia, T., Hamou, M., F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J., M., Hainfellner, J., A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J., E., Hau, P., Mirimanoff, R., O., Cairncross, J., G., Janzer, R., C., and Stupp, R.**, 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, Vol. **352**, pp. 997-1003.

**Helleday, T., Lo, J., van Gent, D.,C., Engelward, B.,P.**, 2007. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)*, Vol. **1**, no. 6, pp. 923-35.

**Hendriks, H.,R., Fiebig, H.,H., Giavazzi, R., Langdon, S.,P., Jimeno, G.,T., Faircloth, G.,T.**, 1998. High antitumour activity of ET743 against human tumour xenografts from melanoma, nonsmall-cell lung and ovarian cancer. *Ann Oncol*, Vol. **10**, pp. 1233–40.

**Herrero, A.,B., Martín-Castellanos, C., Marco, E., Gago, F., and Moreno, S.**, 2006. Cross-Talk between Nucleotide Excision and Homologous Recombination DNA Repair Pathways in the Mechanism of Action of Antitumor Trabectedin. *Cancer Res*, Vol. **15**, no. 66, pp. 8155.

**Hess, K., R.**, 1999. Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *J Neurooncol*, Vol. **42**, pp. 227-31.

**Hirose, Y., M., Berger, S., and Pieper, R., O.**, 2001. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res*, Vol. **61**, pp. 1957-63

**Hochberg, F., H., and Pruitt, A.**, 1980. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology*, Vol **30**, pp. 907-11

**Hoeijmakers, J., H.**, 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* Vol. **411**, pp. 366-74

**Itamochi, H., Kigawa, J., Sultana, H., Iba, T., Akeshima, R., Kamazawa, S., Kanamori, Y., Terakawa, N.**, 2002. Sensitivity to anticancer agents and resistance mechanisms in clear cell carcinoma of the ovary. *Jpn J Cancer Res*. Vol. **93**, no. 6, pp. 723-728.

**Izbicka, E., Lawrence, R., Raymond, E., Eckhardt, G., Faircloth, G., Jimeno, J., Clark, G., Von Hoff, D.,D.**, 1998. *In vitro* antitumor activity of the novel marine agent, ecteinascidin-743 (ET-743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. *Ann Oncol*, Vol. **9**, pp. 981-7.

**Jann, N.,S., Gaspar, J.,K., James, C.,D., Plummer, R., Calvert, H., Weller, M., Wick, W.**, 2008. Mechanisms of Chemoresistance in Malignant Glioma. *Clin Cancer Res*. Vol. **15**, no. 14, pp. 2900-2908.

**Jackson, S.,P., Jeggo, P.,A.**, 1995. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem Sci*, Vol. **20**, no. 10, pp. 412-5.

**Joza, N., Susin, S.,A., Daugas, E., Stanford, W.,L., Cho, S.,K., Li, C.,Y., Sasaki, T., Elia, A.,J., Cheng, H.,Y., Ravagnan, L., Ferri, K.,F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.,Y., Mak, T.,W., Zúñiga-Pflücker, J.,C., Kroemer, G., Penninger, J.,M.**, 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. Vol. **29**, no. 410, pp. 549-54.

**Jiricny, J.**, 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. **7**, pp. 335-346

**Kawakami, K., Kawakami, M., Liu, Q., Puri, R.,K.,** 2005. Combined effects of radiation and interleukin-13 receptor-targeted cytotoxin on glioblastoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. **1**, no. 63, pp. 230-7.

**Kerr, J., F., Winterford, C., M., and Harmon, B., V.,** 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, Vol. **73**, pp. 2013-2026.

**Khanna, K.,K., and Jackson, S., P.,** 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, Vol. **27**, pp. 247 – 254.

**Kiang, J.,G., Garrison, B.,R., Gorbunov, N.,V.,** 2010. Radiation Combined Injury: DNA Damage, Apoptosis, and Autophagy. 2010. *Adaptive Medicine*, Vol. **2**, no. 1, pp. 1-10.

**Kischkel, F.,C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.,H., Peter, M.,E.,** 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, Vol. **15**, no. 14, pp. 5579-5588.

**Kitchens, D., L., Snyder, E., Y., and Gottlieb, D., I.,** 1994. FGF and EGF are mitogens for immortalized neural progenitors. *J Neurobiol*, Vol. **25**, pp. 797-807.

**Kornblum, H., I., R., Hussain, J., Wiesen, P., Miettinen, S., D., Zurcher, K., Chow, Derynck, R., and Werb, Z.,** 1998. Abnormal astrocyte development and neuronal death in mice lacking the epidermal growth factor receptor. *J Neurosci Res*, Vol. **53**, pp. 697-71

**Kraus, A., Gross, M., W., Knuechel, R., Munkel, K., Neff, F., and Schlegel, J.,** 2000. Aberrant p21 regulation in radioresistant primary glioblastoma multiforme cells bearing wild-type p53. *J Neurosurg*, Vol. **93**, pp. 863-72

**Kraus, J., A., Felsberg, J., Tonn, J., C., Reifenberger, G., and Pietsch, T.,** 2002. Molecular genetic analysis of the TP53, PTEN, CDKN2A, EGFR, CDK4 and MDM2 tumour-associated genes in supratentorial primitive neuroectodermal tumours and glioblastomas of childhood. *Neuropathol Appl Neurobiol*, Vol. **28**, pp. 325-33.

**Krogh, B.,O., Symington, L.,S.,** 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet*, Vol. **38**, pp. 233–271

**Kulaksız, G., Sancar, A.,** 2007. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Turk J Biochem*, Vol. **32**, no. 3, pp. 104–111.



**Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D., R., Gokaslan, Z., L., Shi, W., DeMonte, F., Lang, F., F., McCutcheon, I., E., Hassenbusch, S., J., Holland, E., Hess, K., Michael, C., Miller, D., and Sawaya, R.,** 2001. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*, Vol. **95**, pp. 190-198.

**Lang, F., F., Miller, D., C., Koslow, M., and Newcomb, E., W.,** 1994. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg*, Vol. **81**, pp. 427-36.

**Lang, F., F., Yung, W., K., Raju, U., Libunao, F., Terry, N., H., and Tofilon, P., J.,** 1998. Enhancement of radiosensitivity of wild-type p53 human glioma cells by adenovirus-mediated delivery of the p53 gene. *J Neurosurg*, Vol. **89**, pp. 125-32.

**Lee, J.,M., Bernstein, A.,** 1993. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *PNAS*, Vol. **90**, pp. 5742-46.

**Li, L.,Y., Luo, X., Wang, X.,** 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. Vol. **5**, no. 412, 95-99.

**Li, W.,W., Takahashi, N., Jhanwar, S., Cordon-Cardo, C., Elisseyeff, Y., Jimeno, J., Faircloth, G., Bertino, J.,R.,** 2001. Sensitivity of soft tissue sarcoma cell lines to chemotherapeutic agents: identification of ecteinascidin-743 as a potent cytotoxic agent. *Clin Cancer Res*, Vol. **7**, pp. 2908–2911.

**Leibeling, D., Laspe, P., Emmert, S.** 2006. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol*, Vol. **37**, pp. 225–238

**Lieber, M., R.,** 2010. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annu Rev Biochem*, Vol. **79**, pp. 181–211.

**Locksley, R.,M., Killeen, N., Lenardo, M.,J.,** 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, Vol, **23**, no. 104, pp. 487-501.

**Louis, D., N.,** 1997. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology. *Brain Pathol*, Vol. **7**, pp. 755-64

**Martin, L.,M., Marples, B., Coffey, M., Lawler, M., Lynch, T.,H., Hollywood, D., Marignol, L.,** 2010. DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treat Rev*, Vol. **36**, no. 7, pp. 518-27.

**Maurizio, D., and Galmarini, C.,M.,** 2010. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. **9**, pp. OF1–7.

**Nagane, M., Huang, H.,J., Cavenee, W.,K.,** 1999. Causes of drug resistance and novel therapeutic opportunities for the treatment of glioblastoma. *Drug Resist Updat*, Vol. **2**, no. 1 pp. 30-37.

**Newlands, E., S., Blackledge, G., R., Slack, J., A., Rustin, G., J., Smith, D., B., Stuart, N., S., Quarterman, C., P., Hoffman, R., Stevens, M., F., Brampton, M., H.,** 1992. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *Br J Cancer*, Vol. **65**, pp. 287-91.

**O’Driscoll, M., Jeggo, P.,A.,** 2006. The role of double-strand break repair—insights from human genetics. *Nat Rev Genet*, Vol. **7**, pp. 45–54.

**Ohgaki, H., Schauble, B., zur Hausen, A., von Ammon K., and Kleihues, P.,** 1995. Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic braintumours. *Virchows Arch*, Vol. **427**, pp. 113-8.

**Nazzaro, J., M., and Neuwelt, E., A.,** 1990. The role of surgery in the management of supratentorial intermediate and high-grade astrocytomas in adults. *J Neurosurg*, Vol. **73**, pp. 331-344.

**Nicoloff, J.,A., Hoekstra, M.,F.,**1996. DNA Repair in Higher Eukaryotes, Vol 2. Human Press Inc., Totowa, New Jersey.

**Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G.,** 2000. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, Vol. **15**:289-302.

**Rasheed, B., K., McLendon, R., E., Herndon, J., E., Friedman, H., S., Friedman, A., H., Bigner, D., D., and Bigner, S., H.,** 1994. Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res*, Vol. **54**, pp. 1324-30.

**Reid, J.,M., Walker, D.,L., Ames, M.,M.,** 1996. Preclinical pharmacology of ecteinascidin 729, a marine natural product with potent antitumor activity. *Cancer Chemother Pharmacol*, Vol. **38**, pp. 329–334.

**Rinehart, K.,L.,** 2000. Antitumor compounds from tunicates. *Medicinal Research Reviews*. Vol. **20**, no. 1, pp. 1-27.

**Romero, J., Zapata, I., Córdoba, S., Jimeno, J.,M., López-Martín, J.,A., Tercero, J.,C., De La Torre, A., Vargas, J.,A., Molerón, R., Sánchez-Prieto, R., 2008. In vitro radiosensitisation by trabectedin in human cancer cell lines. *Eur J Cancer*, Vol. **44**, no. 12, pp. 1726-33.**

**Quigley, M., R., and Maroon, J., C., 1991. The relationship between survival and the extent of the resection in patients with supratentorial malignant gliomas. *Neurosurgery*, Vol. **29**, pp. 385-8.**

**Saelens, X., Festjens, N., Vande, W., L., van Gorp, M., van Loo, G., Vandenameele, P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, Vol. **12**, no. 23, pp. 2861-2874.**

**Sarcar, B., Kahali, S., Prabhu, A.,H., Shumway, S.,D., Xu, Y., Demuth, T., Chinnaiyan, P., 2011. Targeting radiation-induced G(2) checkpoint activation with the Wee-1 inhibitor MK-1775 in glioblastoma cell lines. *Mol Cancer Ther*, Vol. **10**, no. 12, pp. 2405-2414.**

**Scharf, B., Arbeit, O., J., Ashcroft, M., Brown, J., M., Bruick, R., K., Chapman, J., D., Evans, S., M., Giaccia, A., J., Harris, A., L., Huang, E., Johnson, R., Kaelin, W., Koch, C., J., Maxwell, P., Mitchell, J., Neckers, L., Powis, G., Rajendran, J., Semenza, G., L., Simons, J., Storkebaum, E., Welch, M., J., Whitelaw, M., Melillo, G., and Ivy, S., P., 2004. Proceedings of the Oxygen Homeostasis/Hypoxia Meeting. *Cancer Res*, Vol. **64**, pp. 3350-3356**

**Schiewer, M.,J., Den, R., Hoang, D.,T., Augello, M.,A., Lawrence, Y.,R., Dicker, A.,P., Knudsen, K.,E., 2012. mTOR is a selective effector of the radiation therapy response in androgen receptor-positive prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, Vol. **9**, no. 19, pp. 1-12.**

**Schuler, M., Green, D., R., 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*, Vol. **29**, pp. 684-688.**

**Scotlandi, K., Perdichizzi, S., Manara, M.,C., Serra, M., Benini, S., Cerisano, V., Strammiello, R., Mercuri, M., Reverter-Branchat, G., Faircloth, G., D'Incalci, M., Picci, P., 2002. Effectiveness of Ecteinascidin-743 against drug-sensitive and -resistant bone tumor cells. *Clin Cancer Res*, Vol. **8**, pp. 3893–3903**

**Sedgwick, B., Bates, P.,A., Paik, J., Jacobs, S.,C., Lindahl, T., 2007 Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)*, Vol. **6**, pp. 429–442.**

**Shapiro, W., R., Green, S., B., Burger, P., C., Selker, R., G., VanGilder, J., C., Robertson, J., T., Mealey, J., Ransohff, J. and Mahaley, M., S.,** 1992. A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma. *J Neurosurg*, Vol, **76**, pp. 772-81.

**Shinomiya, N.,** 2001. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis. *J Cell Mol Med*, Vol. **5**, no. 3, pp. 240-53.

**Shinomiya, N., Kuno, Y., Yamamoto, F., Fukasawa, M., Okumura, A., Uefuji, M., Rokutanda, M.,** 2000. Different mechanisms between premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis in X-irradiated U937 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Vol. **1**, no. 47, pp. 767-77.

**Silber, J.,R., Bobola, M.,S., Blank A, Chamberlain, C., C.,** 2012. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems. *Biochim Biophys Acta*, Vol. **1826**, no. 1, pp. 71-82.

**Sinclair, W.,K.,** 1968. Cyclic x-ray responses in mammalian cells in vitro. *Radiat Res*, Vol. **3**, pp. 620-43.

**Stein, G., H.,** 1979. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 99: 43-54.

**Stupp., R., Mason, W., Van Den Bent, M., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M., Brandes, A., Cairncross, J., Lacombe, D., and Mirimanoff, R.,** 2004. Concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) for newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM). Conclusive result of a randomized phase III trial by the EORTC Brain and RT Groups and NCIC Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, Vol. **22**, pp. 1S.

**Stupp., R., Mason, W., Van Den Bent, M., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M., Belanger, K., Brandes, A., A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R., C., Ludwin, S., K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J., G., Eisenhauer, E., and Mirimanoff, R., O.,** 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, Vol **352**, pp. 987-96.

**Su, T.,T.,** 2006. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu Rev Genet*, Vol. **40**, pp. 187-208

**Sun, Y., Tran, B.,N., Worley, L.,A., Delston, R.,B., Harbour, J.,W.,** 2005. Functional Analysis of the p53 Pathway in Response to Ionizing Radiation in Uveal Melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. **46**, no. 5, pp. 1561-1564.

**Takahashi, N., Li, W., Banerjee, D., Guan, Y., Wada-Takahashi, Y., Brennan, M.,F., Chou, T.,C., Scotto, K.,W., Bertino, J.,R.,** 2002. Sequence-dependent synergistic cytotoxicity of ecteinascidin-743 and paclitaxel in human breast cancer cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Research*, Vol. **62**, no. 23, pp. 6909-6915.

**Te'oule, R.,** 1987. Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol*, Vol. **51**, pp. 573-589.

**Tjong, S., C.,** 2009. *Advances in Biomedical Sciences and Engineering*. Bentham Science Publishers. IL, USA.

**Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., Morita, T.,** 1996. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. **93**, pp. 6236–6240.

**Twelves, C., Hoekman, K., Bowman, A., Vermorken, J.,B., Anthoney, A., Smyth, J., van Kesteren, C., Beijnen, J.,H., Uiters, J., Wanders, J., Gomez, J., Guzmán, C., Jimeno, J., Hanauske.,** 2003. A Phase I and pharmacokinetic study of Yondelis (Ecteinascidin-743; ET-743) administered as an infusion over 1 h or 3 h every 21 days in patients with solid tumours. *Eur J Cancer*, Vol. **39**, pp. 1842–51.

**Ute, M., M., and Oleksi, P.,** 2003. The MDM2-p53 Interaction. *Mol Cancer Res December*, Vol. **1**, pp. 1001.

**van Heyningen., P., Calver, A., R., and Richardson, W., D.,** 2001. Control of progenitor cell number by mitogen supply and demand. *Curr Biol*, Vol. **11**i pp. 232-241.

**van Kesteren, C., Cvitkovic, E., Taamma, A., López-Lázaro, L., Jimeno, J.,M., Guzman, C., Math t R.,A., Schellens, J.,H., Misset, J.,L., Brain, E., Hillebrand, M.,J., Rosing, H., Beijnen, J.,H.,** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel marine-derived anticancer agent ecteinascidin 743 in a phase I dose-finding study. *Clin Cancer Res*, Vol. **6**, pp. 4725–4732.

**van Rijn, J., Heimans, J., J., van den Berg, J., van der Valk, P., and Slotman, B., J.,** 2000. Survival of human glioma cells treated with various combination of temozolomide and X-rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. **47**, pp. 779-84.

**Verkhratsky, A., and Butt, A.,** 2007. Introduction to Glia, in *Glial Neurobiology: A Textbook*. 1st ed. Chichester, UK, John Wiley & Sons Ltd, 96-121.

**Von Sonntag, C.,** 1987. *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, London.

**Walker, M., D., Alexander, E., Hunt, W., E., MacCarty, C., S., Mahaley, M., S., Mealey, J., Norrell, H., A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, C., B., Gehan, E., A., and Strike, T., A.,** 1978. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*, Vol. **49**, pp. 333-343.

**Ward, J.,F.,** 1985. Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res* 1985; 104: 103-111.

**Ward, J.,E.,** 1998. Nature of lesions formed by ionizing radiation. In *DNA damage and Repair*. Human Press, Totawa NJ, Vol 2.

**Wedge, S., R., Porteous, J., K., Glaser, M., G., Marcus, K., and Newlands, E., S.,** 1997. In vitro evaluation of temozolomide combined with X-irradiation. *Anticancer Drugs*, Vol. **8**, pp. 92-97.

**Willers, H., J., Dahm-Daphi., and Powell, S., N.,** 2004. Repair of radiation damage to DNA. *Br J Cancer*, Vol. **90**, pp. 1297-1301.

**Wilson, III., D.,M., Bohr, V.,A.,** 2007. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*, Vol. **6**, pp. 544–559

**Yount, G., L., Haas-Kogan, D., A., Vidair, C., A., Haas, M., Dewey, W., C., and Israel, M., A.,** 1996. Cell cycle synchrony unmasks the influence of p53 function on radiosensitivity of human glioblastoma cells. *Cancer Res*, Vol. **56**, pp. 500-506.

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

**Adı ve Soyadı:** Emir Bozkurt

**Doğum yeri ve tarihi:** Fatsa / 07.06.1989

**Adres:** 4586 Sokak No:35 K:5 D:10 Karabağlar / İZMİR

**Telefon:** Ev: 0232 226 06 66, Cep: 0 555 489 02 97

**E mail:** emrbzkr@gmail.com

### **EĞİTİM BİLGİLERİ**

- 2011 -** Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)
- 2011-2012** Pedagojik Formasyon Sertifikası
- 2007-2011** Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
(Lisans)
- 2003-2006** İzmir Karataş Lisesi

### **YABANCI DİL**

İngilizce

## **1. BİLİMSEL MAKALELER**

### **A. SCI ve SCI-expanded kapsamında taranan dergilerde yapılan yayınlar (basım tarihine göre):**

**A1. Bozkurt E**, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Effects of Thymus serpyllum Extract on Cell Proliferation, Apoptosis and Epigenetic Events in Human Breast Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, **64(8)**, 1245–1250, 2012.

**A2.** Karaca B, Atmaca H, **Bozkurt E**, Kisim A, Uzunoglu S, Karabulut B, Sezgin C, Sanli UA, Uslu R. Combination of AT-101/cisplatin overcomes chemoresistance by inducing apoptosis and modulating epigenetics in human ovarian cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2013 Jun;**40(6):3925-33**.

**A3.** Atmaca H, **Bozkurt E**, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. A diverse induction of apoptosis by trabectedin in MCF-7 (HER2-/ER+) and MDA-MB-453 (HER2+/ER-) breast cancer cells. *Toxicol Lett.* 2013 Jun 20. pii: S0378-4274(13)01076-X. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.06.213. [Epub ahead of print].

### **B. SCI kapsamı dışındaki dergilerde yayınlanan makaleler :**

**B1. Emir Bozkurt**, Harika Atmaca, Selim Uzunoğlu. Glioblastoma Tümörlerinde Çoklu İlaç Direnci. *Genel Tıp Dergisi (Yayınlanmak üzere kabul edildi)*.

## **2. BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLER**

### **C. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler**

**C1. Bozkurt E**, Atmaca H, Karaca B, Kısım A, Uzunoğlu S, Uslu R. Preliminary Study of the Thyme (Thymus serpyllum) Extract On Human Normal and Breast Cancer Cells. *EACR-Anticancer Agents Research Congress, P: 3 Antalya, Turkey, 13-16 September, 2011.*

**C2.** Atmaca H, Kısım A, **Bozkurt E**, Çakar B, Varol U, Karabulut B, Uzunoğlu S, Sezgin C, Uslu R, Karaca B. Dynamic Measurement Of Anti-proliferative Effects Of At-101 In Human Breast Cancer Cells By A Novel, Label-free, And Real-time Cell Based Xcelligence System. *EACR-Anticancer Agents Research Congress, P: 35 Antalya, Turkey, 13-16 September, 2011.*

**C3.** Kısım A, Atmaca H, **Bozkurt E**, Muslu U, Çakar B, Uzunoğlu S, Sezgin C, Karabulut B, Uslu R, Karaca B. Synergistic Cytotoxic/Apoptotic Effects Of Octreotide In Combination With Docetaxel In Human Breast Cancer Cells. *EACR-Anticancer Agents Research Congress, P: 36 Antalya, Turkey, 13-16 September, 2011.*



**C4.** Burcak Karaca, Harika Atmaca, Asli Kısım, **Emir Bozkurt**, Burcu Çakar, Zeki Surmeli, Pinar Gursoy, Bulent Karabulut, Selim Uzunoglu, Canfeza Sezgin, Ruchan Uslu. Comparison of a novel, label-free, and real-time cell based system (xCELLigence) with a conventional viability assay (XTT) to determine the anti-proliferative effect of AT-101 in human breast cancer cells. **IMPAKT Breast Cancer Conference 2012, Brussels, Belgium, 3-5 May, 2012.**

**C5.** **Emir Bozkurt**, Harika Atmaca, Selim Uzunoglu, Ruchan Uslu, Burcak Karaca. P53 Modulates Trabectedin Mediated Cytotoxicity in Glioblastoma Multiforme Cells (U-87MG And T98G). **11th International Congress on Targeted Anticancer Therapies, Paris, France, 4 – 6 March 2013.**

**C6.** Harika Atmaca, **Emir Bozkurt**, Selim Uzunoglu, Ruchan Uslu, Burcak Karaca. A Diverse Induction of Apoptosis by Trabectedin in MCF-7 (HER2-/ER+) And MDA-MB-453 (HER2 + /ER-) Breast Cancer Cells. **11th International Congress on Targeted Anticancer Therapies, Paris, France, 4 – 6 March 2013.**

**C7.** Burcu Cakar, Gülcan Bulut, Asli Kisim, Harika Atmaca, **Emir Bozkurt**, Ruchan Uslu, Burcak Karaca, AT-101 (-/- Gossypol) in Combination with Trastuzumab Triggers Apoptosis through Inhibiting Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1 Protein Levels in Human HER2-positive Breast Cancer Cells. **IMPAKT, Brussels, Belgium, 4-6 May 2013.**

**C8.** Burcu Cakar, Pinar Gursoy, Harika Atmaca, Asli Kisim, **Emir Bozkurt**, Selim Uzunoglu, Canfeza Sezgin, Ulus Ali Sanli, Bulent Karabulut, Ruchan Uslu, Burcak Karaca Paclitaxel in combination with at-101 induces apoptosis via suppressing Bcl-2, bcl-XL, mcl-1 proteins in human breast cancer cells. **ASCO Annual Meeting, , Chicago, USA, May 31-June 4 2013.**

**C9.** Harika Atmaca, **Emir Bozkurt**, Burcu Cakar, Zeki Gokhan Surmeli, Selim Uzunoglu, Ruchan Uslu, Burcak Karaca. Trabectedin induces mitochondrial membrane potential dissipation and reactive oxygen species generation in breast cancer cells. **ASCO Annual Meeting, , Chicago, USA, May 31-June 4 2013.**

**C10.** Senem Demirci Alanyali, **Emir Bozkurt**, Hilmi Alanyali, Burcak Karaca, Ruchan Uslu. Radiosensitization of HER2 positive breast cancer cell lines with trastuzumab. **ASCO Annual Meeting, , Chicago, USA, May 31-June 4 2013.**

#### **D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler**

**D1.** Burçak Karaca, Uğur Muslu, Burcu Çakar, Asli Kısım, **Emir Bozkurt**, Harika Atmaca, Selim Uzunoglu, Canfeza Sezgin, Bülent Karabulut, Rüşhan Uslu. Meme Kanseri Hücre Kültürlerinde AT-101'in Sitotoksik Etkilerinin Xcelligence Sistemi ile Dinamik Takipi ve Bulguların XTT Yöntemiyle Karşılaştırılması. **8. Ulusal Tıbbi Onkoloji Kongresi, Muğla, 14-18 Eylül 2011.**

**D2.** Burçak Karaca, Burcu Çakar, Zeki Sürmeli, Pınar Gürsoy, Uğur Muslu, **Emir Bozkurt**, Harika Atmaca, Aslı Kısım, Selim Uzunoğlu, Canfeza Sezgin, Bülent Karabulut, Rüçhan Uslu. Zoledronik Asit'in Serin/Treonin Protein Fosfataz İnhibitörleriyle Kombinasyonunun İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Akt Protein Düzeyine Etkisinin Araştırılması. **4. Tıbbi Onkoloji Kongresi, Antalya, 21-25 Mart 2012.**

**D3.** Umut Varol, Zeki Sürmeli, Pınar Gürsoy, Burcu Çakar, Uğur Muslu, Aslı Kısım, **Emir Bozkurt**, Harika Atmaca, Canfeza Sezgin, Bülent Karabulut, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. Dose-taksel'e Dirençli Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Dose-taksel'in Sitotoksik ve Apoptotik Etkisinin Zoledronik Asit Ön Muamelesiyle Arttırılması. **4. Tıbbi Onkoloji Kongresi, Antalya, 21-25 Mart 2012.**

**D4.** **Emir Bozkurt**, Harika Atmaca, Aslı Kısım, Selim Uzunoğlu, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. İnsan prostat kanseri hücre kültürlerinde (PC-3 ve DU-145) Ada çayı (Salvia) ekstraktının sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması. **21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslar arası katılımlı), İzmir, 3-7 Eylül 2012.**

**D5.** **Emir Bozkurt**, Harika Atmaca, Aslı Kısım, Selim Uzunoğlu, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. Kekik (Thymus) ekstraktının normal meme epiteli (MCF-10A) ve meme kanseri (MDA-MB-231) hücre kültürlerinde sitotoksik, apoptotik ve epigenetik etkilerinin araştırılması. **21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslar arası katılımlı), İzmir, 3-7 Eylül 2012.**

**D6.** Harika Atmaca, **Emir Bozkurt**, Aslı Kısım, Selim Uzunoğlu, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. Dose-taksele duyarlı (PC-3 - DU-145) ve dirençli (PC-3/R - DU-145/R) prostat kanseri hücre hatlarında anjiyojenik sitokinlerin belirlenmesi ve ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması. **21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslar arası katılımlı), İzmir, 3-7 Eylül 2012.**

**D7.** Aslı Kısım, Harika Atmaca, **Emir Bozkurt**, Selim Uzunoğlu, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. Resveratrol Ajanının Bazı İnsan Kanseri Hücre Kültürlerindeki Zamana Bağlı Antiproliferatif Etkilerinin Karşılaştırmalı Analizi. **21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslar arası katılımlı), İzmir, 3-7 Eylül 2012.**

**D8.** Harika Atmaca, **Emir Bozkurt**, Selim Uzunoğlu, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. MCF-7 ve MDA-MB-453 Meme Kanseri Hücre Kültürlerinde Farklı Yolaklar Üzerinden Çalışan Trabectedin (ET-743) Aracılı Apoptozis. **IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi (Sözlü Bildiri), Bursa, 13-16 Aralık 2012.**

**D9.** **Emir Bozkurt**, Harika Atmaca, Selim Uzunoğlu, Bülent Karabulut, Canfeza Sezgin, Ulus Ali Şanlı, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. Glioblastoma Multiforme Hücre Kültürlerinde (U-87 MG ve T98G) Trabectedin'in (E-743) Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. **IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Bursa, 13-16 Aralık 2012.**

**D10.** Burcu akar, **Emir Bozkurt**, Zeki Sürmeli, Pınar Gürsoy, Aslı Kısım, Selim Uzunoğlu, Bülent Karabulut, Canfeza Sezgin, Ulus Ali Şanlı, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. Glioblastoma Multiforme Hücre Kültürlerinde (U-87 MG ve T98G) VEGF Sentezinin (-/-) Gossypol (AT-101) İle İnhibisyonu. **IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi (Sözlü Bildiri), Bursa, 13-16 Aralık 2012.**