



BAŞKENT ÜNİVERİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

HOMOLOG OLMAYAN UÇ BİRLEŞMESİ (NHEJ) DNA ONARIM
YOLAĞININ MCF7 HÜCRE HATLARINDA GELİŞEN DOKSORUBİSİN
DİRENCİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Ali AYKAÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2018



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

HOMOLOG OLMAYAN UÇ BİRLEŞMESİ (NHEJ) DNA ONARIM
YOLAĞININ MCF7 HÜCRE HATLARINDA GELİŞEN DOKSORUBİSİN
DİRENCİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet Ali AYKAÇ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

ANKARA

2018



T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Mehmet Ali Aykaç tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/11/2018

Tez Konusu: "Homolog Olmayan Uç Birleşmesi (NHEJ) DNA Onarım Yolağının MCF7 Hücre Hatlarında Gelişen Doksorubisin direncine Etkisinin Araştırılması"

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Özlem Darcansoy İşeri

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Feride İffet Şahin

Prof. Dr. Şefik Güran

Doç. Dr. Özlem Darcansoy İşeri

Başkent Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Başkent Üniversitesi

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 26 / 11 / 2018 tarih ve 56 / 8. Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ
Enstitü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 19/12/2018

Öğrencinin Adı, Soyadı : Mehmet Ali AYKAL

Öğrencinin Numarası : 21610215

Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik

Programı : Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Doç. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Tez Başlığı : Homolog Olmayan Uç Birleşmesi (NHEJ) DNA Çanım Yolunun
MCF7 Hücre Hattlarında Gelişen Doksorubisin Direncine Etkisinin
Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam ...89... sayfalık kısmına ilişkin, 19/12/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafındanTuzmitin.... adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % ...8...'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi 'bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası: ...m. 

Onay

19/12/2018



Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad,

Doç. Dr. Özlem Darcansoy İşeri

Teşekkür

Başkent Üniversitesi'nde görmüş olduğum eğitim süresince araştırmacı kişiliği ve çalışma disipliniyle bana her zaman yol gösterici olan, asistanlık dönemimde faydalanmış olduğum engin laboratuvar tecrübeleriyle ve tez çalışmalarımında deneysel ve teorik anlamda mesai saati gözetmeksizin yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans danışmanım Doç. Dr. Özlem Darcansoy İşeri'ye en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvarında kullanmış olduğum teknikler konusunda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve her konuda yol gösterici olan Doç. Dr. Yunus Kasım Terzi'ye tüm destekleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ders içi ve ders dışı faaliyetlerle çok yönlülüğün anlamını göstererek yeni ufuklar açan değerli hocalarım Prof. Dr. Feride İffet Şahin ve Prof. Dr. Zerrin Yılmaz Çelik'e aktarmış oldukları değerli bilgiler için teşekkür ederim.

Başkent Üniversitesi'ne gelmemi sağlayan ve lisansüstü eğitimimin şekillenmesinde yol gösterici olan Doç. Dr. Özgür Kütük'e teşekkür ederim.

Laboratuvar içinde ve dışında her zaman destek ve dostluklarını hissettirerek Ankara'da çok değerli anılar biriktirmemi sağlayan değerli ablam MSc. Esra Başyigit ve değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Zeynep Kavasoglu'na her şey için teşekkür ederim.

Eğitimimin ilk gününden son gününe kadar gerek öğrettikleri tekniklerle gerek arkadaşlıklarıyla laboratuvar ortamını güzel kılan sitogenetik laboratuvarındaki değerli ablalarım Sinem Ataklı, Sinem Güder ve Şeyma Ateş'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi bütün imkanlarını bana adayan çok sevdiğim annem Sevda Aykaç ve babam Latif Aykaç'a saygılarımı sunar ve minnettarlığımı belirtmek isterim.

Sevgisi ve varlığıyla hep yanımda olan Sinejan Özcan'a sabırla katlandığı ve beni her zaman mutlu ettiği için teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezi Başkent Üniversitesi tarafından DA17/22 proje koduyla desteklenmiştir.

ÖZET

Mehmet Ali AYKAÇ

Homolog Olmayan Uç Birleşmesi (NHEJ) DNA Onarım Yolağının MCF7 Hücre Hatlarında Gelişen Doksorubisin Direncine Etkisinin Araştırılması

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, 2018

Homolog olmayan uç birleşimi DNA onarım mekanizması hücre bölünmesi ve çoklu ilaç direnci gelişimini de içerecek biçimde hücrede DNA ile ilişkili birçok farklı süreç ile ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamızda, bir antrasiklin türevi olan doksorubisine karşı dirençlilik gösteren MCF7 meme kanseri alt hücre hatlarında NHEJ yolağının gelişen ilaç direncindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Doksorubisine duyarlı (MCF7/S) ve dirençli alt hücre hatlarına 4µM doksorubisin 1, 6, 12 ve 24 saat uygulanmış ve tüm parametreler bu uygulama sürelerinde analiz edilmiştir. MTT, doksorubisinin zamana bağlı sitotoksitesinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Doksorubisin genotoksitesini alkali tek hücreli jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. NHEJ mekanizmasının analizi için 53BP1 proteininin immünofloresan etiketlenmesi gerçekleştirilmiştir. NHEJ yolağının temel bileşenlerini kodlayan genlerin (*XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *LIG4* ve *XLF*) ve bunların ifadenmesini düzenleyen iki miRNA'nın (miR-101 ve miR-502) ifadenmesi qPCR ile analiz edilmiştir.

24 saatlik doksorubisin uygulamasından sonra MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücrelerinde hücre proliferasyonu azalmıştır. Tüm hücrelerde uygulamanın 6. saatinde doksorubisine bağlı genotoksik hasar gerçekleşmiştir. 24 saatlik doksorubisin uygulaması, duyarlı hücrelerde dirençli hücrelere göre daha yüksek genotoksik hasara yol açmıştır. Duyarlı hücrelerde doksorubisin uygulamasından 1 saat sonra NHEJ yolağının aktivesi tespit edilmişken, dirençli hücrelerdeki aktivite 12. saatte tespit edilmiştir. NHEJ bileşenlerinin ifadenmesi duyarlı hücrelerin kontrol grubunda dirençli hücre hatlarının kontrol gruplarından daha yüksek olmasına rağmen, MCF7/1000Dox hücrelerinde doksorubisin uygulamasına cevap belirgin biçimde artış göstermiştir. 4µM doksorubisin uygulanan

MCF7/1000Dox hücre hattında, NHEJ yolağındaki genlerde gerçekleşen ifadenin artışıyla NHEJ yolağının DNA onarımında etkin rol üstlendiği sonucuna varılmaktadır. Bununla birlikte, önerilen miRNA'ların dirençli hücrelerde NHEJ yolağı üzerinde kontrolünün olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, NHEJ onarımı tepki hızı ve seviyesinin farklı dirençlilik seviyelerine ve mekanizmalarına sahip alt hücre hatlarında duyarlı hücreler ile karşılaştırmalı incelenmesi doksorubisin bağımlı oluşan genotoksik hasarın onarımı ve gelişen ilaç direnci hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır. Bu tez çalışması, gelecekte konu ile ilgili yapılacak olan ileri çalışmalara kaynaklık edebilecek ve literatüre katkı sağlayacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Çoklu İlaç Direnci, Doksorubisin, Meme Kanseri, Homolog Olmayan Uç Birleşimi, miRNA

ABSTRACT

Mehmet Ali AYKAÇ

Investigation of Impact of Non-homologous End Joining (NHEJ) DNA Repair Pathway in the Development of Doxorubicin Resistance in MCF7 Cell Lines

Medical Genetics Department

Master's Thesis, 2018

Non-homologous end joining DNA repair mechanism is associated with many of cell processes. Multidrug resistance and cell division involves diverse cellular pathways.

Aim of this study was to investigate involvement of NHEJ repair mechanism in the development of an anthracycline type doxorubicin resistance in MCF7 cell lines.

Doxorubicin (4 μ M) were applied to sensitive and resistant sublines, and all parameters were tested after 1, 6, 12, and 24h of applications. MTT was used to evaluate time-dependent cytotoxicity of doxorubicin. Doxorubicin induced genotoxicity was tested by single cell alkaline gel electrophoresis assay. Immunofluorescent labeling of 53BP1 protein performed for the analysis of NHEJ. Expression of the genes coding the essential components of the NHEJ pathway, *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *LIG4* and *XLFI*, and two control miRNAs of the pathway, miR-101 and miR502, were analyzed by real-time PCR analysis.

Results demonstrated that cell proliferation decreased in MCF7/S, MCF7/400Dox, and MCF7/1000Dox cells, due to 24h doxorubicin application. Doxorubicin induced genotoxic damage after 6h incubation in all cells. After 24h of incubation, doxorubicin caused higher genotoxic damage in sensitive cells in comparison to resistant cells. NHEJ pathway was activated after 1h of doxorubicin application in sensitive cells, whereas activity was observed after 12h in resistant cells. Though, expression of NHEJ components was higher in control group sensitive cells in comparison to respective resistant cells, expression of these genes were significantly upregulated in MCF7/1000Dox cells in response to doxorubicin application. miR-101 and miR502 alterations were correlated to *XRCC7*, and *XRCC5*, *LIG4* and *XLFI* gene expressions, respectively in sensitive cells.

Conclusively, NHEJ pathway components were upregulated in 24h of doxorubicin application. Doxorubicin induced NHEJ response were more rapid and high in MCF7/1000Dox cells, although pathway did not seem to be under the control of proposed miRNAs.

Investigation of timing and level of NHEJ DNA damage response in cells having varying resistance indices and different resistance mechanisms, provided a better understanding of the repair of doxorubicin induced genotoxic damage and development of drug resistance in these cells. The results of the thesis will provide basic knowledge for further studies.

Keywords: Multidrug resistance, Doxorubicin, Breast cancer, Non-homologous end joining, miRNA

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xii
ŞEKİLLER.....	xiv
TABLolar.....	xvi
EŞİTLİKLER.....	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Meme Kanseri.....	6
2.1.1. Meme Kanseri Çeşitleri	7
2.2. Meme Kanserinde Evrelendirme.....	9
2.3. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri	10
2.3.1. Cerrahi Müdahale.....	11
2.3.2. Radyo Terapi	11
2.3.3. Kemoterapi	13
2.4. Doksorubisin.....	15
2.4.1. Doksorubisin Etki Mekanizması	16
2.4.2. Metabolizma	16
2.5. Kanserde İlaç Direncinin Moleküler Mekanizması.....	17
2.5.1. İlaç İnaktivasyonu.....	18
2.5.2. İlaç Hedefindeki Değişiklikler.....	19
2.5.3. Hücre Dışına İlaç Pompalama.....	20
2.5.4. Hücre Ölümünün Engellenmesi	22
2.5.5. Epitel- Mezenkimal Dönüşüm (EMT) ve İlaç Direnci.....	24
2.5.6. Kanser Hücre Heterojenitesi ve İlaç Direnci	26
2.5.7. DNA hasar Cevabı ve İlaç Direnci.....	26

2.6. Çift İplikli DNA Kırıklarının Onarımı ve Çeşitleri	28
2.6.1. DNA Çift İplik Kırıklarının Onarım Kinetiği.....	29
2.6.2 Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) Mekanizması	30
2.6.2.1. Ku70/ Ku80.....	31
2.6.2.2. DNA-PKcs.....	32
2.6.2.3. LigazIV/ XRCC4.....	32
2.6.2.4. Yardımcı NHEJ Faktörleri.....	33
2.6.2.4.1. XLF (Cernunnos).....	33
2.6.2.4.2. Artemis.....	34
2.6.2.4.3. Diğer DNA Uç İşleme Faktörleri.....	34
2.6.2.4.4. Diğer DSB Fraksiyonları ile İlişkili Faktörler.....	35
2.6.3. Homolog Rekombinasyon ile NHEJ Arasındaki Denge.....	36
2.6.3.1. Hücre Döngüsüne Bağlı DSB Onarım Tercihi.....	36
2.6.3.2. BRCA1 ve Homolog Rekombinasyonu Üzerindeki Stimülasyonu.....	37
2.6.3.3. 53BP1 ve NHEJ Üzerindeki Stimülasyonu.....	37
2.7. Memelilerde RNA interferans Yolakları.....	38
2.7.1. RNAi Yolağında Drosha.....	40
2.7.2. RNAi Yolağında Dicer.....	41
2.7.3. RNAi Yolağında Argonaute.....	41
2.8. Kanseri- miRNA İlişkisi.....	41
2.8.1. Meme Kanseri İlaç Direnci ile İlişkili miRNA'lar.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
3.1. Kullanılan Gereçler	44
3.2. Hücre Kültürü.....	44
3.2.1. Kültür Koşulları.....	44
3.2.2 Hücre Alt Kültürleri (Pasajlama)	45
3.2.3. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi	45
3.3. MTT Hücre Çoğalma Testi	46
3.4. Alkali Tek Hücreli Jel Elektroforezi	47
3.5. İmmüno Floresan Boyama.....	48
3.6. mRNA İfade Analizleri.....	49
3.6.1. Total RNA İzolasyonu.....	49

3.6.2. Ters Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR))	50
3.6.3. Yarı Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)	51
3.7. Mikro RNA (miRNA) İfadeleme Analizleri	54
3.7.1. Mikro RNA (miRNA) İzolasyonu	54
3.7.2.1. Mikro RNA (miRNA) Örneklerinden cDNA Sentezi.....	55
3.7.2.2. Mikro RNA (miRNA) Miktarının Yarı Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile Tespiti.....	56
3.8. Çalışmada Kullanılan İstatistik Analiz Yöntemleri.....	57
4. BULGULAR.....	59
4.1. Sitotoksikite Testi (MTT)	59
4.2. Alkali Tek Hücreli Jel Elektroforezi	60
4.3. 53BP1 İmmünofloresan Boyama.....	63
4.4. mRNA İfadeleme Analizi	65
4.5. miRNA İfadeleme Analizi.....	75
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	87
7. KAYNAKLAR	89
8. EKLER.....	107
Ek A: RPMI 1640 (Cegrogen, Almanya) İçeriği.....	107
Ek B: Tampon ve Solüsyonlar.....	108

SİMGELER ve KISALTMALAR

MCF7/S: İlaça hassas MCF7 hücre hattı.

MCF7/400Dox: 400nM doksorubisine dirençli MCF7 hücre hattı

MCF7/1000Dox:1000nM doksorubisine dirençli MCF7 hücre hattı

NHEJ: Homolog olmayan uç birleşimi

ÇİD: Çoklu ilaç direnci

XRCC4: X-ray repair cross-complementing protein 4

XRCC5: X-ray repair cross-complementing protein 5

XRCC6: X-ray repair cross-complementing protein 6

XRCC7: X-ray repair cross-complementing protein 7

LIG4: LigazIV

XLF: *XRCC4* benzeri faktör

mRNA: Mikro RNA

hsp-miR-101-3p: *Homo sapiens*-mikro RNA-101'in 3p kolu.

hsp-miR-502-3p: *Homo sapiens*-mikro RNA-502'nin 3p kolu

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

qRT-PCR: Kantitatif ters transkriptaz PCR

53BP1: p53'e bağlanan protein.

HER-2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2

ER: Östrojen reseptör

HR: Hormon reseptör

PR: Progesteron reseptör

BRCA1: Meme kanseri duyarlılık geni 1

topoI: Topoizomeraz I

topoII: Topoizomeraz II

5-FU: 5-florourasil

TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa

EMT: Epitel-mezenkimal dönüşüm
CYP: sitokrom p450
Apaf-1: apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
PTEN: Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
KML: Kronik myeloid lösemi
AML: Akut myeloid lösemi
ABC: ATP bağlayıcı kaset
MDR1: Çoklu ilaç direnci 1
BCRP: Meme kanseri direnç proteini
MRP1: Çoklu ilaç direnci proteini 1
P-gp: P-glikoprotein
HSP90: Isı şoku proteini 90
BCL-2: B hücreli lenfoma 2 proteini
ATM: Ataxia telangiectasia mutated
TdT: terminal deoksinükleotidil transferaz
Pol λ : polimeraz λ
pol μ : polimeraz μ
Ig: immünoglobulin
HR: Homolog rekombinasyon
RISC: RNA indüklemeli sessizleştirme kompleksi
DEPC: Dietilpirokarbonat
qPCR: Gerçek zamanlı/Kantitatif PCR
LNA: kilitli nükleik asit

ŞEKİLLER

Şekil 1: Meme kanseri ile ilişkili olan faktörler (17).....	6
Şekil 2: Anti-kanser ilaçların etki mekanizmaları (37).....	13
Şekil 3: Doksorubisin moleküler yapısı (https://www.drugbank.ca/drugs/DB00997).	16
Şekil 4: Doğrudan veya dolaylı olarak ilaç direnci oluşumuna neden olan mekanizmalar (39, 40)	18
Şekil 5: EMT ve ilaç direncine neden olan etkileri (40).....	25
Şekil 6: H2AX proteininin sırasıyla radyasyona tabi tutulmadan önce (A) ve sonra (B) hücrede oluşturdukları protein odakları (109).....	29
Şekil 7: NHEJ mekanizması (Ekim 2018, KEGG).....	31
Şekil 8: NHEJ/HR tercih mekanizmaları (139).....	36
Şekil 9: Memelilerde post-transkripsiyonel gen sessizleştirme mekanizması (154).	39
Şekil 10: Doksorubisin uygulamasına bağlı hücre çoğalması.....	59
Şekil 11: Alkali tek hücreli jel elektroforezi analizi. A: Floresan mikroskopta TRITC filtresi ile görüntülenen hücre; B: Programın gri skalaya dönüştürdüğü görüntü; C: Analiz ekranı ve cetvel aracı.....	61
Şekil 12: Alkali tek hücreli jel elektroforezinde genotoksisitenin hesaplanmasında kullanılan parametreler.....	61
Şekil 13: Doksorubisin uygulamasına bağlı DNA hasarı.....	62
Şekil 14: MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında gözlemlenen dört tip ifadelenme biçimine ait mikrograflar: (A) Stabil tip: Sönük ve difüz boyanma; (B) Düşük DNA Hasar Cevabı (DDR): Bir veya iki belirgin sinyal odağı; (C) Yüksek DNA Hasar Cevabı (DDR): Üç veya daha fazla belirgin sinyal odağı; (D) Büyük odaklar: 1µm çaptan daha büyük ve belirgin sinyal odağı.....	64
Şekil 15: 53BP1 proteininin immünofloresan boyama sonuçları.....	64
Şekil 16: XRCC4 ifadelenme analizleri.....	66
Şekil 17: XRCC5 ifadelenme analizleri.....	67
Şekil 18: XRCC6 ifadelenme analizleri.....	69

<i>Şekil 19: XRCC7 ifadelenme analizleri.....</i>	<i>70</i>
<i>Şekil 20: XLF ifadelenme analizleri.....</i>	<i>72</i>
<i>Şekil 21: LIG4 ifadelenme analizleri.....</i>	<i>74</i>
<i>Şekil 22: Hsp-miR-101 erime eğrisi analizleri.</i>	<i>76</i>
<i>Şekil 23: Hsp-miR-101 PZR amplifikasyonlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri ve 100bp DNA markır</i>	<i>76</i>
<i>Şekil 24: Hsp-miR-101 ifedelenme değişimi grafiği.....</i>	<i>77</i>
<i>Şekil 25: Hsp-miR-502-3p erime eğrisi grafiği.....</i>	<i>78</i>
<i>Şekil 26: Hsp-miR-502-3p agaroz jel elektroforezi görüntüsü, 50bp ve 100bp markır.....</i>	<i>79</i>
<i>Şekil 27: Hsp-miR-502-3p ifadelenme değişimi.....</i>	<i>79</i>

TABLULAR

<i>Tablo 1: Meme kanseri alt tipleri ve özellikleri.....</i>	<i>8</i>
<i>Tablo 2: Meme kanseri evrelerinin gruplandırılması (www.imaginis.com/breasthealth/staging.asp).....</i>	<i>10</i>
<i>Tablo 3: Doksorubisin etki mekanizmaları.....</i>	<i>18</i>
<i>Tablo 4: Kullanılan gereçler.....</i>	<i>44</i>
<i>Tablo 5: Çalışmada kullanılan hücre hatları.....</i>	<i>45</i>
<i>Tablo 6: RT- PCR koşulları.....</i>	<i>51</i>
<i>Tablo 7: İfadeleme analizi için kullanılan primer bilgileri.</i>	<i>52</i>
<i>Tablo 8: qPCR koşulları.</i>	<i>53</i>
<i>Tablo 9: miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Qiagen, Amerika) kiti ve cDNA sentezi için gerekli malzemeler ve kullanılan hacim bilgileri.....</i>	<i>55</i>
<i>Tablo 10: RT-PCR inkübasyon koşulları.....</i>	<i>55</i>
<i>Tablo 11: miRNA örneklerinden elde edilmiş cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı qPCR içeriği.....</i>	<i>56</i>
<i>Tablo 12: qPCR koşulları.....</i>	<i>56</i>
<i>Tablo 13: Beta-aktin genine ait primer dizisi.....</i>	<i>57</i>
<i>Tablo 14: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre MTT testi analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>60</i>
<i>Tablo 15: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre alkali tek hücre elektroforezi analizinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>62</i>
<i>Tablo 16: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre 53BP1 immünoflorasan boyama analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>65</i>
<i>Tablo 17: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre XRCC4 geni ifadeleme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>66</i>

<i>Tablo 18: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre XRCC5 geni ifadelenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>68</i>
<i>Tablo 19: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre XRCC6 geni ifadelenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>69</i>
<i>Tablo 20: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre XRCC7 geni ifadelenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>71</i>
<i>Tablo 21: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre XLF geni ifadelenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>83</i>
<i>Tablo 22: : Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre LIG4 geni ifadelenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>74</i>
<i>Tablo 23: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre Hsp-miR-101-3p ifadelenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>77</i>
<i>Tablo 24: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre Hsp-miR-502-3p ifadelenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.....</i>	<i>80</i>

EŞİTLİKLER

(Eşitlik 1) $\mu\text{g/mL RNA} = 40 \times \text{Seyreltme faktörü} \times \text{OD}_{260}$	50
(Eşitlik 2) Değişim miktarı (Kat) = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$	53
(Eşitlik 3) $\Delta\Delta\text{CT} = (\text{CT Hedef} - \text{CT Referans Gen}) \text{ Deney grubu} - (\text{CT Hedef} - \text{CT Referans Gen}) \text{ Kontrol Grubu}$	53
(Eşitlik 4) Değişim miktarı (Kat) = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$	57
(Eşitlik 5) $\Delta\Delta\text{CT} = (\text{CT Hedef} - \text{CT Referans Gen}) \text{ Deney grubu} - (\text{CT Hedef} - \text{CT Referans Gen}) \text{ Kontrol Grubu}$	57
(Eşitlik 6) Hücre Canlılığı (%) = $(\text{Absorbans (Kontrol Grubu)} / \text{Absorbans (Deney Grubu)}) \times 100$	59
(Eşitlik 7) Kuyruktaki %DNA Miktarı = $(1 - \text{Kuyruğun Total Yoğunluğu} / \text{Total Comet Yoğunluğu}) \times 100$	61
(Eşitlik 8) Kuyruğun Momenti = $\text{Kuyruk uzunluğu} \times \text{Kuyruktaki \%DNA Miktarı}$	61

1) GİRİŞ

“Çoklu ilaç direnci (ÇİD)” olarak tanımlanan doğal (intrinsik) veya kazanılmış direnç kanser kemoterapisinde başarısızlığa neden olur. Çoklu ilaç dirençliliği fenotipine sahip hücrelerde sitotoksik etkinin bertaraf edilmesi zaman içerisinde kademeli olarak kazanılan ve birden fazla yolak üzerinden gelişen ve hücrelerde global fenotipik değişikliklerin olduğu bir durumdur. Tümör hücrelerini *in vitro* koşullarda artan ilaç konsantrasyonlarında seçerek çoklu ilaç direncine model olan dirençli hücre hatları elde edilir. Alt hücre hatlarının dirençlilik endeksleri sitotoksikite analizi ile elde edilen inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerlerinin parental hücre hatlarından elde edilen değerlere bölünmesiyle hesaplanır. Dirençlilik endeksinin 1’den büyük olması alt hücre hatlarının seçilen ilaca dirençli olması anlamına gelir. Önceki çalışmalar, *in vitro* ortamda tümör hücrelerinin seçici ilaca dirençlilik geliştirmesinin kademeli olarak gerçekleştiğini (1) ve farklı dirençlilik endeksine sahip alt hücre hatlarındaki etkin dirençlilik mekanizmalarının farklı olduğunu göstermiştir (2).

Farklı seçicilik ve toksisitede, farklı etki mekanizmalarına sahip pek çok kemoterapötik ajan vardır. Kanser ilaçları etki mekanizmalarına göre; alkilleyici ajanlar, topoizomera I ve II inhibitörleri, antimetabolitler, mitotik iğ inhibitörleri, anjiyogenez inhibitörleri, hormonlar veya hormon taklitçisi ilaçlar, hedeflenmiş terapötik ilaçlar ve immünbaskılayıcılar olmak üzere sınıflara ayrılırlar.

Mitoz bölünme süresince kromozom kondenzasyonu ve ayrılmasında aktivitesine ihtiyaç duyulan topoizomera II ve DNA çift ipliğinin gevşetilmesi gibi topolojik modifikasyonlara sorumlu topoizomera I hedeflenerek sık bölünmekte olan kanser hücreleri öldürülebilmektedir. Topoizomera I ve II inhibitörleri enzimlere kovalent bağlanarak geri dönüşümlü olmayan biçimde DNA-protein kompleksinin stabilizasyonunu sağlar ve DNA ipliklerinin birbirinden ayrılmasını önler. Topoizomera I inhibitörleri için topotekan ve irinotekan, Topoizomera II inhibitörleri için antarasiklinler (doksorubisin ve mitoksantaron) örnek olarak verilebilir.

Doksorubisin (Adriamycin®), antarasiklin tipi bir antibiyotiktir. Doksorubisin solid tümörlerde, özellikle, meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Tüm antarasiklinler DNA çift ipliğine bağlanır ve interkalasyona neden olur; bu yüzden

interkale edici ajanlar olarak anılmaktadırlar. Antarasiklinler, hücrelerde çoklu etki mekanizmaları ile sitotoksik etkiye neden olmaktadır. İlk olarak, tüm antarasiklinler interkalasyona neden olarak DNA ve RNA sentezini önlerler. İkinci olarak, antarasiklinler Topoizomeraz II'yi tek basamaklı katalitik döngüsünü etkileyerek stabilize eder ve onu kırılğan bir yapıya getirir. Topoizomeraz II'nin kırık birleştirmedeki önemli görevi nedeniyle DNA iplik kırıkları meydana gelir. Üçüncü olarak, antarasiklinler reaktif oksijen türevlerinin oluşmasına neden olabilir ve hücrelerde serbest radikallerin vermiş olduğu hasarlar ilacın antitümör etkinliğini destekler. Antarasiklin yapılar, bir hidroksikinin içerir ve bu sayede yüksek afinite ile demir bağlayabilir. İlaç-demir kompleksi glutatyondan oksijene elektron transferini katalizler ve serbest radikal oluşumuna neden olur. İlaç-demir kompleksi ve/veya serbest radikaller DNA'da tek iplik kırıklarına neden olur. Sonuçta, hücre proliferasyonu engellenir, hücre G2-M fazında tutuklanır veya apoptoz indüklenir. Doksorubisinin hücrelerdeki etkisi faz bağımlı olmasa da; S ve G2 fazı G1 fazına göre çok daha hassastır.

DNA çift iplik kırıklarının (“double strand breaks”; DSB) onarımı hücrenin sağkalımı açısından çok kritiktir. Bu nedenle, çoğu organizma bu kırıkların onarımı için homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleşimi (“non-homologous end joining”; NHEJ) olmak üzere en az iki yolağa sahiptir. Homolog rekombinasyon replikasyon sırasında oluşan çift iplik kırıklarının ana onarım mekanizmasıyken, özellikle hücre döngüsünün G0 ve G1 fazlarında NHEJ etkin mekanizmadır.

NHEJ, sağlam ve boşta olan çift iplikli DNA'nın tanınması ile başlar. Bu, DNA ucu etrafında bir halka formunu alan Ku70/80 (XRCC5 ve XRCC6) heterodimerinin oluşumunu sağlar (3). DNA uçlarında iki ipliğin aynı noktadan kırılmamasından dolayı oluşan baz eksiklikleri DNA polimeraz X ailesi üyelerinden Polλ ve Polμ tarafından polimeraz aktivitesi ile tekrar doldurulmaktadır. Polλ ve Polμ'nün eksikliğinde NHEJ mekanizmasının etkin bir şekilde devam etmekte, bununla birlikte, onarım sırasında oluşan delesyonlarda artış meydana gelmektedir (134). DNA polimeraz X ailesinin bir diğer üyesi olan terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT), kalıp gerekmeksizin DNA uçlarına nükleotid ekleyebilmektedir. Bu, teorik olarak mutajenik bir durumdur. TdT ifadenmesi B-hücrelerinde Ig genlerinin

rekombinasyonunun gerçekleştiği gelişimsel aşama ile sınırlıdır ve V(D)J rekombinasyonu sırasında Ig genine ait diziyeye rastgele nükleotidler eklenmesiyle varyasyon artışına neden olmaktadır (135). Bu nedenle, Pol λ , Pol μ ve TdT genleri çalışılmamıştır. DNA bağımlı protein kinaz (PRKDC; XRCC7) Ku protein kompleksine bağlanır ve protein kinaz aktivitesi ile otoposforilasyon gerçekleşir. Otoposforilasyon sonrasında Ku70/Ku80 ve DNA-PKcs kompleksi (DNA-PK kompleksi) konformasyonel değişikliğe uğrar (4). Ligaz 4 (Lig4), XRCC4 protein ile stabil bir kompleks oluşturarak ligasyonu gerçekleştirir (6, 7). Son dönemlerde keşfedilmiş olan ve “Cernunnos” olarak da adlandırılan XLF (“XRCC4-like factor”; XLF) kompleks oluşum reaksiyonunu katalizler (8, 9, 10).

mikroRNA’lar (miRNA) endojen olarak transkripte edilen ve gen düzenlenmesini sağlayan 21-22 nükleotitlik RNA’lardır. NHEJ yolağı üzerinde etkili oldukları belirlenmiş mikroRNA’lardan miR101, NHEJ yolağının en temelinde rol alan ve yolaktaki pek çok molekülü fosforile ederek düzenleyen DNA-PKcs proteinini kodlayan *XRCC7* geninin ve DNA çift iplikli kırığının gerçekleştiği yerde H2AX histonunu ubiquitinleyerek kromatin yeniden düzenlenmesi sağlayan *ATM* geninin mRNA’larının 3’UTR bölgelerini hedef alarak baskılar. Bu durum, radyasyon ve topoizomeraz II inhibitörleri gibi DNA’da çift iplik kırıklarına neden olan etkilere karşı kanser hücrelerini hassaslaştırmaktadır (11). Yolak düzenleyicilerinden miR502 ise *XRCC5*, *XLF* ve *Lig4* genlerinin mRNA’larının 3’UTR bölgelerini hedef alarak baskılamaktadır (12).

Bu çalışmada, doksorubisine karşı dirençlilik gösteren MCF7 meme kanseri alt hücre hatlarında NHEJ yolağının gelişen ilaç direncindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda:

- Doksorubisin uygulamasına bağlı oluşan sitotoksik hasrın değerlendirilmesi,
- DNA hasarının tespiti ve P53BP1 proteininin immünofloresan işaretlenmesiyle NHEJ yolağı aktivitesinin belirlenmesi
- NHEJ onarımının gerçekleşebilmesi için gerekli olan proteinleri kodlayan *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *XLF* ve *LIG4* genlerinin

dirençli ve duyarlı hücrelerde DNA hasarı indüklenmesi ile zamana bağlı ifadenme düzeylerinin analizi,

- NHEJ yolağını kontrol eden miRNA'ların doksorubisine dirençli MCF7 hücre hatlarındaki düzenleyici rollünün belirlenebilmesi için dirençli ve duyarlı hücrelerde DNA hasarı indüklenmesi ile zamana bağlı ifadenme düzeylerinin analizi hedeflenmiştir.

Önceki çalışmalarda, *in vitro* koşullarda MCF7 hücrelerine artan konsantrasyonlarda doksorubisin uygulanması ile heterojen hücre grupları arasından 400 nM (MCF7/400Dox) ve 1000 nM (MCF7/1000Dox) doksorubisine dirençli hücreler kademeli olarak seçilmiştir (13). Bu çalışmada, doksorubisin duyarlı ve doksorubisine dirençli MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox alt hücre hatlarına 1, 6, 12 ve 24 saat 4µM doksorubisin uygulanmıştır. Hücre hatlarında zamana bağlı doksorubisin uygulamasıyla oluşan sitotoksikite MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Doksorubisin bağımlı DNA hasarı yani genotoksik etki alkali tek hücreli jel elektroforeziyle belirlenmiştir. DSB'lerin tamirinde NHEJ yolağının tercihini 53BP1 proteini sağlamaktadır. Nitekim, DSB indüksiyonundan sonra 53BP1 proteini ve fosforile H2AX histonunun (γ -H2AX) oluşturduğu protein odakları ("Foci") immünofloresan boyama ve mikroskopi ile belirlenmiş ve çeşitli zamanlarda hücrelerde bulunan "foci" sayımı, DSB onarımının nicel takibine olanak sağlamıştır.

NHEJ yolağının ana bileşen proteinlerini kodlayan *XRCC4*, *XRCC5* (Ku70), *XRCC6* (Ku80), *XRCC7* (DNA-PKcs), *LIG4* ve *XLF* genleri ile *XRCC7* genini baskılayan hsp-miR-101-3p ve *XRCC5*, *LIG4* ve *XLF* genlerini baskılayan hsp-miR-502-3p mikroRNA'larının ifadenme analizleri SYBR Green temelli olarak gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile yapılmıştır. mRNA ifadenme analizlerinde *GAPDH* geni referans gen olarak kullanılırken, miRNA ifadenme analizlerinde *β -aktin* geni referans gen olarak kullanılmıştır. İfadenme analizlerinin tümü $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile değerlendirilmiştir.

DNA'da hasara neden olan doksorubisine farklı düzeylerde dirençlilik gösteren hücre hatlarında NHEJ tamir yolağının kademeli direnç gelişimine etkisi daha önce araştırılmamıştır. Bu hücre hatlarında karşılaştırmalı olarak incelenmiş her bir genin ifadenme düzeyleri ve zamanlaması, onların ilişkili oldukları yolaklar ve onarım mekanizmalarının tercihinine dair bilgi edinmemizi sağlamıştır. Ek olarak, bu yolaklar

üzerinde düzenleyici etkiye sahip olan miR502 ve miR101'in ifadenme zamanlaması ve düzeylerinin incelenmesi de NHEJ yolağı bağlamında miRNA'ların ilaç direnci açısından önemini tartışmamıza olanak sağlamıştır. Sonuç olarak, NHEJ onarımı tepki hızı ve seviyesinin farklı dirençlilik seviyelerine ve mekanizmalarına sahip alt hücre hatlarında duyarlı hücreler ile karşılaştırmalı incelenmesi doksorubisin bağımlı oluşan geneotoksik hasarın tamir süreci ve gelişen ilaç direnci hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır. Bu tez çalışması, gelecekte konu ile ilgili yapılacak olan ileri çalışmalara kaynaklık edebilecek ve literatüre katkı sağlayacak niteliktedir.



Meme kanseri, meme dokusunda süt üretiminin gerçekleştiği salgı bezleri (lobüller) ve lobülleri meme ucuna bağlayan kanallarda oluşmaktadır. Memenin geri kalan kısmı yağ, bağ ve lenfatik dokulardan oluşmaktadır. Tümör orjini genellikle kanallar (duktal karsinoma) veya salgı bezleridir (lobüler karsinoma). Meme kanseri genellikle küçük hapsolmuş (sınırlandırılmış) bir tümör olarak başlamaktadır. Lobül veya kanallarda bulunan tümör hücreleri, etraflarını saran meme dokusuna sızdıkları zaman invaziv meme kanseri gelişir. Bu hücrelerin kanallar aracılığıyla lenf nodlarına veya kan dolaşımına girerek primer tümör bölgesinden uzaklaşarak vücuttaki diğer organlara yayılması ile beraber metastaz gerçekleşmiş olur.

Son yıllarda, meme kanseri ile ilgili olarak hücresel süreçler ve yollara dair çok fazla dikkat çekici gelişme yaşanmıştır. Farklı yollar arasındaki etkileşimler ekstrasellüler çevrenin algılanarak, uygun cevabın verilmesi konusunda belirleyicidir. Kanser gelişimi kademeli ve çok bileşenli bir süreç olup farklı hücresel yollarda bozukluklara neden olmaktadır. Hücresel sağkalım, çoğalma, göç, farklılaşma ve apoptoz sinyal yollarındaki değişimler meme kanserinin hem oluşumunda hem de gelişiminde oldukça etkilidir (18-24).

2.1.1) Meme Kanseri Çeşitleri

Meme kanseri genellikle yüksek heterojeniteye sahip olan bir kanser türü olarak kabul edilmektedir (25). Belirgin morfolojik ve fenotipik profiller klinik tabloyu büyük ölçüde etkilemektedir (26). Klinikte, meme kanseri immünohistokimyasal özelliklerine göre 3 temel tipte karakterize edilmektedir. Bunlar, hormon reseptör pozitif (ER/ HR⁺), insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 pozitif (HER-2⁺) ve üçlü negatif meme kanseridir ("Triple Negative Breast Cancer"; TNBC). HR-pozitif kanserler kendi arasında östrojen reseptör pozitif (ER⁺) ve progesteron reseptör (PR⁺) pozitif olarak ikiye ayrılmaktadır. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık olarak %85'i HR⁺'tir ve hormon tedavisi uygulanabilmektedir. Aromataz inhibitörleri (AIs), tamoksifen, anastrozol (Arimidex), letrozol (Femara) ve eksemestan (Aromasin) hormon tedavisinde kullanılan ajanlardır. HR-pozitif meme kanserleri kendi arasında daha ileri bir sınıflandırma olarak Luminal A ve Luminal B olmak üzere iki alt gruba ayırır. Luminal A tümörler, ER⁺ ve/veya PR⁺ ve HER-2 negatif olma eğilimindedirler. Luminal B tümörler, ER⁺ ve/veya PR⁺ ve HER-2 pozitif

olma veya yüksek Ki-67 ifadelenmesi ile HER-2 negatif olma eğilimindedirler. HER-2 pozitif alt tipi, meme kanserinin HER2 pozitif ancak HR negatif olduğu anlamına gelmektedir. Tüm meme kanserlerinin %20'si HER-2 pozitifdir. Meme kanserinin bu tipi trastuzumab (Herceptin) gibi HER-2 hedefleyen ilaçlarla tedavi edilebilmektedir. Üçlü negatif meme kanseri, aynı zamanda bazal-benzeri alt tip olarak da adlandırılmaktadır. Üçlü negatif meme kanserinde ER, PR ve HER-2 reseptörlerinin ifadelenmesi gözlemlenmemektedir ve meme kanserlerinin %15'lik kısmını oluşturmaktadır. Hedefli tedaviler bu tümör tipinde fazla gelecek vadetmemekte ve cerrahi müdahale, radyoterapi ve ilaç tedavisi ile kombine şekilde tedavi edilmektedir.

Ek olarak, üç ana meme kanseri tipi dahilinde küçük moleküler alt sınıflar da bulunmaktadır. Bu sınıflar keskin ve karakteristik özelliklere sahip değildir. Luminal C alt tipi, normal meme-benzeri alt tip (27-33) ve üçlü negatif meme kanserinin transkripsiyonel alt tipleri buna örnek gösterilebilir (34, 35) (Tablo 1).

Tablo 1: Meme kanseri alt tipleri ve özellikleri.

Alt tip	İmmünohistokimyasal karakteristik	Klinik özellikler	Tedavi
Luminal A	ER ⁺ /PR ⁺ , HER-2 negatif, düşük Ki-67 (<14%)	İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur; 4 meme kanseri tipi arasında en iyi prognozlu olan çeşittir.	Hormonal tedavi, kemoterapi (Luminal B'ye göre daha az duyarlılığa sahiptir)
Luminal B	ER ⁺ /PR ⁺ , HER-2 ⁺ (veya HER-2 negatif, yüksek Ki-67 (>14%))	İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur, Luminal A'dan daha yüksek seviyedir, Luminal A kadar olmasa da iyi prognozludur	Hormonal tedavi (Luminal A'ya göre daha az duyarlılığa sahiptir), kemoterapi
HER-2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER-2 ⁺	İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %15- 20'sini oluşturur, yüksek seviyedir, lenf nodu pozitifdir, TNBC'den iyi, Luminal tiplerden kötü prognoza sahiptir	HER-2 hedefli tedavi, antarasiklin temelli kemoterapi
Bazal-Benzeri	ER ⁻ , PR ⁻ , HER-2 ⁻	İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %10- 15'ini oluşturur, BRCA1 fonksiyon bozukluğu, tüm meme kanseri çeşitleri arasında en kötü prognozlu olandır	Platin temelli kemoterapi ve PARP inhibitörleri

2.2) Meme Kanserinde Evrelendirme

Prognozu değerlendirebilmek ve tedavi için yol gösterici bir rehber oluşturabilmek adına, meme kanseri farklı gruplar olarak evrelendirilmektedir. Kanser evreleri tümör boyutu, invazivlik durumunun olup olmamasına, lenf nodlarına sıçrayıp sıçramadığına ve kanserin meme dışına yayılıp yayılmadığına göre belirlenmektedir. “American Joint Committee on Cancer (AJCC)” bir isimlendirme sistemi geliştirmiş ve bu sistem, AJCC Kanser Evrelendirme Klavuzu’nda yayınlanmıştır. TNM evrelendirme olarak anılan bu sistemde, tüm kanser hücrelerinin primer tümördeki dağılımı (T), bölgesel lenf nodları (N) ve uzak metastazlar (M) dahil edilmekte ve numeratik alt gruplandırma yapılmaktadır (Tablo 2). Özetle (www.imaginis.com/breasthealth/staging.asp):

❖ T: Tümör büyüklüğü

- TX: Tümör değerlendirilememiştir.
- T0: Tümör varlığına dair kanıt yok.
- T1: Tümör 2 cm ya da daha küçük çaptadır. Bu grup 3 alt gruptan oluşmaktadır; 1a, 1b ve 1c.
- T2: Tümör 2- 5 cm çapındadır.
- T3: Tümör 5 cm’den daha büyük çapa sahiptir.
- T4: Tümör herhangi bir boyuttadır. Göğüs duvarına bağlanmış ve pektoral (göğüs) lenf noduna yayılmaktadır. Bu grup 4 alt gruba ayrılmaktadır; 4a, 4b, 4c ve 4d.

❖ N: Tespit edilen nodlar

- NX: Lenf nodu değerlendirilememiştir.
- N0: Kanser lenf nodlarına yayılmamıştır.
- N1: Kanser yeri değişebilen ve aynı tarafa ait koltuk altı lenf noduna (meme kanseri ile aynı taraftaki kol altı lenf nodülleri) yayılmıştır.
- N2: Kanser vücuda göre meme kanseri ile aynı tarafta olan kol altı lenf nodüllerinde bir veya daha fazla farklı biçimde tutunmuştur. Bu grup kendi içerisinde 2 gruba ayrılmaktadır; 2a ve 2b.

- N3: Kanser, meme ile aynı taraftaki lenf nodüllerine veya meme kanseri ile aynı taraftaki küprücük altı lenf nodüllerine yayılmıştır. Bu grup kendi içerisinde 3 alt sınıftan oluşmaktadır; 3a, 3b ve 3c.

❖ M: Metastaz

- MX: Metastaz değerlendirilememiştir.
- M0: Diğer organlara uzak metastaz bulunmamaktadır.
- M1: Diğer organlara uzak metastaz gerçekleşmiştir.

Tablo 2: Meme kanseri evrelerinin gruplandırılması

(www.imaginis.com/breasthealth/staging.asp).

Evre	Tümör (T)	Nodül (N)	Metastaz (M)
Grade 0	Tis	N0	M0
Grade I	T1	N0	M0
	T0	N1	M0
Grade IIA	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
Grade IIB	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
Grade IIIA	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	Herhangi bir N	M0
Grade IIIB	Herhangi bir T	N3	M0
Grade IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

2.3) Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri hastalarında bir tedavi stratejisinin belirlenebilmesi için önemli bazı faktörler vardır. Bunlar tümör büyüklüğü, lokasyonu, kanser aşaması, bazı kişisel değişkenler (yaş, menopozal durum), hormon durumu, ifadenme, mutasyon ve gen kopya sayısı değişimleri olarak sıralanabilmektedir. Bu faktörlere bağlı olarak, cerrahi müdahale, radyasyon ile tedavi, kemoterapi ve hormon temelli tedavi ile bu tedavi yöntemlerinin kombinasyonları uygulanabilmektedir. Birincil olarak uygulanan tedavi yöntemine ek olarak tedaviden sağ kurtulan kanser hücrelerinin öldürülmesi için kombine biçimde kemoterapi, radyasyon ve hormon tedavisi tümörün yayılması ve

nüksetmesini önlemektedir. Bu tedavi adjuvan terapi olarak isimlendirilmektedir. Kullanım amacına göre lokal ya da sistemik etkileri olabilmektedir. Bir diğer yandan primer veya indükleyici terapi olarak da adlandırılan neoadjuvan kemoterapi cerrahi müdahalenin öncesinde uygulanmaktadır.

2.3.1) Cerrahi Müdahale

Eğer tümör metastatik değilse, cerrahi müdahale genellikle meme kanserine karşı ilk adımda uygulanan tedavi yöntemidir. Meme kanserinin cerrahi tedavisi lumpektomi ve mastektomidir. Bunlara ek olarak, eğer meme kanseri hücreleri süt kanalının dışına sızdıysa lenf nodlarının çıkartılması veya koltuk altı lenf nodüllerinin alınması gibi işlemler de lumpektomi ve mastektominin yanı sıra uygulanabilmektedir. Lumpektomide meme tümörü, tümörün etrafını sarmakta olan normal dokunun da küçük bir kısmıyla beraber cerrahi olarak uzaklaştırılmaktadır. Lumpektomi sıklıkla Grade 0, Grade I, Grade II (bazen de Grade III) meme kanserlerinde lenf nodu çıkartılarak ya da çıkartılmayarak uygulanmaktadır. Mastektomi tümörden etkilenmiş olan memenin cerrahi olarak alınmasıdır. Mastektomi basit, modifiye edilmiş radikal ve radikal olmak üzere üç tipte yapılmaktadır (www.imaginis.com/breasthealth/treatment.asp). Ayrıca, koltuk altında bulunan lenf nodlarının bir kısmı ya da tümü alınmaktadır. Mastektomi kadınlarda Grade I, Grade II, Grade III (Bazen de Grade IV) meme kanseri tedavisinde uygulanmaktadır.

2.3.2) Radyoterapi

Radyoterapide, kanser hücrelerini yok etmek için iyonize radyasyon (X-ışınları, Gama ışınları veya elektronlar) kullanılmaktadır. Radyasyon ile tedavi sıklıkla cerrahi müdahale sonrasında meme, göğüs duvarı ve kol altı bölgelerde kalmış olan tümör hücrelerinin yok edilmesinde kullanılmaktadır. İstisnai olarak, radyasyon terapisi cerrahi müdahale öncesinde tümör boyutunun küçültülmesinde de kullanılmaktadır.

Radyasyonun moleküler düzeydeki doğrudan etkisi, özellikle DNA olmak üzere biyomoleküllerde kimyasal bağların kırılmasına veya tautomerik kaymalara neden olmasıdır. Dolaylı etkisi ise, eksitasyon ve iyonizasyon ile yüklü partiküller oluşturmasıdır. Oksijen radikal anyonlar (süperoksit), preoksi radikaller, hidrate olmuş

elektronlar, hidrojen radikalleri ve hidroksil radikaller gibi reaktif moleküller radyasyona maruz kalmış dokularda yüksek konsantrasyonlarda birikmektedir. Bu moleküller, biyolojik moleküllere kovalent olarak bağlanmaktadır. DNA'ya bağlandıkları zaman onarılması güç tek ve çift iplik kırıklarına ve baz hasarlarına neden olmaktadır. Radyasyonun tümör hücreleri üzerindeki seçici etkisi normal hücreler ile tümör hücreleri arasındaki farklı düzeylerde olan radyasyon hassasiyetiyle açıklanmaktadır. Bergonié and Tribondeau tarafından (36) açıklandığı gibi, yüksek bölünme hızına sahip hücreler radyasyona karşı daha hassastır.

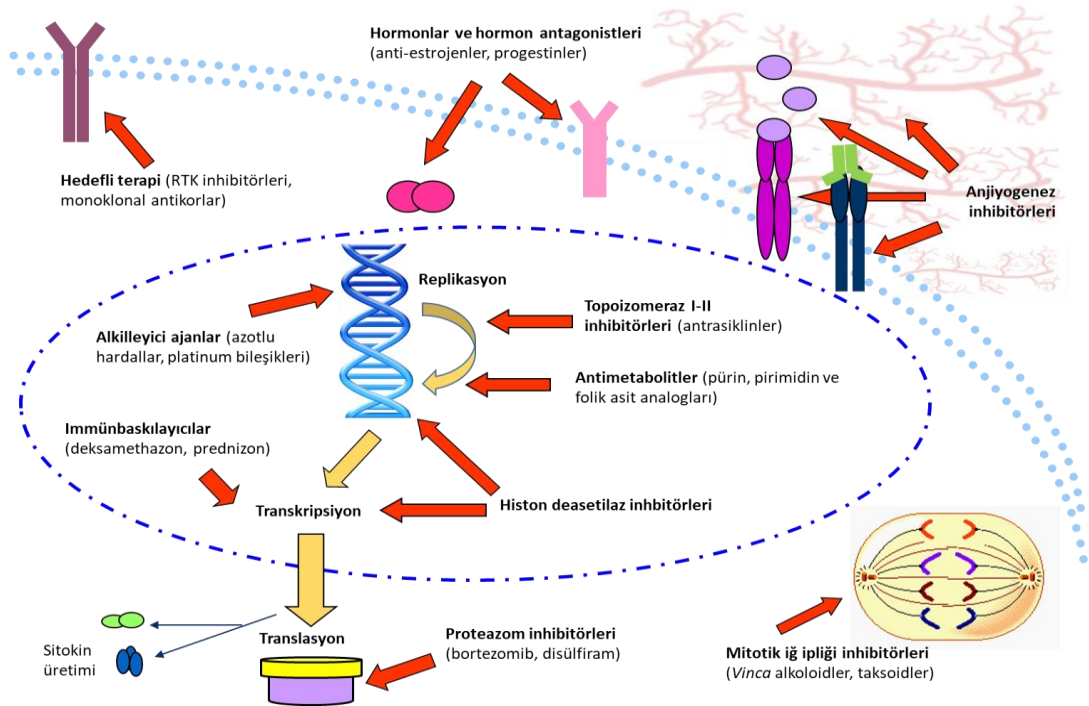
Radyasyon tedavisi dışsal radyasyon kaynağı, bir implant aracılığıyla içsel radyasyon veya bu ikisinin kombinasyonu ile uygulanmaktadır. Meme kanserinde en sık kullanılan radyoterapi yöntemi dışsal radyasyon kaynağı ile gerçekleştirilir. Dışsal radyasyon tedavisinde, X-ışınları ve gama ışınları vücut dışı bir kaynaktan tümör bölgesine iletilir. Yüksek enerjili X-ışını demeti hedef doku içerisinde gama ışınlarına göre daha derinlere gidebilmektedir. Gama ışınları, radyum, uranyum ve kobalt 60 gibi moleküllerin radyoaktif bozunma yani yaptıkları radyasyon salınımı ile üretilmektedir. Her bir element kendine özgün bir oranda bozunuma sahiptir ve vermiş oldukları enerjiyi gama ışınları formunda ve diğer partiküller olarak salmaktadırlar. X-ışınları ve gama ışınları tümör üzerinde aynı etkiye sahiptir (www.meds.com/pdq/radio.html).

Radyasyonun kanser hücrelerine ulaştırılmasında kullanılan bir diğer teknik olan içsel radyoterapide, doğrudan tümör içerisine, tümör etrafını saran dokuya veya vücut boşluklarına yerleştirilen radyoaktif implantlar kullanılmaktadır (<https://www.utmb.edu/otoref/grnds/radiation-oncology-2003-1203/radiation-oncology-slides-2003-1203.pdf>). İçsel radyoterapi yakın bir mesafeden radyasyonu ilettiği için daha avantajlıdır. Dışardan radyoterapinin aksine normal dokular yüksek dozdaki radyasyona daha az maruz kalmaktadır. Sezyum, iridyum, iyodin, fosfor ve palladyum içsel radyoterapide kullanılan radyoaktif maddelere örnek olarak gösterilebilir. Radyoterapinin yan etkileri uygulama bölgesinin vücut üzerindeki konumuna bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte deri iritasyonu, aşırı yorgunluk ve uygulanan bölgedeki deride geçici renk değişiklikleri tedavinin yan etkileri arasındadır.

2.3.3) Kemoterapi

Kemoterapi, anti-kanser ilaçlarının kanser tedavisi amacıyla kullanımını ifade etmektedir. Anti-kanser ilaçlar, seçici bir şekilde kanser hücrelerinin sağkalımı ve/veya bölünmesini önleyerek tümöre etki etmektedir. Kontrolsüz ve hızlı bölünme kanser hücreleri için karakteristik bir özelliktir. Bu nedenle, anti-kanser ilaçlar kanser hücrelerinde normal hücrelere nazaran daha çok hasara neden olmaktadır. Kemoterapinin amacı primer tümörü küçültmek, hücre büyüme sürecini yavaşlatmak, metastazı önlemek ve bazen de hastalık semptomlarını azaltmaktır. İlaçlar hastalara damara enjeksiyon (intravenöz) veya tablet (oral yolla) olarak verilmektedir. Kemoterapi uygulamasının intravenöz olarak yapılması durumunda, vücudun dinlenebilmesi amacıyla birkaç haftalık bir dinlenme periyodu oluşturulmaktadır.

Kemoterapi ilaçları, farklı mekanizma, seçicilik ve toksisiteye sahip olan pek çok farklı tipten oluşmaktadır. Kemoterapi ilaçları doğal, sentetik veya yarı sentetik olabilmektedir. Etki mekanizmalarına göre kanser ilaçları; alkilleyici ajanlar, topoizomeraz I ve II inhibitörleri, anti-metabolitler, mitotik iğ ipliği inhibitörleri, anjiyogenez inhibitörleri, hormonlar veya hormonları taklit eden ilaçlar, hedeflenmiş ilaçlar ve immün sistem baskılayıcılardan oluşmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2: Anti-kanser ilaçların etki mekanizmaları (37).

Alkilleyici ajanlar nükleik asitlere bağlanarak onları guanin nükleotidinin 7 numaralı pozisyonundaki azottan alkilemektedir. Alkil grupları, replikasyonu ve transkripsiyonu engellemektedir. Ayrıca, timin ile anormal baz eşleşmeleri oluşturarak yanlış kodlamaya ve bunun yanında guanin bakiyelerinin depürinizasyon ile uzaklaştırılmasıyla iplik kırıklarına neden olmaktadır. Alkilleyici ajanlar azotlu hardallar (sikloforamidler, melfalan) ve nitrosourealar (karmustin) olmak üzere iki tiptir.

Mitoz bölünmede kromozom kondenzasyonu ve ayrılması süreci bir DNA giraz enzimi olan topoizomeraz II aktivitesi gerektirmektedir. Bunun yanında, DNA sarmalının daha gevşek bir duruma geçmesi gibi topolojik düzenlemeler de topoizomeraz I ve topoizomeraz II aktivitesi sayesinde gerçekleşmektedir (38). Topoizomeraz I enzimi, çift iplikli DNA molekülünde tek bir ipliğin kesilip yeniden ligasyon ile birleştirilmesini, topoizomeraz II enzimi ise DNA üzerindeki her iki ipliğin de kesilip yeniden ligasyon ile birleştirilmesini sağlayarak DNA üzerindeki sarmalların gevşetilmesini sağlamaktadır. Topoizomeraz I ve II inhibitörleri bu enzimlere kovalent bir şekilde bağlanarak DNA-protein kompleksinin geri dönüşümsüz bir şekilde stabilize edilmesine neden olmakta ve ipliklerin ayrılmasını engellemektedir. Topotekan, kamptotesin ve irinotekan, topoII inhibitörlerine ise antarasiklinler (doksorubisin), etopozit ve mitoksantron Topoizomeraz I inhibitörlerine örnek olarak verilebilir.

Antimetabolit ilaçlar, metabolitlerin fonksiyonel olmayan analoglarıdır. Bu ilaçlar metabolik aktivitelerin antagonisti olarak kullanılmaktadır. Antimetabolit ilaçlar, pürin (6-merkarptopürin, fludarabin) analogları, pirimidin (5-florourasil (5-FU) ve arabinosilsitozin) analogları ve folik asit analogları (methotreksat) olmak üzere üç gruba ayrılır.

Mitotik iğ inhibitörleri, mikrotübüllerin stabilizasyonunu bozarak, mitotik iğ ipliklerinin oluşumunu inhibe ederek (*Vinca* alkaloidler; vinkristin ve vinblastin) veya mikrotübül geri dönüşümsüz olarak stabilize ederek (Taksoidler; taksol ve taksoter) hücrenin mikrotübül dinamiğinin dengesini bozmaktadır.

Hormon tedavisinde cinsiyet hormonları veya hormon benzeri ilaçlar kadın veya erkeklerde hormonların etki veya üretimini arttırmaktadır. Hormon tedavisinde

kullanılan ilaçlar; anti-östrojenler (tamoksifen ve toremifen), aromataz inhibitörleri (anastrozol ve eksemestan), progestinler, östrojenler ve anti-androjenlerdir.

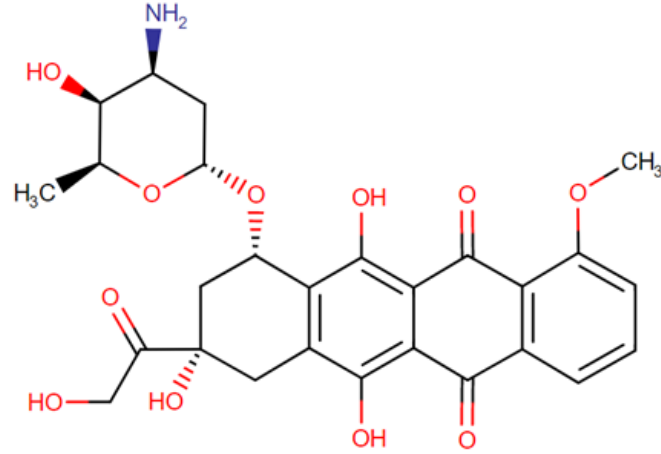
Anjiyogenez inhibitörleri, pre-anjiyogenik faktörlerin ifadelmesini indüklemektedir. Örneğin, bir monoklonal antikor olan bevasizumab vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) bağlanmakta ve VEGF'in yüzey reseptörüne bağlanmasını engellemektedir. Böylelikle, VEGF bağımlı anjiyogenez uyarı yolağı baskılanmaktadır.

İmmünbaskılayıcı anti-kanser ilaçları sıklıkla hematolojik malignitelere kullanılmaktadır. İmmünbaskılamamanın amacı kanser hücresi olan beyaz kan hücrelerinin büyüme oranını baskılamaktır. Bunlara örnek olarak, kortikosteroidler (prednison), siklofosamid ve merkaptopürin gösterilebilir.

Hedefli kemoterapi, yan etkileri azaltarak seçici toksisiteyi arttırmaktadır. Hedefli terapide genellikle var olan genlerin tümör hücrelerinde ifadelenen mutant formları veya özellikle tümör hücrelerinde çok ifadelenen genler hedeflenmektedir. Örneğin, bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib mesilat kronik miyeloid lösemide Philadelphia kromozomunda kodlanan ve uyarıcı bağımsız yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahip BCR-Abl füzyon proteinini hedeflemektedir. Meme kanserinde EGFR ve HER2 hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Trastuzumab (Herceptin®) ve lapatinib (Tykerb®) HER2/neu pozitif metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Bir epidermal growth factor reseptör (EGFR/HER1) inhibitörü olan gefitinib (Iressa®) ise HER2 negatif metastatik tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır.

2.4) Doksorubisin

Küçük molekül tipinde bir ilaç olan doksorubisin, *Streptomyces peucetius* türüne ait *caesi* suşundan izole edilen antarasiklin türevi bir antibiyotiktir. Düzlemsel konumda olan bu molekül, temel etki mekanizmasında DNA çift ipliğine özgül olarak bağlanıp, interkalasyona neden olmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3: Dokсорubisin moleküler yapısı (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00997>).

Akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloblastik lösemi, Wilms' tümörü, nöroblastoma, yumuşak doku ve kemik sarkomaları, meme karsinomaları, ovaryum kanseri, transisyonel hücreli mesane kanseri, tiroid kanseri, gastrik kanser, Hodgkin's lenfoma, malignant lenfoma küçük hücreli akciğer kanseri dokсорubisinin yayılcı tipte olan neoplastik koşullarda tedavi amacıyla kullanıldığı tümörlerdir.

2.4.1) Etki Mekanizması

Dokсорubisin için önerilmiş olan birçok mekanizma antimitotik ve sitotoksik etkiye neden olmaktadır (Tablo 3). Dokсорubisin, DNA sarmalının baz çiftleri arasında interkalasyon yaparak bir kompleks oluşturmaktadır. Dokсорubisin, DNA topoizomerez II- alpha alt birimini inhibe etmektedir (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00997>). DNA çift ipliğinin tekrar bir araya getirilmesini sağlayan DNA topoizomerez II-alpha altbirimi, aynı zamanda mayoz ve mitoz bölünme sırasında kardeş kromatidlerin ayrılmasında da önemli rol oynamaktadır.

2.4.2) Metabolizma

Dokсорubisinin yarı ömrü 20-48 saat arasındadır. Dokсорubisin, tek elektron redüksiyonu, çift elektron redüksiyonu ve deglikozilasyon ile metabolize olmaktadır. Ancak, hastaya verilen dozun yaklaşık olarak yarısı metabolize edilemeyip hiçbir değişime uğramadan vücuttan atılmaktadır. Çift elektron redüksiyonu primer

metabolik yolak olarak kabul edilmektedir. Çift elektron redüksiyonu bir sekonder alkol olan doksorubisinol oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Tek elektron redüksiyonu birkaç oksidoredüktaz tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlarla doksorubisin-semikinon radikalinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu enzimler, mitokondrial ve sitozolik NADPH dehidrojenatlar, ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentazlardan oluşmaktadır. Verilen dozun yaklaşık %1-2'lik bir kısmı deglikozidasyon ile metabolize olmaktadır. Ürün olarak çıkan metabolitler deoksialikon ve hidroksiglikondur. Bu yan ürünlerin oluşumu ayrı ayrı redüksiyon veya hidroliz ile gerçekleşmektedir. Ksantin oksidaz, NADPH-cytochrome P450 redüktaz ve sitozolik NADPH dehidrojenaz bu yolağa dahil olan enzimlerdir. Verilen dozun yaklaşık %40'lık bir bölümü 5 gün içerisinde safrada birikmektedir. İlaç ve ona ait metabolitlerin %5-12'si aynı zaman periyodunda idrarda görülmektedir. İlacın %3'ten az bir kısmı ise idrardan doksorubisinol olarak geri kazanılmaktadır (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00997>).

2.5) Kanserde İlaç Direncinin Moleküler Mekanizmaları

İlaç direnci, ilk olarak bakterilerin antibiyotiklere direnç edinimiyle farkedilmiştir. Bununla birlikte, kanser de dahil olmak üzere bazı hastalıklarda benzer mekanizmaların varlığı keşfedilmiştir. İlaç direncinin bazı bileşenleri hastalığa özgüdür. Bunun yanında, ilacın dışarı pompalanması gibi mekanizmalar bakterilerde ve insanda ilaç dirençli kanser hücrelerinde evrimsel olarak korunmuştur. Kanser tedavisinde ilaç direnci, kemoterapi ve radyoterapi uygulanan hastalarda içsel olan ya da sonradan gelişen bir durumdur. Ancak, kanserin pek çok tipi başlangıçta kemoterapiye duyarlı olmasına rağmen zamanla direnç gelişimi gözlemlenebilmektedir. İlaç direnci gelişiminde etkili pek çok mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalar; ilaç inaktivasyonu, ilaç hedeflerindeki değişiklikler, dışarı ilaç pompalama, hücre ölümünün inhibisyonu, Epitel-Mezenkimal Dönüşüm (EMT) ve DNA hasar onarımı olarak sıralanabilir (Şekil 4). Ayrıca, tümörlerdeki hücre heterojenesinin ilaç direnci gelişimi açısından önem arz etmektedir. Son yıllarda, epigenetigin direnç gelişimine etkisi ve kanser kök hücrelerinin bu süreçteki rolü de yoğun araştırma alanları arasında yer almaktadır.



Şekil 4: Doğrudan veya dolaylı olarak ilaç direnci oluşumuna neden olan mekanizmalar (39, 40)

2.5.1) İlaç İnaktivasyonu

In vivo ilaç aktivasyonu, ilaçların farklı proteinlerle seri olarak etkileştikleri kompleks mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Bu etkileşimlerle, ilaçlar modifikasyona uğrar, kısmi olarak bozulur veya aktif kompleksler oluştururlar. Pek çok anti-kanser ilaç, klinik olarak etkinlik kazanabilmek için metabolik bir yoldan geçerek aktive edilmelidir. Ancak, kanser hücreleri ilaç uygulaması durumunda ilacın aktivasyonunu azaltarak ilaç direnci geliştirebilmektedir. Örneğin, AML tedavisinde kullanılan sitarabin (AraC) çoklu fosforilasyon sonrasında AraC-trifosfat'a dönüştürülerek aktive olan bir ilaçtır (41, 42). Bu yolaktaki bir mutasyon veya ifadenme düşüşü AraC aktivasyonunun azalmasına ve böylece AraC'ye karşı ilaç

direnci gelişimine neden olmaktadır. Benzer olarak verilebilecek diğer örnekler sitokrom P450 (CYP), Glutasyon-S-transferaz (GST) süper ailesi ve uridine diphosphoglucuronosyl transferase (UGT) sistemlerinin aktivasyon ya da inaktivasyonu ile ilişkilidir (43). CYP mutasyon veya değişimleri proteinlerin metabolik kapasitelerini değiştirerek ilaçların bozunma düzeyini arttırmakta ve onların böbrekten salınımını sağlayabilmektedir (44). Bu durumda, ilaç hastada gerekli etkin seviyeyi koruyamamakta ve ilaca karşı direnç gelişebilmektedir.

İlaç aktivasyonu ve inaktivasyonu ile ilgili bir diğer önemli örnek de GST süperailisidir. Bu aileye ait üyeler, fonksiyonu hücrel makromolekülleri elektrofilik bileşenlerden korumak olan, detoksifikasyon enzimleridir. GST'lar ilaç direnci gelişimine, doğrudan detoksifikasyon yoluyla ve MAPK yolağını inhibe ederek katkıda bulunmaktadır (45). Kanser hücrelerinde GST ifadenme artışı anti-kanser ilacın detoksifikasyonunu arttırarak hücredeki sitotoksik etkinliğinin azalmasına neden olur (46). Bu artış, apoptoz yolağı ile de ilişkilidir (47).

UGT süperailisi glukoronidasyon sürecini katalizleyen bir enzim grubudur. Bu süreç, inaktif hidrofilik glukuridler, steroid, safra asidi ve ksenobiyotikler de dahil olmak üzere çevresel karsinojen ve sitotoksik substratların yapılarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. *UGT1* ve *UGT2* genleri insanda 17 fonksiyonel UGT kodlamaktadır. Bu genler, deri, meme, prostat, salgı bezleri, bağırsak ve plasenta gibi dokularda ifadenmektedir. UGT süperailisi patojenik substratlar için en son safta bulunan metabolik savunma sistemidir. Ancak, çoğu kanser tipinde *UGT1A1* ifadenmesinde düşüş gözlemlenmektedir (43). *UGT1A1* ifadenmesinin artmasına neden olan epigenetik değişiklikler ise kanserin irinotekan ve diğer ilaçlara karşı direnç kazanmasına neden olmaktadır.

2.5.2) İlaç Hedeflerindeki Değişiklikler

Bir ilacın etkinliği ilacın hedefindeki değişimlerden etkilenmekte ve ilaç direncine neden olabilmektedir. Örneğin, topoizomeraz II genindeki mutasyonlarla doksorubisinin de içinde bulunduğu topoizomeraz II inhibitörlerinin topoizomeraz II'ye bağlanması engellenir ve direnç edinimi gerçekleşir (48, 49, 50).

Meme kanseri tedavisinde sık kullanılan ilaçlardan paklitaksel, dosetaksel ve vinkristin β -tübilinlere bağlanmaktadır. İşeri ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada, paklitaksel, dosetaksel ve vinkristine dirençli MCF7 alt hücre hatlarında β -tübilin alttiplerinin ifadelenmelerinde değişiklikler ve protein alt tiplerini kodlayan genlerde ilaç bağlanma bölgelerini etkileyen mutasyonlar olduğu belirlenmiştir (2). Benzer şekilde, ovaryum kanserinde β -tübilin gibi ilaç hedeflerindeki mutasyona bağlı değişimler aracılığıyla direnç gelişimi gözlemlenebilmektedir (51).

Sık görülen akciğer kanseri tiplerinde EGFR inhibitörlerine cevap, EGFR tirozin kinaz alt birimi mutasyonlarıyla birlikte bir yıl içerisinde ilaç direnci edinimine neden olmaktadır. Tüm vakaların yarısında EGFR-T790M tespit edilmiştir (63, 64).

İlaç hedefi değişimine bir diğer örnek ise androjen reseptörde keşfedilmiştir. Androjen reseptör, prostat kanserlerinin yaklaşık %30'unda genomik olarak amplifiye olmaktadır. Bu durum, bu tip kanserlerde androjen hedefli leuprolide ve bikalutamide karşı tedaviye dirence neden olabilmektedir (47, 51).

KML hastalarının büyük bir kısmı imatinibe karşı direnç geliştirmektedir. Bazı hastalar imatinib tedavisinin başlangıcında tedaviye cevap verirken, uzun süreli tedavinin ileri aşamalarında kanser hücreleri tedaviye karşı direnç edinmektedir. Imatinib direnci, *ABL* genindeki nokta mutasyonlar ve BCR-ABL füzyon geninde amplifikasyon nedeniyle gelişebilmektedir (52). İlaç direnci edinimi BCR-ABL bağımlı mekanizmalara ek olarak, BCR-ABL bağımsız mekanizmalar olan ilaç taşıyıcı proteinler ile ilacın dışarı pompalanması ve sinyal kaskadı üzerinden de gelişebilmektedir.

2.5.3) Hücre Dışına İlaç Pompalanması

ATP-Binding Cassette (ABC) taşıyıcı ailesine üye olan proteinler evrimesel olarak korunmuş ve sağlıklı hücreleri kemobiyotiklerden koruyan transmembran pompa proteinleridir. ABC taşıyıcı pompa ailesinin insanda 49 üyesi bulunmaktadır. Taşıyıcı proteinler yapısal olarak farklılık gösterse de bu proteinlerin tümü yüksek derecede iki farklı alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimler, nükleotid bağlanma alt birimi ve daha değişken olan bir transmembran alt biriminden oluşmaktadır (53).

Substrat, transmembran alt birime bağlandığı zaman nükleotid bağlanma bölgesinde ATP hidrolizi gerçekleşmekte ve bu durum proteinin üç boyutlu yapısında değişime yol açarak substratın hücreden dışarıya atılmasına neden olmaktadır. Substratların dışarı pompalanması bu maddelerin hücre içerisindeki birikimini önlemekte ve toksinlerin hücreden uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (54). ABC taşıyıcı ailesi, karaciğer ve intestinal sistemin sağlıklı epitel dokusunda yüksek düzeyde ifadelenmektedir. İntestinal lümendeki epitel hücrelerde ifadelenen ABC taşıyıcı pompalar intestinal lümendeki ilaç ve zararlı maddelerin safra kanalı üzerinden dışarı pompalanmasında ve vücudun korunmasında rol oynamaktadır. Bu proteinler, aynı zamanda kan beyin bariyerinin sürdürülebilirliğinin korunması açısından da çok önemli bir role sahiptir (55, 56).

ABC taşıyıcı proteinler aracılığıyla dışarı pompalama aktivitesi normal bir fizyolojik süreç olmakla birlikte kanser hücrelerinde ilaç direncinin önemli bileşenlerindedir. P-glikoprotein (P-gp), multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) ve breast cancer resistance protein (BCRP) kanserde pek çok ilaca direnç ediniminde etkilidir. Üç taşıyıcı proteinin de geniş bir substrat grubu bulunmaktadır. *Vinca* alkaloidler, epidofilotoksinler, antarasiklinler, taksanlar ve kinaz inhibitörlerinin de bulunduğu pek çok ksenobiyotik bu yolla hücre dışına atılabilmekte ve kanser hücreleri ilaç atımı yoluyla tedavinin ilk aşamalarında kullanılan pek çok ilaçtan korunmaktadır. P-gp bu proteinler arasında ilk saptanan proteindir (57, 58). P-gp proteini *MDR1* geni tarafından kodlanmaktadır. *MDR1* geninin kolon, karaciğer ve böbrekteki normal düzeylerde olan ifadelenmesi bu dokularda kanser gelişimi sonrasında artış göstermektedir. Yapılmış olan bir çalışmada, akciğer kanserinde tedavi sürecinde doksorubisin uygulamasının *MDR1* ifadelenmesinde büyük bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (47). Kanser hücrelerinde hem içsel hem de edinilmiş direnç mekanizmaları ile *MDR1* aşırı ifadelenmesi gerçekleşebilmektedir. Normal fizyolojik koşullarda da *MDR1* genini ifadelendiren akciğer, meme, prostat doku orijinli kanser hücreleri, MRP1 ve BCRP taşıyıcı pompalarının ifadelenmesine bağlı olarak genellikle ilaç direncine sahiptirler. BCRP sağlıklı hücreleri koruyan bir başka taşıyıcı pompa proteindir. Ayrıca, kök hücrelerde hem ve folat homeostazının korunmasında görev alır. Taşıyıcı pompaların ifadelenmesinin yüksek olduğu bilinen farklı kanser hücreleriyle yapılan çalışmalar, bu durumun kötü klinik tabloyla ilişkili

olduğunu göstermiştir. Bir nöroblastoma çalışmasında yüksek seviyede *MRP1* ifadenmesinin kötü klinik tabloyla yüksek düzeyde ilişkili olduğu gösterilmiştir (59). Benzer şekilde, BCRP ifadenmesinin küçük hücreli akciğer kanseri hastalarında ilaç direnci ve sağkalım oranlarının tahmininde önemli bir belirteç olduğu ortaya konulmuştur. Bir tirozin kinaz inhibitörü olan gefitinib, BCRP pompa fonksiyonunun engellenmesinde rol oynayarak ilaç direncinin geriye çevrilmesini sağlamaktadır (60).

Önceden de belirtildiği gibi kinazlar gibi sinyal moleküllerinin devamlı bir şekilde aktivasyonu hücre döngüsünün kontrolden çıkması ve karsinogenez ile sonuçlanmaktadır. Bu proteinler, P-gp ifadenmesini de düzenlemektedir. Bu durum, kanser çevresinin, ilaç direnci gelişimine izin vermesi yönünde yeniden düzenlenmesine neden olmaktadır. Örneğin, ER pozitif meme kanseri hücrelerinde östrojen, P-gp protein sentezini azaltmaktadır. Ancak ER-negatif meme kanseri hücrelerinde ya da doksorubisin dirençli ER-negatif meme kanseri hücrelerinde böyle bir etki görülmemektedir (61, 62). Bu durumun aksine reseptör tirozin kinazların alt yolağında rol oynayan MAPK yolağı proteinlerinin aşırı ifadenmesi (*HRas*, *c-Raf*, *MEK1/2*, *ERK1/2*) P-gp ifadenmesini arttırmaktadır. “Extracellular signal-regulated kinases (ERK)” yolağı inhibitörleri ise P-gp ifadenmesini azaltmaktadır. Ayrıca, büyüme faktörü benzeri EGF ve FGF bunu arttırabilmektedir (63). İlginç bir şekilde, pek çok sinyal molekülünü stabilize eden bir şaperon proteini olan HSP90’ın inhibisyonu P-gp ifadenmesini azaltmaktadır (64). Bu sonuçlar, P-gp ifadenmesinin ve stabilitesinin sıkı kontrol edildiğini, ancak, tümör hücresi gelişimi açısından avantaj sağladığını göstermektedir. Kanser hücrelerinde sıklıkla aktive olmuş durumda bulunan bu onkogenik kinazların hedeflenmesi, P-gp ifadenmesinin de azalması ile ilaca hassasiyetin artması nedeniyle verimli bir tedavi stratejisi oluşturmaktadır.

2.5.4) Hücre Ölümünün Engellenmesi

Apoptoz ve otofaji mekanizmaları memelilerde hücresel homeostazın sağlanması açısından önemli mekanizmalardır. Bu süreçler, her ne kadar bir diğerrinin antagonisti olsa da, ikisi de hücre ölümüne neden olabilmektedir. Apoptoz, iki yolaktan oluşmaktadır. Bu yollar, mitokondride B-Cell Lymphoma 2 (*BCL-2*), caspsase- 9 ve Akt proteinlerinin dahil olduğu içsel yolak ve hücre yüzeyindeki ölüm

reseptörlerinin dahil olduğu dışsal yolaktır. İçsel ve dışsal yollar, yolağın alt basamaklarında apoptoza sebep olan caspase-3 aktivasyon sürecinde ortak hareket etmekte ve ek bazı çapraz etkileşimler de bulunmaktadır.

Bazı kanser tiplerinde, BCL-2 ailesi proteinler, Akt ve diğer anti-apoptotik proteinler yüksek miktarda ifade edilmektedir. Bu proteinlerin alt yollarındaki transkripsiyon faktörleri olan NF- κ B ve STAT yüksek seviyede aktivite göstermektedir. Bu durum, kanser tedavisi için bu proteinleri iyi birer hedef haline getirmektedir. “Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL)” proteininin rekombinant formları ve bu grup ligandın reseptörlerini hedefleyen antikolar caspase-8 aktivasyonu üzerinden apoptozu indükleyebilmektedir. Sitotoksik ilaçlar ile kombinasyonunda TRAIL gelecek vaatmektedir (65, 66). BCL-2 ailesi inhibitörleri, histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) ve kinaz inhibitörleri de ilaç denemelerinde olumlu sonuçlar vermiştir (47, 65-69). Ancak, uzun süreli kullanım direnç edinimine neden olmaktadır. Ek olarak, meme kanseri fare modelinde HDACi uygulamasının tümör hücrelerinde TRAIL’e (66) ve hücre kültüründe proteaz kalpain inhibitörlerine karşı hassasiyeti arttırdığı gözlenmiştir (67). Çoğu kanser ilacı MAPK yolağının alt basamaklarında yer alan c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) üzerinden apoptozu indüklemektedir. TRAIL, JNK aktivasyonu ile (68,69) apoptozu indüklemekte ve JNK sinyalizasyon yolağının inhibisyonu sisplatin tarafından indüklenen apoptozun azalmasına neden olmaktadır. Hücre ölüm yolağı düzenlemeleri sitotoksik ilaç tedavisinde etkinliği arttırabileceği gibi kanser hücrelerinde ölüm yollarının bertaraf edilmesi de sitotoksik ilaçlara direnç ile sonuçlanabilmektedir.

Otofaji, asidik lizozomal pH’da, fagolizozom aracılığıyla ölüme neden olmaktadır. Klorokuin ve onun türevi ilaçlar lizozomda pH’ı yükseltip sindirim enzimlerini inaktive ederek bu süreci önlemektedir. Kanser hücrelerinde diğer ilaçlara karşı hassasiyet arttırıcı etkileri bulunmaktadır. Örneğin, kanser hücrelerinde klorokin ile kombine uygulanan fluorourasil tek başına uygulandığı duruma göre çok daha etkilidir (70). Ek olarak, bir klorokin türevi olan hidrosikloroquinin kanser hücrelerinde otofajiyi inhibe ettiği ve ER pozitif kanser hücrelerinde tamoksifen gibi ER yolağı inhibitörlerine hassasiyetin yeniden oluşturulmasında etkili olduğu gözlemlenmiştir (71). Özet olarak, klorokin otofaji bağımlı ilaç direnci

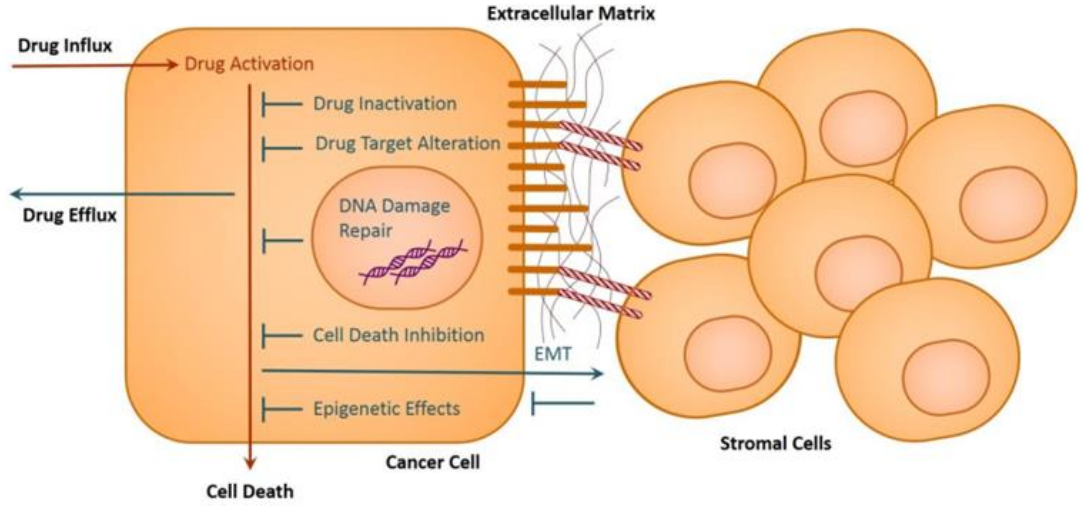
mekanizmalarının inhibisyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu durum klorokin kanserde ilaç direnci çalışmalarında önemli bir yere koymaktadır (70).

2.5.5) Epitel- Mezenkimal Dönüşüm (EMT) ve İlaç Direnci

Epitel-mezenkimal dönüşüm (“Epitelial-mezenkimal transition”; EMT) solid tümörlerin metastatik özellik kazanmasıyla ilişkilidir. Metastaz, bir kanser hücresinde ve onun çevresini oluşturan stromal hücrelerdeki değişimleri içeren karmaşık bir durumdur. EMT sürecinde, hücre-hücre bağlantılarında rol oynayan hücre adezyon reseptörlerinin ifadenmesi azalmakta ve hücre hareketliliğini indükleyen hücre adezyon reseptörlerinin ifadenmesi artmaktadır. Hücre hareketliliği aynı zamanda sitokinler ve kemokinlere de bağlıdır. Sitokin ve kemokinler tümörün kendisinden ya da mikroçevresindeki hücrelerden salınmaktadır. Ek olarak, metalloproteazların tümör yüzeyinde yüksek düzeyde ifadenmesi matriks proteinlerinin yıkımını artırarak metastazı desteklemektedir. EMT’nin kanser ilaç direncindeki rolü, günümüzde yoğun olarak araştırılmakta olan bir konudur (72, 73).

Kimi zaman kanser kök hücreleri olarak da adlandırılmakta olan kanser atasal hücrelerine dair çalışmalar, kanserde tedavi ve tümör yükündeki azalma sonrasında hastalığın nasıl uzak bölgelerde nüks ettiğini açıklamaktadır (74-78). EMT sürecinde bazı faktörler ilaç direnç gelişiminde önemli roller oynamaktadır. Ancak, bu durum tümörün metastatik süreçte hangi aşamada olduğu ile ilişkilidir. Örneğin, ERBB2 (HER2) pozitif meme kanserinde tümörler yüksek seviyede $\beta 1$ integrin ifadelendirmektedir ve bu durum transtuzumab gibi antikor yapıdaki inhibitörlere karşı direnci arttırmaktadır (79). Bu bulgular, $\beta 1$ integrinlerin dimerizasyonunun lösemi hücrelerinde ilaç indüklemeli hücre ölümüne karşı hücreleri koruduğuna dair görüşü desteklemektedir (80). Benzer biçimde, $\beta 3$ integrin ve Src, TGF β aracili olarak memeli hücrelerinde EMT’yi tetiklemektedir (81). İntegrin $\beta 1$ dimerizasyonu, akciğer kanserinde çoğalma ve sağkalım sinyali olan FAK kinaz sinyalizasyonun artmasına neden olmaktadır (82). Otokrin sinyalizasyon, “vascular endothelial growth factor (VEGF)” ve Flt-1 aracılığıyla kanser hücrelerinin sağkalım sürecine katkı sağlamaktadır (83). Hücre dışı matriks ve stromal hücreler ile etkileşimde olan selektin ve diğer adezyon reseptörleri de EMT ve hücre sağkalım süreçlerine katılmaktadır (84-88) (Şekil 5). EMT süresince gerçekleşen farklılaşma süreci farklı morfolojilere sahip

olan farklı tiplerde metastatik kanser hücrelerinin oluşumuna neden olmaktadır (89). Geçmişteki çalışmalar, actin binding protein L-plastin'in kanser ilerleyişi ve prognozuyla ilişkili olabileceğini göstermiştir (90). T-plastin, lenfoma gelişimi ve ilaç direnci ediniminde etkilidir (91).



Şekil 5: EMT ve ilaç direncine neden olan etkileri (40).

Stromal hücrelerin de ilaç direncinde rolü olduğu belirlenmiştir. B-Raf, reseptör tirozin kinazlar yolağının alt basamaklarındaki bir aracı kinazdır. Melanoma hücrelerinde B-Raf inhibitörlerine karşı gelişen ilaç direnci, Stromal hücrelerin fibroblast hücreleri ile ko-kültüre edilmesiyle keşfedilmiştir (92). Bu durum, hücre kültüründe kanser hücrelerine karşı yüksek etkinlik gösteren ilaçların *in vivo* hayvan modelleri üzerindeki klinik denemelerde başarısız olma nedenlerinden bir tanesidir.

Metastatik kanser hücreleri, hücre farklılaşmasının tek tip olmamasından dolayı genellikle heterojen popülasyonlardır. EMT, metastatik kanser hücrelerinin oluşumunu desteklerken, aynı zamanda, bir tümörde mevcut tüm hücrelerde olmasa da bir kısmında ilaç direncine neden olan sağkalım oranını artırmak için sinyalizasyon süreçlerinin başlamasına neden olmaktadır. EMT, çok karmaşık ve dinamik bir mekanizma olduğu için, ilaca ait etkilerin ve ilaç direncinin düzenlenmesinde etkili olan EMT mekanizmalarını tam olarak anlayabilmek için daha geniş kapsamlı araştırmalar yapılmalıdır.

2.5.6) Kanser Hücrelerinin Heterojenitesi ve İlaç Direnci

Kanser kök hücreleri ve olgun kanser hücrelerinde diğer mekanizmalara ek olarak bir başka bakış açısı da kanserin nüksetmesine neden olan heterojen kanser hücresi popülasyonlarında ilaç direnci olan hücrelerin klonal seçimi ve birikimidir. Geçmişte yapılan çalışmalar, heterojen hücre popülasyonlarındaki kök hücre özelliğine sahip hücre fraksiyonlarının genellikle ilaç direnci de edinmiş olduğunu göstermiştir. Kemoterapi yalnızca ilaç hassasiyeti olan kanser hücrelerini öldürmektedir. Ancak, kanser hücresi popülasyonundaki heterojeniteden dolayı ilaç dirençli kanser hücreleri tedaviden sağ olarak kurtulabilmekte, klonal olarak seçilmekte ve tümörün yeniden gelişimine ya da metastatik odakların oluşumuna neden olabilmektedir. Bu nedenle, hem dolaşımdaki hem de solid tümördeki kanser hücrelerinde ilaç hassasiyeti ve direnci açısından heterojenite bulunmaktadır.

Geçmişte AML üzerine yapılan bir çalışmada, aynı anda varlığını sürdüren iki dominant klon belirlenmiştir. Bu klonlardan bir tanesi ilaca dirençli bir diğeri ise ilaca karşı duyarlıdır. Bu durum başarılı bir tedavi sonrasında dirençli klondan köken alan kanser hücrelerinin çoğalmasına bağlı olarak hastalığın nüksetmesine neden olabilmektedir (93). Meme kanserinde klonal içerikle ilgili yapılmış olan bir çalışma meme kanserlerinin monogenomik veya multigenomik tümörler olabileceğini göstermiştir (94). Poligenomik tümörler, çok sayıdaki farklı tipte klonal altpopülasyonlar içerir ve bunların hepsi farklı ilaç hassasiyeti ya da farklı ilaç direncine sahiptir (94). Bu durum, DNA onarım mekanizması ve hücre ölüm yollarındaki bozukluklardan kaynaklanabilmektedir. Tümörlerdeki hücreler heterojenitenin bir sonucu olarak klonal altpopülasyonlarda farklı ilaç direnci karakterlerinin varlığı, tedaviyi çok daha zorlaştıran bir durumdur (95).

2.5.7) DNA Hasar Cevabı ve İlaç Direnci

DNA hasar onarımı kanser ilaç direncinde çok belirgin bir rol oynamaktadır. Kemoterapi ilaçlarının neden olduğu doğrudan ya da dolaylı DNA hasarı nedeniyle oluşan cevap, “DNA damage response (DDR)” mekanizmalarıyla ilacın neden olduğu etkileri yeniden onararak hasarı etkisiz kılmaktadır. Örneğin, sisplatin gibi platin içeren ilaçlar DNA ipliklerinde çapraz bağlanmalar oluşturarak DNA hasarına neden olmaktadır ve bu durum apoptozu tetikleyebilmektedir. Platin temelli ilaçlara karşı

gelişen dirençte nükleotid uzaklaştırmayla onarım ve homolog rekombinasyon gibi primer DNA onarım mekanizmaları rol oynamaktadır (96, 97, 98). Bu nedenle, DNA hasarına yol açan sitotoksik ilaçların etkinlikleri, kanser hücrelerindeki DDR mekanizmalarındaki bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, onarım yollarının inhibisyonu kanser hücrelerinde DNA hasarı indükleyen ilaçlara karşı hassasiyete yol açmakta ve tedavi verimini arttırmaktadır.

DDR mekanizmasının hedeflenmesinin ilgi uyandıran tedavi edici potansiyeli, bu konudaki çalışmaları da arttırmaktadır. Var olan DDR genlerinin düzenleme mekanizmalarının kaybı veya bozulması ve mekanizmadaki mutasyonel ya da epigenetik sessizleştirmelere dair etkiler pek çok kanser tipinde gerçekleşmekte olan bir durumdur (99, 100, 101). Buna rağmen, diğer DDR mekanizmalarının ifadenmesindeki artış, fonksiyon dışı kalan bu yolağın kompanse edilmesini sağlayabilmekte ve kemoterapi için iki strateji seçeneği sunmaktadır. Bunlardan birincisi, aşırı aktif DDR yolağının kemoterapötik ilaçlar ile hedeflenmesidir. Bu stratejinin uygulanması durumunda kanser hücreleri DNA hasarı indükleyen ilaçların kullanımına karşı savunmasız kalmaktadır. İkinci strateji ise, fonksiyon kaybı oluşmuş olan DDR yolağına bağlı olarak, yalnızca bozuk olan yolak üzerinden onarılabilen tipte DNA hasarına neden olan ilaçların belirlenerek kullanılmasıdır. Her iki kemoterapi stratejisinde de aşırı aktif ya da düşük aktivitedeki DDR mekanizmalarının belirlenmesi esastır.

Bazı kemoterapi ilaçları O6 pozisyonundan guanin alkilasyonunu indüklemektedir. O6-metilguanin, DNA methyltransferase (MGMT) üzerinden DNA onarımı, DDR yolağının kemoterapötik bir ajan ile hedeflenmesinin zorluğu ve vaad ettiği geleceğe dair önemli bir tablo ortaya koymaktadır. MGMT alkilenmiş bir nükleotidi onararak tekrar guanine dönüştürür ve böylelikle yanlış nükleotid eşleşmeleri engellenir. *MGMT* aşırı ifadenmesinin, hemotopietik kök hücrelerinin alkilleyici ajanlara karşı korunduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, pek çok tümör de sahip oldukları yüksek *MGMT* ifadenmesi nedeniyle alkilleyici ajanlara karşı dirençlidir. Bu nedenle, DDR mekanizmalarının inhibisyonu alkilleyici ajanlara karşı direnci engelleyebilmektedir. *MGMT*'yi hedefleyen pek çok ilaç geliştirilmiş olmasına rağmen bunlardan ancak birkaçı gelecek vaad etmekte ve FDA tarafından onaylanmıştır (99). Ancak, bazı ilaçlar sınırlı klinik etkinlikte olup, kanser hücresi

özgünlüğü olmaksızın toksisiteye neden olmaktadır. Bu nedenle, deneme aşamasında olan örneğin O6-benzilguanin gibi ilaçlar sağlıklı hücreleri sitotoksik ilaçlara karşı duyarlı hale getirmektedir (99, 102, 103). Bu sorunu bertaraf edebilmek için uygun stratejilerden bir tanesi de *MGMT* geni promotör bölgesinde yer alan CpG adası metilasyonlarının belirlenerek, O6-guanin alkilleyici ajanlara karşı hassasiyetin analizinde bir biyobelirteç olarak kullanılmasıdır. *MGMT* geninin promotör metilasyonu, genellikle DDR mekanizmasının sessizleştirilmesi nedeniyle ortaya çıkan genomik instabiliteye bağlı olarak prognoz belirsizliğine yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar, *MGMT* geninde epigenetik sessizleştirme gerçekleşmiş pek çok glioma hastasında ortalama sağkalım süresinin arttığını göstermiştir (104).

2.6) Çift İplikli DNA Kırıklarının Onarımı ve Çeşitleri

DNA çift iplik kırıkları (“double strand breaks”; DSB) bir hücrenin karşı karşıya kalabileceği en zorlayıcı hasarlardan bir tanesidir. Onarılmayan DSB, hücre bölünme sürecinde kromozom kollarının kaybına neden olabilmektedir. Bunun yanında, yanlış uçların birleştirilmesi de kromozomal translokasyonlara neden olabilmektedir (105). Her iki DNA anomalisi de tümörlerde sıklıkla meydana gelmekte ve tümör oluşumunun ilk ya da geç evrelerinde tümör agresifliğinin artışına öncülük etmektedir. Öte yandan, onarılmayan DSB’ler hücre ölümünü tetikleyerek gelişim dönemindeki organizmalarda gelişim geriliğine neden olmaktadır (106). Bu nedenle, bu tip DNA hasarlarını onaran mekanizmalar bakteriden memeliye kadar tüm canlılarda mevcuttur.

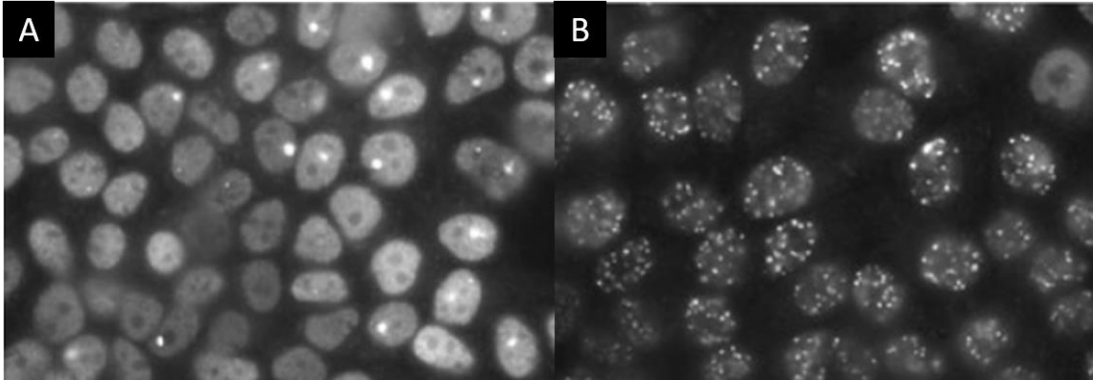
DSB onarımının gerçekleşebilmesi için iki farklı temel mekanizma mevcuttur. Homolog rekombinasyon (HR) mekanizmasında, bozulmamış DNA ipliği kırık DNA’nın onarılması için kalıp olarak kullanılır ve kırık uçlar homoloji bağımlı olarak hizalanıp kopyalanır (107). Prokaryotlarda ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi basit ökaryotlarda homolog rekombinasyon, DSB için temel onarım mekanizmasıdır. Bu yolda yer alan tek bir bileşenin dahi mutasyona bağlı eksikliği DNA çift iplik kırıklarına karşı hücreleri savunmasız hale getirmektedir. Öte yandan, yüksek ökaryotlarda ve memelilerde, homolog olmayan uç birleştirme (“Non-homologous end joining”; NHEJ) mekanizması DSB lezyonlarının onarımında çok önemli bir rol oynamaktadır (10, 108). Bu yolak, DNA kırıklarına ait uçların homoloji göstermediği

ya da çok az homoloji olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Bu nedenle, NHEJ mekanizması DNA'nın hatalı onarımına neden olmaktadır. Son 20 yıllık süreçte, NHEJ'in temel mekanizmalarının karakterizasyonu, ağır kombine bağışıklık yetmezliğinin birkaç alt tipine ait genetik temellerin keşfine ve hücrede HR ve NHEJ arasındaki tercih mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına neden olmuştur.

DSB onarım yolağının önemi türden türe değişse de her iki yolak da evrimsel süreçte korunmuştur. İlginçtir ki, bazı bakteri türleri bile NHEJ yolağına sahiptir. DSB onarımındaki temel rollerine ek olarak HR ve NHEJ özelleşmiş fonksiyonlar olarak sırasıyla mayotik rekombinasyon ve immün sistemdeki DNA yeniden düzenlenmesi (NHEJ) gibi programlanmış DNA yeniden düzenleme mekanizmalarına sahiptirler.

2.6.1) DNA Çift İplik Kırıklarının Onarım Kinetiği

DSB'lerin belirlenmesi ve onarımı, DSB onarımına özgül enzimlerin bir araya gelmeleri veya hücre çekirdeğindeki proteinlerin modifikasyonları ile takip edilebilmektedir. DSB indüklemesinden birkaç dakika sonra 53BP1 proteininin protein odakları ("Foci") ve fosforile H2AX histonunu (γ -H2AX), immünofloresan mikroskopisi ile belirlenebilmektedir (Şekil 6) (109).



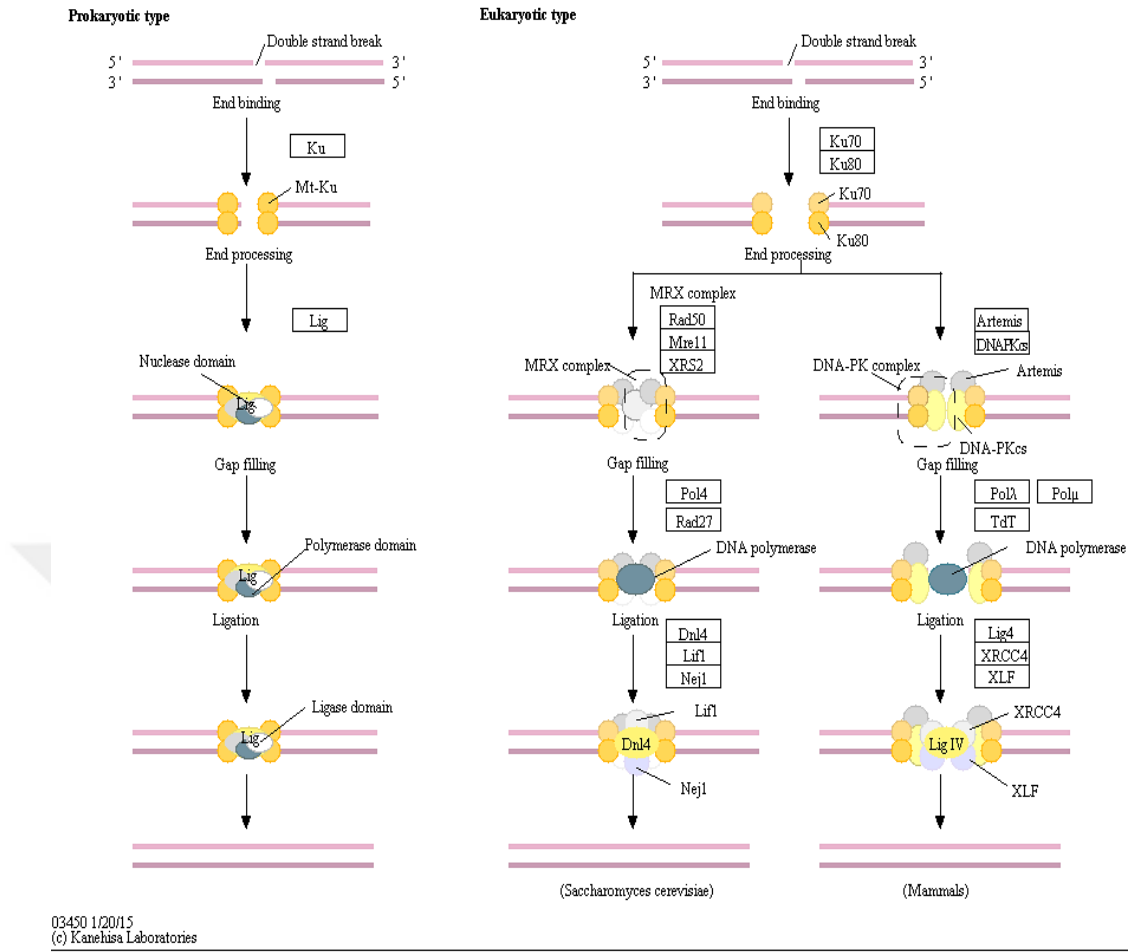
Şekil 6: H2AX proteininin sırasıyla radyasyona tabi tutulmadan önce (A) ve sonra (B) hücrede oluşturdukları protein odakları (109).

Farklı sürelerde iyonize radyasyon maruziyeti ile DSB indüklemesi yapılmış hücrelerde floresan "foci" sayısı, DSB onarım kinetiği ile ilgili yeni veriler ortaya çıkartmıştır (110, 111). İlk birkaç saatlik süreçte gerçekleşen göreceli olarak hızlı onarım olan ilk fazdan sonra, kalan DSB'ler daha yavaş bir kinetik ile onarılmaktadır (112). Yavaş ya da hızlı onarılan DSB'lerin tercihi DNA hasar tipine bağlıdır.

Radyasyon (α - radyasyon) daha kompleks DNA hasarlarına neden olur. Bu nedenle, radyasyona bağılı hasarların onarımı topoizomeraz inhibitörü ya da X-ray kaynaklı DSB'lere göre daha yavaş gerçekleşir. Bu durum, radyasyonun kırık DNA uçlarında oksidize bazlar veya tek iplik fazlalıkları gibi farklı tipte lezyonlara neden olması ile açıklanmaktadır (113). Ek olarak, onarım kinetiğindeki değişiklikler DSB'nin genomun heterokromatin ya da ökromatin bölgelerinde gerçekleşmesi ile de bağlantılıdır (114). Hücre döngüsünün G1 fazında NHEJ'e bağılı olan hızlı onarım yolları etkinken, G2 fazında hem NHEJ'e bağılı olan hızlı onarım yolları hem de da yavaş onarım yolağı HR etkin olabilmektedir (115).

2.6.2) Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ) Mekanizması

NHEJ, sağlam ve boşta olan çift iplikli DNA'nın tanınması ile başlar (Şekil 7). Ku70/80 heterodimeri DNA ucu etrafında bir halka formu oluşturur. Ku70/80 heterodimeri DNA'ya bağlanması ile hareket edebilme yeteneğı kazanmaktadır (3). Ku70/80 DNA ucuna bağlandıktan sonra DNA bağımlı protein kinaz katalitik altbirimi (DNA-PKcs) bu bölgeye bağlanarak protein kinaz aktivitesi gösterir (116). DNA-PKcs'in otofosforile olması Ku70/Ku80 ve DNA-PKcs'in üç boyutlu yapı değişikliğine neden olur ve aktif protein kompleksi DNA-PK kompleksi olarak adlandırılır (4, 5). Konformasyonel değışim sonrasında DNA uçları daha ileri reaksiyonlar ve ligasyon için uygun hale gelmektedir (117). Eğer uçlar uygun durumda ise, Ligaz 4 uçları birleştirir. Ligaz 4 bu görevi XRCC4 proteini ile stabil bir kompleks oluşturarak gerçekleştirir (6, 7). Son dönemlerde keşfedilmiş olan ve "Cernunnos" olarak da adlandırılan "XRCC4-like factor" (XLF) kompleks oluşum reaksiyonunu katalizler. Ancak, halen NHEJ'in gerçekleşmesi için mutlak gerekliliğı olduğu saptanamamıştır (8, 9). Eğer DNA uçları uygun değılse ya da bir serbest 5'-fosfat ve 3'-OH grubu taşımiyorsa, çeşitli işleme faktörleri nükleotid ya da fosfat gruplarını ekleyip çıkartabilmektedir (10). İleriki bölümlerde NHEJ mekanizmasının ana bileşenleri detaylı olarak anlatılmaktadır.



Şekil 7: NHEJ mekanizması (Ekim 2018, KEGG)

2.6.2.1) Ku70/Ku80

Ku70/80, ortasında boşluk bulunan bir halka formundadır ve bu boşluk çift iplikli DNA ucuna oturmaktadır (3). Protein kompleksindeki boşlukta bulunan amino asitler doğrudan DNA omurgası ile etkileşmektedir. Bu etkileşim sadece DNA molekülünde açık uç bulunması halinde gerçekleşebilmekte ve bağlanma özgülüğü sağlamaktadır. Ku proteinlerindeki karboksil uçlarını etkileyen mutasyonlar haricindeki mutasyonlar kompleksin doğru halka yapısında olmasını engellediğinden aktivite kaybına neden olmaktadır (118).

Ku70'in C-terminali SAP bölgesi olarak adlandırılan bir bölge içermektedir ve bu bölgenin DNA-bağlanma bölgesi olduğu hipotezi öne sürülmüştür (20). *In vitro* ortamda kristalografi ile incelendiğinde SAP bölgesinin DNA'ya bağlanmadığı görülmüş olmasına rağmen, bu bulgular *in vivo* ortamda DNA bağlanma

fonksiyonunun olmadığına dair kanıt teşkil etmemektedir (3). Nitekim SAP, Ku70'e uzun ve esnek bir bağlayıcı sayesinde tutunmakta ve DNA'ya sarılarak bağlanmaktadır. Bu durum, Ku kompleksine ait halkanın DNA'ya bağlanmasını başlatmaktadır.

Ku80'in karboksil ucu DNA'ya bağlanması için gerekli değildir ancak bu bölgede gerçekleşen delesyonun radyo dalgalarına hassasiyet ve V(D)J rekombinasyon mekanizmasında bozukluğa neden olduğu gösterilmiştir. Bu durum, DNA-PKcs ile kurmakta olduğu etkileşimi engellemesi ile açıklanmıştır (119). Protein kinaz, DNA ucunda aktif olmasına rağmen, özellikle özgül otoposforilasyon bölgelerinde gerçekleşen konformasyonel değişimler DNA uçlarının açılması, işleme ve ligasyon süreçleri için gereklidir (5). Ek olarak, C-terminalinde bulunan 12 aminoasidin özellikle Ku80-DNA-PKcs etkileşimi için önemli olduğu ortaya konulmuştur.

2.6.2.2) DNA-PKcs

DNA-PKcs, *XRCC7* geni tarafından kodlanan, 4000 aminoasitten fazla polipeptid uzunluğu ve yaklaşık 470kD'luk moleküler ağırlığı ile en büyük protein kinazlardan bir tanesidir (120, 121). C-terminalinde bulunan protein kinaz altbirimi, PI3-kinaz ailesine dahildir. DNA-PKcs ailesi diğer iki ana DNA onarım cevabı kinaz enzimlerinden, "ataxia telangiectasia" mutasyonlu kinaz (ATM) ve ATM ve RAD3 ilişkili (ATR) kinazı içermektedir.

DNA-PKcs'nin kinaz aktivitesinin kaybı sonucunda radyo dalgalarına olan hassasiyet artmakta ve V(D)J rekombinasyonu mekanizmasında bozukluk oluşmaktadır (122). Ek olarak, DNA-PKcs hasarlı hücrelerde iyonize radyasyon nedenli DSB kırıklarının büyük bir çoğunluğu normal kinetiğinde onarılsa da onarımı yavaş gerçekleşen kırıklardan bu protein sorumludur (111).

2.6.2.3) Ligaz 4/XRCC4

Son ligasyon basamağı Ligaz 4'ün XRCC4 ile kurmuş olduğu komplekse bağlıdır (108). Bu iki genin birden inaktivasyonu radyo dalgalarına hassasiyete ve V(D)J rekombinasyonunun gerçekleşmemesine neden olmaktadır. XRCC4 proteini Ligaz 4 proteinini stabilize eder ve ligaz aktivitesinin başlamasını sağlar (123). Ancak,

XRCC4 sessizleştirilmiş “knockout” fenotipler bu proteinin NHEJ sürecinde başka fonksiyonlarının olduğunu da göstermiştir (124). Ligaz 4 ve *XRCC4*, DNA-PK kompleksi ile etkileşim içerisindedir. Bu durum, Ku70/80 ve DNA-PKcs'nin NHEJ reaksiyonu için önemini ortaya koymaktadır.

LIG4 veya *XRCC4* genlerinin inaktivasyonu NHEJ'in beyin gelişimindeki hayati rolünü gerçekleştirememesine neden olmaktadır (124, 125, 126). “Knockout” farelerde geç embriyogenez aşamasında beyinde postmitotik nöron hücrelerinde kitlesel apoptoz gözlemlenmiştir. Bu fenotipin şiddetinin NHEJ defekti derecesi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. İlginç olarak, bu fenotip proapoptotik genler olan *p53* veya *ATM* genlerinin inaktivasyonu ile geri döndürülebilmektedir. Apoptotik cevap alınan nöronlarda tam olmayan NHEJ komplekslerinin DSB onarımı sağlayan diğer yolları engellediği düşünülmektedir (127).

2.6.2.4) Yardımcı NHEJ Faktörleri

2.6.2.4.1) XLF (Cernunnos)

XLF proteininin keşfi iki farklı çalışma grubu tarafından farklı yollarla gerçekleştirilmiştir. İlk çalışma grubu bu proteini, *XRCC4* geni ile büyük bir benzerliğe sahip olduğu için “XRCC4 like factor” (XLF) olarak isimlendirmiştir. İkinci bir çalışma grubu ise, analiz ettikleri hastalarda mikrosefali ve immün sistem bozuklukları ile aynı genin ilişkili olduğunu tespit ettikleri için bu gene “*Cernunnos*” ismini vermişlerdir (8, 9).

XLF proteininin inaktivasyonu V(D)J rekombinasyonunda kısmi bozulmaya ve yavaş DSB onarımına neden olmaktadır (128). XLF proteini *XRCC4* ile stabil bir kompleks oluşturabilmektedir. XLF, DNA'ya bağlanarak *XRCC4*/Ligaz 4 aktivitesini uyarmakta ve NHEJ'in geç aşamalarında yanal fonksiyonunu gerçekleştirmektedir.

Son yıllarda yapılan *in silico* çalışmalarda, *XRCC4* ve XLF proteinine benzerliği olan bir başka protein olan ve *XRCC4* ve XLF paraloğu (PAXX) olarak adlandırılan başka bir protein keşfedilmiştir. Bu protein, Ku70/Ku80 ile etkileşmekte ve NHEJ komplekslerinin DNA ucunda stabilize edilmesini sağlamaktadır (129, 130).

2.6.2.4.2) Artemis

Artemis ilk olarak radyo-hassas T-B-SCID hastalarında tespit edilmiştir. Artemis, N-terminalinde bir nükleaz alt birim içermekte ve DNA-PKcs ile etkileşmektedir. Artemis, özellikle V(D)J rekombinasyonu süresince oluşan DNA “hairpin” yapılarının açılmasında etkilidir. İyonize radyasyon maruziyeti sonrasında oluşan DSB’ler için özellikle heterokromatin bölgede yavaş kinetiği olan onarım gerçekleşmesi gereklidir (111). Artemis proteininin “hairpin” yapıyı açabilmesi için DNA-PK ile etkileşmesi gerekmektedir. Yapılan ilk çalışmalarda, DNA-PK tarafından gerçekleştirilen Artemis fosforilasyonunun Artemisin aktivitesi için gerekli olduğu yönünde hipotezler öne sürülmüştür. Ancak daha sonra ortaya çıkan veriler, DNA-PK aktivitesinin otofosforilasyonla aktive olduğu ve bununla birlikte DNA-PK kompleksinde üç boyutlu yapı değişiklikleri olduğunu göstermiştir (114). Bir nükleaz olan Artemis proteininin diğer DNA yapılarını kesebildiğine dair net veriler elde edilememiştir. Ancak, fonksiyonel Artemis olmayan hücrelerde iyonize radyasyona aşırı hassasiyet gözlemlenmektedir. Bu durum, XRCC4/Ligaz 4 kompleksinin oluşabilmesi için gerekli olan DNA uç modifikasyonlarının Artemis proteinin nükleaz aktivitesine bağımlı olduğunu göstermektedir.

2.6.2.4.3) Diğer DNA Uç İşleme Faktörleri

Çoğu hasar durumunda DNA uçlarının doğrudan ligasyonu mümkün değildir. Genellikle hasarlı nükleotid veya eklentilerin çıkartılıp yeni nükleotidlerle etkin bir biçimde değiştirilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle, NHEJ mekanizmasında bu tip “bozuk DNA uçlarının” temizlenebilmesi için bazı enzimler bulunmaktadır. Hücrelerde, Artemis nükleazına ek olarak, DNA ucundaki bu tip bozuklukların temizlenmesinde rol oynayan çeşitli eksonükleazlar bulunmaktadır (10). NHEJ’de rol oynayan Werner helikaz DNA uçlarından nükleotid çıkartmayı sağlayan eksonükleaz alt birime sahiptir (131). Buna ek olarak, homolog rekombinasyondaki aktivitesi daha iyi bilinen CtIP nükleaz, G1 fazındaki hücrelerde serbest DNA uçlarının işlenmesinde görev almaktadır (132).

Ligasyonun gerçekleşmesinin önündeki bir diğer engel de 3’-OH veya 5’-PO₄ gruplarının yerine 3’-PO₄ veya 5’-OH gruplarının varlığıdır. Bu problem polinükleotid kinaz enzimi aracılığıyla, 3’-PO₄ grubunun çıkartılması ve 5’-PO₄ grubunun

eklenmesi ile çözülmektedir (133). Bu enzim XRCC4 ile etkileşime girerek XRCC4 proteininin DNA uçlarında konumlanmasını sağlamaktadır.

Fazlalık olan nükleotidlere ek olarak, DNA uçlarındaki tek iplik fazlalıkları da DNA uç işleme açısından önemli bir konudur. Replikatif polimerazlar DNA uçlarında fonksiyonel değildir. Özelleşmiş bir DNA polimeraz ailesi olan X-ailesi, DNA tek iplik fazlalıklarının işlenmesinde görev almaktadır (134). Pol λ ve Pol μ enzimleri yalnızca DNA uçlarına nükleotid ekleme yaptıkları için bu görev için etkisiz kalmaktadır. Pol λ ve Pol μ 'nün eksikliğinde NHEJ mekanizmasının etkinliği sürdürülmekte, bununla birlikte, onarım sırasında oluşan delesyonlarda artış meydana gelmektedir (134). Bu polimeraz ailesinin bir diğer üyesi olan terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT), kalıp gereksiz DNA uçlarına nükleotid ekleyebilmektedir. Bu, teorik olarak mutajenik bir durumdur. TdT ifadenmesi B-hücrelerinde Ig genlerinin rekombinasyonunun gerçekleştiği gelişimsel aşama ile sınırlıdır ve V(D)J rekombinasyonu sırasında Ig genine ait diziye rastgele nükleotidler eklenmesiyle varyasyon artışına neden olmaktadır (135).

2.6.2.4.4) Diğer DSB Fraksiyonlarıyla İlişkili Faktörler

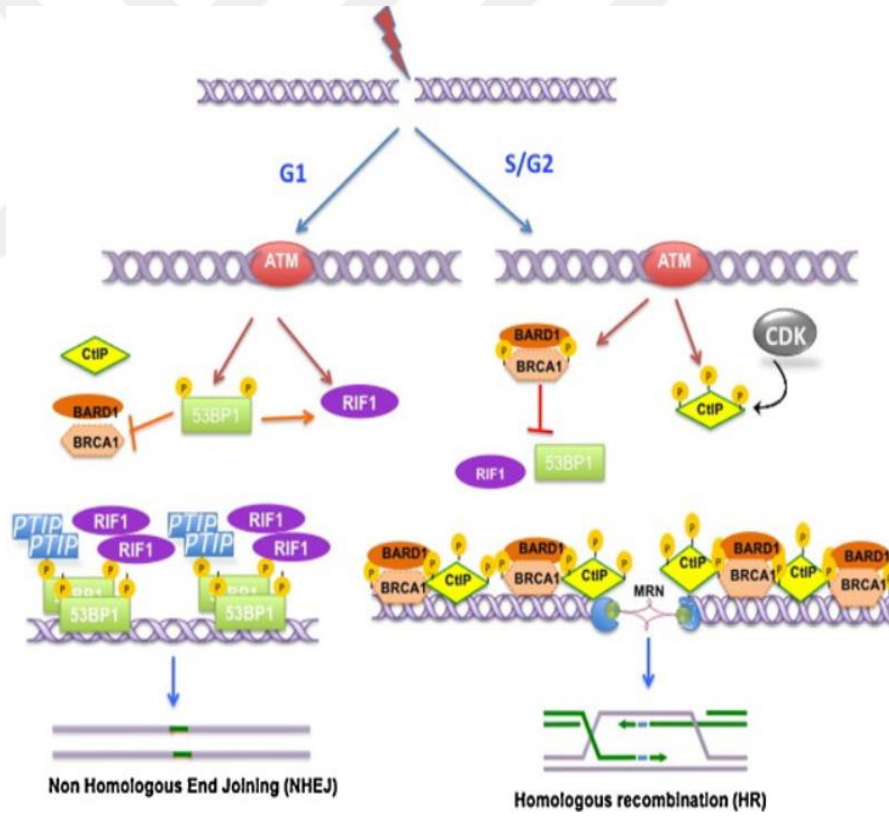
DNA uçlarındaki alt fraksiyonların temizlenmesinde DNA işleme mekanizmalarına ek olarak zor kırıklar veya karmaşık DNA hasarlarının ligasyon etkinliğini arttırmak için gerekli bazı faktörler bulunmaktadır. DSB onarım kinetiğine dair ileri analizler, heterokromatin bölgelerde gerçekleşen çift iplik kırıklarının onarımı için G1 fazında gerçekleşen NHEJ ve G2 fazında gerçekleşen HR sürecinde kromatin yapının açılması gerektiğini göstermiştir (114, 115). Kromatin yapının açılmasının başlaması için H2AX histonunun (γ -H2AX), MRE11/RAD50/NBS1 kompleksinin, ATM kinazın ve bazı birkaç enzimin fosforilasyonu gereklidir. Ek olarak, fosforilasyon, DSB bölgesinde ubiquitin eklenmesinin başlaması için de gereklidir.

NHEJ ile ilişkili bazı faktörler reaksiyonu bloke etmese de fonksiyonda kısmi eksikliklere neden olmaktadır. Örneğin, XLF proteinindeki bozukluklarla birlikte ATM proteininin eksikliği, V(D)J rekombinasyonunda azalmaya neden olmaktadır. NHEJ'in çekirdek faktörlerindeki eksikliklere nazaran bu durumun neden olduğu fenotip çok daha etkisizdir (136). İleri genetik incelemeler, bu mutasyonların, NHEJ'in

paralel alt yolaklarının tercihine ve kısmi fonksiyon kayıplarına neden olduğunu göstermiştir.

2.6.3) DNA Çift İplik Kırıkları Tamir Mekanizmaları Arasındaki Denge

DNA çift iplik kırıklarının onarımını sağlayan iki ana yolak olan NHEJ ve HR arasındaki düzenlemenin kırık tipine özel olarak yapılmaktadır (Şekil 8) (108, 137). Örneğin, onarımda kalıp olarak kullanılan kardeş kromatidlerin olmaması nedeniyle memeli hücrelerinde G1 fazında gerçekleşen bir çift iplik kırığı HR ile onarılamamaktadır. Öte yandan, NHEJ için gerekli olan ikinci DNA ipliğinin olmaması nedeniyle replikasyon çatalında bozulmaya neden olan DNA kırıkları sadece HR ile onarılmaktadır (138).



Şekil 8: NHEJ/HR tercih mekanizmaları (139).

2.6.3.1) Hücre Döngüsüne Bağlı Olarak DSB Onarım Tercihi

NHEJ yolağı onarım için homolog bir kalıba ihtiyaç duymadığı için tüm hücre döngüsü boyunca fonksiyoneldir. Öte yandan, HR ile onarım için homolog bir kalıba

ihtiyaç vardır. Çoğu omurgalıda homolog kromozomlar bulunuyor olmasına rağmen, bu kromozomlar yüksek ökaryotların aksine genellikle onarım için kullanılmamaktadır. Bu nedenle, HR yalnızca DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatidlerin varlığı durumunda gerçekleşebilmektedir. Beklentilerin aksine, G2 fazındaki DSB'ler yine de NHEJ ile onarılmaktadır. HR ancak onarımı zor olan kırıkların yavaş bir kinetikte onarılması amacıyla fonksiyonelleşmiştir (115). Homolog rekombinasyonun ilk adımı olarak 3' tek iplikli DNA'nın olması şartı için gerekli olan ekzonükleaz aktivitenin eksikliği genel olarak G1 ve G0 fazlarında neden homolog rekombinasyonun gerçekleşmediğini açıklayabilmektedir (140). Ekzonükleaz aktivitenin düşüklüğü, düşük seviyede bulunan ekzonükleaz CtIP ve S ile G2 fazlarında aktivite gösteren siklin bağımlı kinazlardan (CDK) kaynaklanmaktadır.

2.6.3.2) BRCA1 ve Homolog Rekombinasyonun Uyarılması

HR aktivitesinin S ve G2 fazları dışında olmaması ekzonükleaz aktivitenin eksikliğiyle açıklanabiliyor olmasına rağmen bu durum her iki yolağın da aktif olduğu S ve G2 fazlarındaki DNA onarım yolağının seçimini açıklayamamaktadır. Replikasyonda replikasyon çatalının yeniden başlayabilmesi için özgül olarak DNA uçları etrafında HR oluşmaktadır. Bu nedenle, NHEJ proteinleri aktif bir şekilde homolog rekombinasyonu güçlendirici aktiviteleri dengelemelidir. Bu fonksiyon aktif CtIP proteininin yanı sıra BRCA1 proteininin etkinliğini de gerektirmektedir (141). BRCA1 proteininin bu süreçteki rolü tam olarak aydınlatılmamış olsa da HR aktivasyonunun doğru bir şekilde gerçekleşebilmesi için ubiquitin ligaz aktivitesine bağlı olarak etki gösterdiği öne sürülmektedir (142).

2.6.3.3) 53BP1 ve NHEJ'in Uyarılması

S fazındaki hücrelerde inhibe edilmeyen ekzonükleaz aktivite tehlike oluşturabilmektedir. Replike olmayan DNA üzerindeki çift iplik kırıkları onarım kalıbı olarak kardeş kromatidlerin bulunmaması nedeniyle HR ile onarılamamaktadır. Bu nedenle bazı proteinler, bu tip çift iplikli kırıkların NHEJ tarafından onarımını imkansız hale getiren tek iplikli DNA oluşumunu önlemek için ekzonükleaz aktiviteyi azaltmaktadır. DNA uçlarının kesilmesini bloke eden ana düzenleyici RIF1 proteini ile birlikte 53BP1 proteindir (143). 53BP1 proteini ilk olarak TP53 ile etkileşen bir

protein olarak keşfedilmiştir. RIF1 proteini ise ilk olarak telomere bağlanan bir protein olarak tespit edilmiştir (144, 145). Sonuç olarak, DSB onarım yolağının tercihi birbirine karşıt olan kuvvetlerin onarımı NHEJ ya da homolog rekombinasyona doğru itmesiyle gerçekleşmektedir.

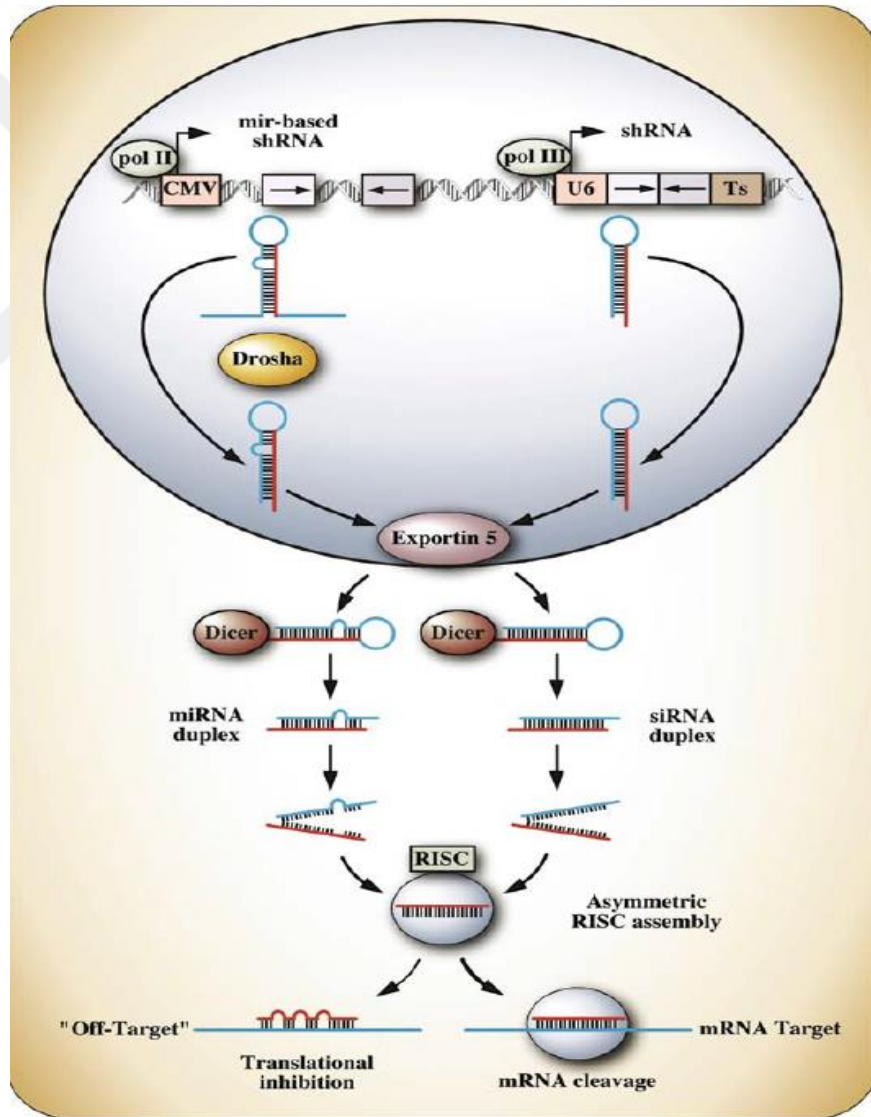
2.7) Memelilerde RNA İnterferans Yolakları

RNA interferans (RNAi) teknolojisi *C. elegans*, *Drosophila* ve bitkiler ile yapılan çalışmalarda dsRNA (çift iplikli RNA) kullanılarak homoloji temelli bir sessizleştirme mekanizmasının varlığının fark edilmesi ile keşfedilmiştir (146). dsRNA kendi dizisine homoloji gösteren ilgili RNA transkriptlerini bulup çoğu durumda bu hedeflerin yok edilmesini sağlamaktadır (146). Omurgasız sistemlerde yapılan çalışmalarla birlikte, RNAi ile ilgili pek çok biyokimyasal etkileşimin aydınlatılması RNAi sistemini memeliler için kullanışlı bir genetik araç haline getirmiştir. Keşfinden bu yana RNAi teknolojisi çalışmaları her ne kadar gen sessizleştirme ve susturma çalışmalarına odaklanmış olsa da, ökaryotik evrim sürecinde RNAi mekanizmaları virüs ve mobil elementlere karşı bir savunma sistemi olarak gelişmiştir (147). Bunlara ek olarak, RNAi yolağı bileşenleri gelişimsel süreçte endojen genlerin regülasyonunu yine endojen olan küçük kodlanmayan RNA'lar sayesinde sağlamaktadır (148, 149, 150).

Endojen olarak transkripsiyonu gerçekleşen ve gelişimsel süreçte gen düzenlenmesinden sorumlu yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki ve saç tokası şeklindeki RNA'lar, Dicer proteini aracılığı ile olgun form olan 21-22 nükleotidlik parçalara ayrılmakta ve genelde mükemmel olmayan baz eşleşmeleri ile benzer dizilere sahip mRNA'ları bularak bağlanmaktadır (151). *C. elegans*, *Drosophila*, fare ve insanlarda belirlenmiş saç tokası şeklindeki RNA'lara topluca microRNA (miRNA) adı verilmiştir (148, 149) (Şekil 9).

Yüksek ökaryotlarda, dsRNA bağımlı sessizleştirme için RNAi yolağının 3 çekirdek bileşenine gereksinim duyulmaktadır. Bunlar, “*Drosha*”, “*Dicer*” ve “*Argonaute*” (*Ago*) gen ailesi üyeleri. *Drosha* ve *Dicer* RNAi yolağının en başındaki aşamalar olan dsRNA'nın 21-25 nükleotidlik rehber dsRNA'ya dönüştürülmesinde katalitik rol üstlenmektedir. *Dicer* ve *Drosha* proteinlerinin her ikisi de RNase III ailesi proteinlerdir. dsRNA'yı keserek karakteristik biçimde 5' uçta fosfat grubu ve 3'uçta

eşleşmeyen iki nükleotidlik bir çıkıntı oluşturmaktadırlar (152). Drosha ve Dicer ile ilişkili genler bir adet dsRNA tanıma/bağlanma alt birimi ve iki adet tekrar RNase III altbirimi içermektedir. Bunlara ek olarak, Dicer bir adet DExH/DEAH ATPase/RNA helikaz altbirim ve bir adet PAZ (RNAi genlerine özgü) alt birimi olmak üzere iki korunmuş dizi motifi içermektedir. RNA tarafından indüklenmiş kesme kompleksi ("RNA-induced Silencing Complex"; RISC) içerisinde yer alan Argonaute ise bir PAZ alt birimi ve RNase H katalitik çekirdeği ile yüksek derecede benzerliği bulunan bir adet PIWI alt birimi taşımaktadır. (153). Ago ile ilişkili efektör kompleksler hedef mRNA tahribatı, translasyonel inhibisyon ya da transkripsiyonel sessizleştirmeyi tetikleyebilmektedir (148).



Şekil 9: Memelilerde post-transkripsiyonel gen sessizleştirme mekanizması (154).

Mikro RNA'lar iki tek iplikli RNA'dan oluşmaktadır. Bu ipliklerden bir tanesi "yolcu" diğeri ise "rehber" iplik olarak adlandırılmaktadır. Yolcu iplik RNA RISC ile etkileşime geçtiği zaman degrades edilmektedir. Degredasyon aktivitesi kompleksin Ago ve PIWI altbirimlerinden kaynaklanmaktadır (146). RISC proteinleri rehber ve yolcu ipliklerin birbirinden ayrılmasını ATP bağımsız olarak gerçekleştirmektedir (155, 156). ATP, RISC proteinlerinin katalizlediği reaksiyon sonrasında mRNA moleküllerinin çözülüp, uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (147). Rehber RNA ipliğinin 5' ucu hedef mRNA'ya bağlanıp eşleştirme görevini üstlenirken, 3' uç mRNA molekülünü kesim için RISC kompleksinin uygun bölgesi için fiziksel olarak hazırlamaktadır (147).

Rehber ipliğın RISC kompleksine nasıl bağlandığı henüz bilinmemektedir. Bununla birlikte, bu sürecin nükleotid dizisine bağımlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Başlangıçta hedef mRNA dizisi belirlenip RNAi mekanizmasına ait üyeler tarafından yakalandığı zaman, RISC kompleksi hedef mRNA'yı keserek translasyonu gerçekleştiremez hale getirmektedir (146). Çoğu durumda başlangıçta gerçekleşen süreç mRNA yıkımının artarak ilerlemesini tetiklemektedir. mRNA yıkımı sonrasında oluşan fragmentler dsRNA sentezi için kullanılmaktadır. Rehber RNA'nın bağlanmış olduğu mRNA hedefleri bazen RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRP) tarafından ikinci bir ipliğın sentezi için kalıp olarak kullanılmaktadır. Böylelikle oluşan dsRNA yeni bir miRNA gibi davranıp sitozolde mRNA sessizleştirilmesi için kullanılmaktadır (157,158).

2.7.1) RNAi Yolağında Drosha

Drosha, çekirdekte transkripsiyonu gerçekleştirilen ve içerisinde çoklu miRNA içeren pri-miRNA'ların işlenmesinde etkin rol oynamaktadır. Drosha, çekirdekte 500-650 kDA'luk büyük bir kompleks oluşturması nedeniyle "mikroprosesör" olarak da adlandırılmaktadır (159). DGCR8/Pasha mikroprosesör aktivite için kofaktör görevi görmekte ve Drosha kofaktörü ile etkileşimi sonucunda pri-miRNA'ya bağlanmaktadır (159). Drosha, pri-miRNA'yı ssRNA ve dsRNA bölgelerinin kesiştiği noktadan tanıyarak yaklaşık 11 bç'lik bir bölümden ya da dsRNA'nın bir helikal dönümü kadar kesim yapmaktadır. Sonuç olarak ortaya çıkan pre-miRNA 3' ucunda eşleşmemiş iki nükleotid çıkıntısı bulduran bir saç tokası yapısındadır. Drosha ile

işlenen pre-miRNA 3' ucunda bulunan eşleşmeyen iki nükleotid çıkıntısı aracılığıyla tanınarak Exportin-5 ile çekirdekte taşınmaktadır.

2.7.2) RNAi Yolağında Dicer

Dicer dsRNA'yı 21-27 nükleotidlik parçalara ayırmaktadır. Drosha'ya benzer şekilde, kesim işlemini sahip olduğu ardışık RNase III alt birimi sayesinde gerçekleştirmektedir. Dicer, pre-miRNA'yı 3' ucunda bulunan eşleşmemiş iki nükleotid çıkıntısından tanımaktadır. Bu bölgeyi tanıyıp bağlanan Dicer dsRNA'yı uç kısımdan keserek belirli bir uzunlukta (yüksek ökaryotlarda yaklaşık 22 nükleotid) olgun miRNA'yı oluşturmaktadır (146, 150). Ago ve Dicer ailesi üyelerinde yüksek düzeyde korunmuş olan yaklaşık 130 amino asitlik PAZ alt birimi uç kısımdan tanıma ile ilişkilendirilmektedir. Ek olarak, Ago'ya ait olan PAZ alt birimi kristalize edilerek incelendiğinde, yapısı oligo-bağlanma katlanmaları ile yüksek benzerlik saptanmıştır (160, 161).

2.7.3) RNAi Yolağında Argonaute

Ago ailesi proteinleri transkripsiyonel susturma aşamasında sürece katılmakta ve küçük RNA'ların rehberliğinde bağlanılan gen hedeflerinin sessizleştirilmesinde görev almaktadır. Ago ailesi üyeleri fonksiyonları için çok önemli olan iki adet yüksek düzeyde korunmuş PAZ ve PIWI alt birimlerine sahiptir. PAZ alt birimi rehber RNA'ya 3' uçtan bağlanmayı sağlar (161). PIWI alt biriminin önemi, bir hipertermofilik arkebakter *Pyrococcus furiosus*'da yapısının aydınlatılmasıyla anlaşılmıştır (162). PIWI, RNase H enzimi katalitik çekirdeği ile yüksek benzerlik barındırmakta ve bir adet DDH motifi bulundurmaktadır. Eğer rehber RNA ile hedef olan mRNA tam olarak eşleşirse, RISC, 5' uca bağlanmakta ve 10 nükleotid mesafeden RNA'yı kesmektedir (163). Yüksek ökaryotlarda çoğunlukla görülen tam olmayan baz eşleşmesi durumunda ise translasyonun başlaması ve elongasyon engellenmekte, de-adenilasyon, nükleaz degradasyonu için sitoplazmik "P cisimciğinin" taşınması veya bu üçünün kombinasyonu gerçekleşebilmektedir (164).

2.8) Kanser ve miRNA İlişkisi

Mikro RNA'lar post-transkripsiyonel olarak gen ifadenmesini düzenleyen küçük kodlamayan RNA'lardır. Mikro RNA'lar, fizyolojik ve işlevsel

fonksiyonlarının yanı sıra kanser de dahil olmak üzere insanda bazı hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadırlar. Çoğu miRNA normal dokular ile karşılaştırıldığında tümör kökenli hücre hatlarında daha düşük seviyelerde ifade edilmektedir. Kanser patogenezinde rol alan miRNA ifadenme değişimlerinin büyük bir kısmı genomda kopya sayısı artışı, delesyon veya yeniden düzenlemeler ile gerçekleşmektedir (165, 166). Lenfoma (167, 168), kolorektal kanser, akciğer kanseri (168), meme kanseri (169) ve glioblastoma (170) da dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde miRNA ifadenmesine ait düzenlemenin bozulduğu ve özgül olarak bazı miRNA'ların kanser gelişiminde rol oynadığı geçmişte yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri baskılayan miRNA'lar için "oncomir" terminolojisi kullanılmaktadır. Buna ek olarak, metastazı düzenleyen eden miRNA'lar ise "metastamir" olarak adlandırılmaktadır (171).

2.8.1) Meme Kanserinde İlaç Direnci ile İlişkili miRNA'lar

Mikro RNA'lar tüm kodlayan genlerin yaklaşık %60'ını düzenlemektedir. Meme kanseri de dahil olmak üzere neredeyse tüm kanser tiplerinde miRNA'ların düzenleme kaybı gözlemlenmiştir. Günümüzde miRNA'ların ilaç direnci ile ilişkileri aydınlatılmakta ve buna paralel olarak özgün tedavi stratejileri geliştirmeye yönelik çalışmalar da artarak devam etmektedir (172).

Meme kanserinde bazı miRNA'ların doksorubisin, mitoksantron, tamoksifen ve trastuzumab direnci gelişiminde rol oynadığı saptanmıştır. Örneğin, miR-21'in aşırı ifadenmesi, uzun süreli ilaç maruziyeti durumunda trastuzumab hedef geni olan PTEN'in baskılanmasına neden olarak ilaç direncine neden olabilmektedir (173).

Kemoterapinin başarısız olmasındaki en önemli sebeplerden bir tanesi olan P-glikoprotein (P-gp) aşırı ifadenmesi antiasiklin antibiyotikler, bitki alkaloidleri, taksanlar ve platinyum temelli ilaçlar da dahil olmak üzere pek çok ilacın hücreler üzerindeki etkinliğini azaltmaktadır (174). Kovalchuk ve arkadaşları, MCF7 hücre hattında düşük miR-451'in *MDR1* ifadenmesini baskılaması nedeniyle, bu miRNA'nın azalmasının doksorubisin direncini arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, bu çalışmada *MRP2* ifadenmesini düzenlediği düşünülen miR-489'un ifadenmesindeki azalma doksorubisin ve sisplatin karşı gelişen dirençle de ilişkilendirilmiştir (175).

DNA hasarına neden olan kemoterapötik ilaçlara karşı genotoksik hasar cevabı olarak birkaç farklı yolağın aktivasyonu gerçekleşmektedir. Apoptoz öncülü ve karşıtı programların dengede kalmasını düzenleyen miRNA'lar, normal hücrelerin karsinogenezinde rol alabilmektedir. Bu bağlamda, Shen ve arkadaşları, *in vivo* ve *in vitro* ortamda miR-155'in ektopik olarak ifadenmesinin tamoksifen varlığında hücrel sağkalımı arttırdığını ve ilaç direnci gelişiminde rol oynadığını göstermişlerdir. miR-155 inhibisyonunun ise apoptoz ve tamoksifen hassasiyetine sebep olduğunu saptamışlardır (24). Bir başka çalışmada, van Jaarsveld ve arkadaşları, meme kanseri ve normal hücrelerde sisplatin ve radyasyon ile DNA hasarını uyarılmış ve hasarla ilişkili 725 miRNA'nın ifadenmesini karşılaştırmışlardır. Bu karşılaştırma sonucunda, meme kanseri hücrelerinde normal hücrelerden farklı olarak 121 miRNA'nın ifadelenmediği ve miR-93, miR-183, let-7a, miR-141, miR-23b, miR-369-3p, miR-296-5p, miR-193a-3p ve miR-34b'nin ise ifadelenmediği ortaya konulmuştur.

Çoklu faktörlerin etkileşimi nedeni ile ortaya çıkabilecek ilaç direncinin oluşum sürecinin daha iyi anlaşılabilmesi için He ve arkadaşları, adriamisin ve paklitaksel dirençli MCF7 hücre hatlarında düzenlemesi bozulmuş RNA'lara ait dizilerin belirlenebilmesi için mRNA'lar ve kodlanmayan küçük RNA'ların transkriptom profillemesini yapmıştır. İlaça dirençli hücreler ile ilaç hassasiyeti olan hücreler kıyaslandığında mRNA ve miRNA'ların benzer biçimde değişiklikler gösterdiği gösterilmiştir.

3) GEREÇ ve YÖNTEM

3.1) Kullanılan Gereçler

Deneyle sırasında kullanılan gereçler Tablo 13'te verilmiştir.

Tablo 4: Kullanılan gereçler

Karbondiyoksitli etüv (Heraeus)	PCR Kabini (UVP/PCR Cabinet)
Masaüstü soğutmalı makro- ve mikrosantrifüj (Eppendorf)	PCR Cihazı (BioRad C1000 Thermal Cycler)
Buz makinesi (Elektrolux)	Spektrfotometre cihazı (Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spectrophometer)
Hassas terazi (Precisa)	Plate Santrifüj (Sigma 4-15C)
Vorteks (Velp Scientifica)	PCR cihazı (Agilent Surecycler 8800)
Distile Su cihazı-Millipore Direct Q UV	Inverted Mikroskop (Olympus IX53)
Çeker ocak (Bilser)	Güç Kaynağı (Olympus U RFL-T)
Laminar Kabin (Telstar Bio vanguard green line)	Santrifüj (Herolab Unicen 15D)
İnkübatör (Panasonic MCO-170 AIC UV)	İnkübatör (Thermo Scientific IGS-100)
Masaüstü Santrifüj (Hettich Universal 320R)	Isıtmalı manyetik karıştırıcı (VWR VMS-C7)
Isı bloğu (Eppendorf Thermomix Comfort)	Vorteks (Scientific Industries Vortex Genie-2)
Kuru Isıtma ve Soğutma Bloğu (Torrey Pine/SC-25/ Echotherm)	ELISA okuyucu
Çalkalayıcı (Nüve SL-350)	Yatay elektroforez sistemi (Syngene/Ingenious Ihr)
Mikrofüj (Counter/microfuge 22R)	Elektroforez Güç Kaynağı (Consort EV3020)
Jel görüntüleme sistemi (SynGene)	Mikrodalga fırın-Arçelik
Real Time PCR (Biorad CFX96 Real Time system)	Su Banyosu (Mettler/WNB14)
İKA mini G Santrifüj	PCR Cihazı (BioRad C1000 Touch)

3.2) Hücre Kültürü

3.2.1) Kültür Koşulları

Bu deneylerde kullanılan MCF7 hücre hattı ŞAP Enstitüsü'nden (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir. Bu parental hücre hattı insan meme epitelinin farklılaşmış özelliklerine sahip bir insan meme kanseri modelidir (176). Bunun yanı sıra, deneylerde MCF7 hücre hattının 400nm ve 1000nm doksorubisine dirençli alt hücre hatları kullanılmıştır (Tablo 5) (13). Farklı konsantrasyonlarda ilaca dirençli hücre hatları dirençli oldukları konsantrasyonda doksorubisin ile kültüre edilmiştir. Tek

tabakalı olarak yüzeye tutunan hücreler, %10 (v/v) ısıtılarak inaktive edilmiş fetal bovin serum (FBS) (Cegrogen, Almanya) ve %1 (v/v) Penisilin/ Streptomisin (Cegrogen, Almanya) eklenmiş RPMI 1640 (Cegrogen, Almanya) (Bkz: Ek A) besiyerinde kültüre edilmiştir. Kùltürler Panasonic inkübatör (Japonya) içerisinde 37°C, %95 (v/v) nemlendirilmiş hava ve %5 (v/v) CO₂ olacak biçimde inkübe edilmiştir. Tüm çalışmalarda, hücre kültürü solüsyonları uygun kalitede kullanılmıştır. Hücre kültüründe kullanılan bütün ekipmanlar ticari olarak ön sterilizasyondan geçmiş ve tek kullanımlık sarf malzemeleridir.

Tablo 5: Çalışmada kullanılan hücre hatları

Hücre Hattı	Dirençlilik endeksi (R)
MCF7/S	-
MCF7/400Dox	107
MCF7/1000Dox	160

3.2.2) Hücre Alt Kùltürleri (Pasajlama)

Hücreler 25 cm² ve 75 cm²'lik filtreli kültür kaplarında (Grainer, Almanya) kültüre edilmiştir. Kùltür kabı yüzeyini kaplayan hücre miktarı %80 doluluk oranını aştığı zaman, hücreler %0,025 (w/v) tripsin-EDTA (Biological Industries, İsrail) ile muamele edilerek kültür kabı yüzeyinden kaldırılmıştır. Kùltür kabı yüzeyine yapışmış durumdaki hücrelerin içerisinde bulunduğu besiyeri ortamı boşaltılıp kültür kabı yüzeyi FBS'siz besiyeri ile yıkanmıştır. 25 cm² yüzey alanı için 1 mL Tripsin-EDTA, 75 cm² yüzey alanı için ise 3 mL Tripsin- EDTA kullanılmıştır. Kùltür kapları hücreler gözle görülecek şekilde kap tabanından serbest kalıncaya kadar 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Hücre büyütülmesinde kullanılan besiyeri, deneyin ileri aşamalarında kullanılacak miktara göre kültür kabı yüzeyinden serbest bırakılmış hücrelerin üzerine eklenmiştir. Kùltür besi ortamı ile homojenize edilen hücreler yeni kültür kaplarına aktarılmış veya daha sonraki deneylerde ya da hücrelerin dondurulması amacıyla ayrılmıştır.

3.2.3) Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Tripsinize edilerek kültür kabı yüzeyinden ayrılmış olan hücreler (5 x 10⁶ hücre/mL'den fazla olmamak şartıyla) hacimce 1:1 oranda FBS içeren kültür besiyeri

ile yıkandıktan sonra 15 mL'lik konik tabanlı santrifüj tüplerine (Isolab, Almanya) aktarılıp 800 g kuvvette 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant dökülerek pellet içerisinde bulunan hücreler 1 mL dondurma besiyeri (%90 (v/v) FBS ve %10 DMSO (Amresco, Amerika)) içerisinde tekrar süspansiyon edilmiştir. Dondurma besiyeri dondurma tüplerine (Greiner, Avusturya) aktararak 30 dakika boyunca buz içerisinde muhafaza edilmiştir. Dondurma tüpleri 24 saat boyunca -20°C'de bekletildikten sonra -80°C'ye transfer edilmiştir. Uzun süreli olarak saklanacak hücreler sıvı azot tankı içerisinde saklanmıştır. Dondurma tüpleri -80°C'deki dondurucudan veya sıvı azot tankından alınıp tekrar kullanılacağı zaman hızlı bir şekilde 37°C'ye aktarılmıştır. Dondurma tüpü içeriğinde tamamen çözülme gerçekleştiğinde 15 mL'lik konik tabanlı santrifüj tüplerine dağıtılarak 800g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak pellet kültür kabına uygun olacak hacimde besiyerinde tekrar süspansiyon edilerek kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler uygun büyüme koşullarında inkübe edilmiştir.

3.3) MTT Hücre Çoğalma Testi

Doksorubisin MCF7 ve ilaç dirençli MCF7 hücre hatları üzerindeki etkileri MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Biochemica, İngiltere) ile kullanıcı talimatlarına uygun bir şekilde belirlenmiştir. Tetrazolium tuzunun mitokondride gerçekleşen indirgenme reaksiyonuna bağlı renk değişimi spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir.

Hücreler 100 µL hacimde, 10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kabına (Greiner, Avusturya) ekildikten sonra 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bir günlük inkübasyon süresinin sonunda, hücrelerin içerisinde buldukları besiyeri tahliye edilerek üzerine 100 µL'lik taze besiyeri eklenmiştir. Bir günlük ilk inkübasyon süresinin sonunda her bir kültür kabında bir kolona hücresiz besiyeri ve bir kolona da 4µM doksorubisin içeren hücresiz besiyeri konulmuştur. Kullanılan her bir hücre hattı için ayrı ayrı olmak üzere, bir kolona ilaç uygulaması yapılmamış olan hücreler ve iki kolona 4µM doksorubisin uygulaması yapılmış hücreler ekilmiştir. İlaç uygulama süresinin sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT (5mg/mL) tuzu eklenmiştir. Hücreler 4 saat boyunca MTT tuzu ile inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µL, %10 (w/v) SDS solüsyonu eklenerek formazan kristallerinin çözünür hale gelebilmesi için gün aşırı inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda

kültür kaplarının 540nm dalga boyundaki absorbands değeri spektrofotometrik mikro kültür kabı okuyucu (Euroimmun, Amerika) ile okunarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.4) Alkali Tek Hücreli Jel Elektroforezi (Comet Analizi)

Hücre kültüründe 1, 6, 12 ve 24 saat 4 μ M doksorubisine maruz bırakılmış parental MCF7/Sens, MCF7/400Dox ve MCF771000Dox hücre hatları uygulama sonunda tripsin-EDTA ile kültür kabı yüzeyinden kaldırılmıştır. Süspansede haldeki hücreler 15 mL hacmindeki konik tabanlı santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra Thoma lamı kullanılarak hücre sayısı belirlenmiştir. 350g'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant döküldükten sonra hücre pelleti üzerine 1000 μ L fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatantın tamamı tüpten uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 1000 μ L PBS eklenerek tekrar süspansede edilmiştir. PBS-hücre karışımından 10.000 hücre olacak biçimde ~10 μ L örnek alınarak önceden 60°C'de eritilmiş 75 μ L, %0,5'lik (w/v) düşük erime noktasına sahip agaroz ("Low melting point agarose"; LMA) ile karıştırılmıştır. Lamlar, bir gün önceden 1/3'lük kısmına kadar %1'lik (w/v) normal erime noktalı agaroz ("Normal melting point agarose"; NMA) ile kaplanmıştır. Hücre-agaroz karışımı, NMA ile kaplanmış olan lam üzerine yayılmış ve üzeri lamel ile nazikçe kapatılmıştır. Daha sonra lamlar agaroz tamamen polimerize olana kadar (~20 dakika) buz aküsünün üzerinde buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda lamel kaydırılarak uzaklaştırılmış ve üzerine önceden 60°C'de eritilmiş 90 μ L %1'lik (w/v) LMA eklenmiştir. Sonrasında lam üzerine lamel kapatılmış ve buz aküsü üzerinde agaroz tamamen polimerize oluncaya kadar buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda lamel lam üzerinden kaydırılarak kaldırılmıştır. Preparatlar, taze hazırlanmış Liziz tamponu (Bkz: Ek B) içerisinde +4°C'de ve karanlık bir ortamda 2 saat bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra bütün işlemler karanlıkta yürütülmüştür. Preparatlar elektroforez tankına dizilmiş ve üzerine yavaşça soğuk elektroforez tamponu (Bkz: Ek B) eklendikten sonra tampon içerisinde 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 24V, 600mA'de 30 dakika boyunca elektroforez gerçekleştirilmiştir. Elektroforez tamamlandıktan sonra preparatlar nötralizasyon tamponu (Bkz: Ek B) içerisinde 5 dakika bekletilmiş ve bu işlem 3 kere tekrar edilmiştir. Preparatlar fikse edilmek üzere, 20 dakika %100 metanol içerisinde bekletildikten sonra 30 dakika 50°C etüvde

kurutulmuştur. Görüntüleme için preparat üzerine 15 µL etidyumbromür (2µg/mL) damlatıldıktan sonra üzerine lamel kapatılıp 2 dakika bekletilmiştir. Analiz için TRITC filtresi (532nm dalga boyu) ile floresan mikroskop (Olympus IX53, Japonya), kullanılmıştır. Görüntüler 200 kat yakınlaştırma ile çekilmiş ve her bir deney grubu için 3X50 adet hücre sayılarak hücrelerin kuyruk momentleri analiz edilmiştir.

3.5) İmmünofloresan Boyama

İmmünofloresan boyama, 1, 6, 12 ve 24 saat 4µM doksorubisine maruz bırakılmış parental MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarına uygulanmıştır. P53 bağlayan protein-1 (53BP1), çift iplikli DNA kırıklarının belirlenmesinde kullanılan ve aynı zamanda NHEJ mekanizmasının tercih edilmesini sağlayan önemli bir belirteçtir. Bu proteinin immünofloresan olarak boyanması için poliklonal Anti-53BP1 antikoru (Abcam, İngiltere) ve bu antikoru hedefleyen Alexa Fluor® 488 konjuge edilmiş ikincil antikor olan Keçi Anti-Tavşan IgG H&L (Alexa Fluor® 488) antikoru (Abcam, İngiltere) kullanılmıştır.

Hücreler, 9cm²'lik kültür kabında (Greiner, Avusturya) 100.000 başlangıç hücre sayısı ile kültüre edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonucunda, besiyeri atılmış ve besiyerinin uzaklaştırılması için yüzeydeki hücreler PBS ile nazikçe 2 kez yıkanmıştır. Hücreler, oda sıcaklığında -20°C'de soğutulmuş saf metanol içerisinde 10 dakika fikse edilmiştir. Fikse edilen hücreler, immünofloresan boyamaya kadar PBS içerisinde +4°C' de saklanmıştır. Boyama işlemi öncesinde kültür kabının yüzeyini kaplayacak kadar PBS eklenerek hücreler 3 kez yıkanmıştır. Örneklerin üzerine %0,2 (v/v) Triton X-100 içeren PBS solüsyonu eklenerek (PBST) (Bkz: Ek B) 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler, 3 kez 5 dakikalık sürelerle PBS içerisinde yıkanmıştır. Örnekler %1 (w/v) bovin serum albümin (BSA) içeren PBST içerisinde bekletilerek antikorların özgül olmayan bağlanması önlenmiştir. Daha sonra 1:500 (v/v) oranında %1 BSA içeren PBST solüsyonu içerisinde seyreltilmiş olan 75 µL birincil antikor 9cm²'lik kültür kaplarının üzerine eklenerek +4°C, nemlendirilmiş ortamda 2 saat 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda birincil antikor solüsyonu dökülmüş ve örnekler 3 kez 5 dakikalık sürelerle PBS içerisinde yıkanmıştır. Bu aşamadan sonraki bütün aşamalar karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. İkincil antikor 1:1000 (v/v) oranında %1 BSA içeren PBST

solüsyonu içerisinde seyreltilerek nemlendirilmiş ortamda ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra ikincil antikor solüsyonu dökülmüş ve örnekler 3 kez 5 dakikalık sürelerle PBS içerisinde yıkanmıştır. Son olarak karşıt boyama yapmak amacıyla hücrelerin üzerine 10 µL DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (Abcam, İngiltere) eklenerek üzeri 25mm x 25mm'lik lamel ile kapatılmıştır. Lamel kapatıldıktan sonra preparatlar 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra analiz edilmiştir.

Floresan mikroskopik analiz için FITC (525nm dalga boyu) ve DAPI (461nm dalga boyu) filtresi kullanılmıştır (Olympus IX53, Japonya). Görüntüler, 200 kat yakınlaştırma ile yakalanmıştır. Her bir deneysel grup için farklı hücre alanlarından 3x100 adet hücre sayılmış ve her bir hücre için belirlenen sinyal sayısı analiz edilmiştir.

3.6) mRNA İfadelenme Analizleri

3.6.1) Total RNA izolasyonu

RNA izolasyonu sırasında kullanılan bütün gereçler ticari olarak RNaz'sız olarak temin edilmiştir. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sırasında kullanılan distile deiyonize su dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilerek RNazsız hale getirilmiştir (Bkz. Ek B).

MCF7, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulaması sonrasında 1, 6, 12 ve 24. saatlerde, ikili biyolojik tekralı olarak total RNA izole edilmiştir. Total RNA izolasyonu "Guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform" yöntemi (152) tabanlı ticari PureZOL™ (Bio-Rad, Amerika) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 25cm²'lik kültür kabında 1-5 x 10⁶ hücreye 1 mL olacak şekilde kültür kabına TRİtidy G™ eklendikten sonra pipetaj yapılarak hücreler kap yüzeyinden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kültür kabındaki homojenatın tümü 2 mL'lik mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 1 mL TRİtidy G™ başına 200 µL kloroform eklendikten sonra 1 dakika boyunca vortexlenmiştir. Vortexlenen tüpler 3 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. 12.000 g kuvvette, 4°C'de, 15 dakika santrifügasyon gerçekleştirilerek en üstteki şeffaf RNA fazı alınarak 1,5 mL'lik yeni bir tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpe aktarılan faz ile eşit hacimde %99,8 etanol (Merck,

Almanya) eklenmiş ve örnekler 30 dakika -20°C’de bekletilmiştir. Süre sonunda 12.000 g kuvvette, 4°C’de ve 15 dakika santrifügasyon ile RNA çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan RNA pelleti üzerine %75 (v/v) etanol eklenmiştir. Pellet süspansiyon edilmeden ve zedelenmeden tüp alt-üst edilmiş ve sonrasında pellete dikkat ederek tüm %75 (v/v) etanol tüpten uzaklaştırılmıştır. Tüp ters çevrilerek 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilerek RNA pelletinden alkolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Pellet üzerine 40 µL DEPC- ddH₂O eklenerek 10 dakika boyunca 60°C’de inkübasyon ile RNA çözdürülmüştür. Elde edilen total RNA örneği -80°C’de saklanmıştır.

İzole edilen total RNA’nın konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop (Thermo Scientific, Amerika) ile analiz edilmiştir. Nükleik asitlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi için 260 nm, protein ve fenolik maddelerden kaynaklanabilecek kontaminasyonun belirlenmesi için 280 nm ve EDTA, karbonhidrat ve fenolik madde nedenli kontaminasyonların belirlenebilmesi için de 230 nm dalga boylarında optik yoğunluk (OD) ölçülmüştür. RNA saflığının değerlendirilmesinde $OD_{260}/OD_{280} = 1,6-2,1$ ve $OD_{260}/OD_{230} = 2,0-2,2$ aralıkları kabul edilmiştir. RNA konsantrasyonu aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Eşitlik 1).

$$\mu\text{g/mL RNA} = 40 \times \text{Seyreltme faktörü} \times OD_{260}$$

(Eşitlik 1)

RNA örneklerinin konsantrasyonları göz önünde bulundurularak cDNA sentezinde kullanılmak üzere tüp başına 1µg total RNA olacak hacimde RNA örnekleri tüplere dağıtılmıştır.

3.6.2) Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”; RT-PCR)

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için iScript™ cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Tüp başına 100fg- 1µg total RNA olacak biçimde paylaştırılan RNA örnekleri nükleazsız su ile 15 µL’ye tamamlanarak sekonder yapıların bozulması için 65°C’de 5 dakika Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad, Amerika) cihazında inkübe edilmiştir. Tüp üzerine 4 µL 5X iScript Reaction Mix (Bio-Rad, Amerika) ve 1 µL iScript Reverse Transkriptase (Bio-Rad, Amerika) eklenmiştir. Reaksiyon koşulları Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad, Amerika) cihazı kullanılarak Tablo 6’da belirtildiği

gibi gerçekleştirilmiştir. Tüm çalışmalar buz üzerinde ve RNaz'lerden arındırılmış malzeme ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 6: RT- PCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre
Primer tavlama (Annealing)	25°C	5 dakika
Ters transkripsiyon	46°C	20 dakika
Ters Transkriptaz inaktivasyonu	95°C	1 dakika
Bekleme	4°C	∞

3.6.3) Yarı Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Sentezlenen cDNA, ifedelenme analizleri için Yarı Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Semi-quantitative Real Time PCR”; qPCR) yöntemi ile çoğaltılmıştır. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) geni memeli hücrelerindeki sürekli ifadelenmesi nedeniyle içsel kontrol olarak kullanılmıştır. *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *LIG4*, *XLFI* ve *GAPDH* genlerine ait ileri ve geri primerler genlerin “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” (www.ncbi.nlm.nih.gov) veri tabanından elde edilen mRNA dizilerine göre NCBI Primer BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. Primer dizi bilgileri ve DNA ürününün uzunluğu Tablo 7’de verilmektedir.

Tablo 7: İfadeleme analizi için kullanılan primer bilgileri.

Gen Adı	Primer Adı	Primer Dizisi	PCR ürünü bilgileri	
<i>XRCC4</i>	<i>XRCC4-F</i>	5'- ATGTTGGTGAAGTGAAGAAAAGCA -3'	Ekzon: 3-4	PCR ürünü: 208 baz çifti
	<i>XRCC4-R</i>	5'- GCAATGGTGTCCAAGCAATAAC -3'		
<i>XRCC5</i>	<i>XRCC5-F</i>	5'- GTGCGGTCGGGGAATAAGG -3'	Ekzon: 3-4	PCR ürünü: 86 baz çifti
	<i>XRCC5-R</i>	5'- GGGGATTCTATACCAGGAATGGA -3'		
<i>XRCC6</i>	<i>XRCC6-F</i>	5'- TTGCTTCTGCCTAGCGATACC -3'	Ekzon: 6-7	PCR ürünü: 107 baz çifti
	<i>XRCC6-R</i>	5'- AAACCTGGATCATCAAACCGTT -3'		
<i>XRCC7</i>	<i>XRCC7-F</i>	5'- CTGTGCAACTTCACTAAGTCCA -3'	Ekzon: 7-9	PCR ürünü: 91 baz çifti
	<i>XRCC7-R</i>	5'- CAATCTGAGGACGAATTGCCT -3'		
<i>Lig4</i>	<i>Lig4-F</i>	5'- GAACGTATGCAAATGCACAAAGA -3'	Ekzon: 3	PCR ürünü: 99 baz çifti
	<i>Lig4-R</i>	5'- ACCTTCAGTAGGAGAAGCACC -3'		
<i>XLF</i>	<i>XLF-F</i>	5'- CACTGATTCTACGGGTGCGAA -3'	Ekzon: 3-4	PCR ürünü: 146 baz çifti
	<i>XLF-R</i>	5'- CCTCACTTGGCACTGTAATGC -3'		
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH-F</i>	5'- TGCACCACCAACTGCTTAGC -3'	Ekzon: 7-8	PCR ürünü: 208 baz çifti
	<i>GAPDH-R</i>	5'- GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'		

qPCR analizleri CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Amerika) cihazında Sso Advances Universal SYBR Green SuperMix (Bio-Rad, Amerika) kullanıcı talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Toplam hacmi 10 µL olan reaksiyon karışımında sırasıyla; 5 µL 2X SsoAdvances Universal SYBR Green SuperMix, 2 µL 1:1 (v:v) ileri (20µM) ve geri primer (20µM) karışımı ve 3 µL cDNA ürünü, PCR tüpü içerisinde bir araya getirilmiştir. PCR koşulları Tablo 8'de verilmektedir.

Tablo 8: qPCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Polimeraz			
Aktivasyonu ve İlk Denatürasyon	95°C	30 saniye	1 Döngü
Denatürasyon	95°C	10 saniye	
Primer Tavlama (Annealing), Polimerizasyon, Floresan Işımanın Tespiti	60°C	15 saniye	40 Döngü
Erime Eğrisi Analizi	65- 95 °C	3 saniye/ döngüde 0.5 °C'lik artışlar ile	1 Döngü

Deney her örnek için iki tekrarla ve her bir primer çifti için bir adet kalıp eklenmeyen kontrol (Negatif kontrol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Otomatize edilmiş sistem ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda analizler kullanıcı talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Amerika)). qRT-PCR sonuçlarının sayısal olarak belirlenmesi SYBR-Green boyasına ait emisyon dalga boyu olan 521nm'deki floresan sinyallerin algılanması ile gerçekleşmiştir. Her PCR döngüsünde floresan sinyal tespiti yapılarak yarı logaritmik skalada grafikler ortaya çıkartılmıştır.

qPCR analizi Livak ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak yapılmıştır (178). Bu yöntem, qPCR ürünlerinin karşılaştırmalı olarak analizini sağlamaktadır. Yöntemde, kontrol grubuna ait kalıp DNA'daki içsel bir referans genine ait ifadenme seviyeleri kullanılarak, örneklere ait ifadenme düzeyleri normalize edilmektedir. *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *XLF* ve *LIG4* genlerine ait ifadenme verileri *GAPDH* geni referans alınarak analiz edilmiştir (Eşitlik 2 ve Eşitlik 3).

$$\text{Değişim miktarı (Kat)} = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

$$\Delta\Delta CT = (C_{T \text{Hedef}} - C_{T \text{Referans Gen}})_{\text{Deney grubu}} - (C_{T \text{Hedef}} - C_{T \text{Referans Gen}})_{\text{Kontrol Grubu}} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

qPCR sırasında kullanılan plakalar arasındaki kalibrasyon için MCF7/S hücre hattının kontrol grubu kalibratör örnek kullanılmıştır. Kalibratör gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

3.7) Mikro RNA (miRNA) İfadelenme Analizleri

3.7.1) Mikro RNA (miRNA) İzolasyonu

Mikro RNA (miRNA) izolasyonu sırasında kullanılan bütün gereçler ticari olarak RNaz'sız olarak temin edilmiştir. miRNA izolasyonu ve cDNA sentezi sırasında kullanılan distile deiyonize su DEPC ile hazırlanmıştır (Bkz. Ek B).

MCF7, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücreleri 25cm²'lik kültür kaplarında kültüre edilmiş ve hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulaması sonrasında 1, 6, 12 ve 24. saatlerde yaklaşık olarak 3x10⁶ hücreden miRNA izolasyonu MiRNeasy Mini Kit (Qiagen, Amerika) ile gerçekleştirilmiştir. Tek tabaka halinde büyümekte olan hücrelerin içerisinde bulunduğu besiyeri ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin yüzeyi yeterli miktarda PBS solüsyonu ile iki kere yıkanmıştır. Kültür kabı içerisine 700 µL Qiazol Liziz Solüsyonu (Qiagen, Amerika) eklenmiştir. Eklenen liziz solüsyonu kültür kabı yüzeyine dikkatlice yayılarak 2 dakika bekletilmiştir. Qiazol pipetajlanarak hücrelerin tamamen parçalanıp kültür kabı yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Homojenize edilen hücreler 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Nükleoprotein komplekslerin parçalanabilmesi amacıyla tüpler 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüp üzerine 140 µL saf kloroform (Merck, Almanya) eklenip 30 saniye vortekslenmiştir. Daha sonra, tüpler oda sıcaklığında 3 dakika bekletilmiştir. Lizat-kloroform karışımı 12.000g ve 4°C de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifügasyon sonrasında ortaya çıkan 3 fazlı yapının en üstündeki içerisinde miRNA'ların bulunduğu şeffaf fazdan yaklaşık 350 µL örnek alınarak 1,5 mL'lik temiz bir tüpe aktarılmıştır. RNA fazının bulunduğu tüpe 1,5 hacim -20°C' de soğutulmuş %99,8'lik etanol eklenmiştir. Tüp hafifçe ters düz edilerek karıştırılmış ve hiç beklenmeden bir sonraki aşamaya geçilmiştir. Örneğin 700 µL'lik kısmı MiRNeasy Mini Kitinin sağlamış olduğu spin kolona yüklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında, 10.000g'de 15 saniye santrifüjlenmiştir. 2 mL'lik toplama tüpüne geçmiş olan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra örneğin kalan kısmı kolona eklenerek tekrar oda sıcaklığında, 10.000g'de 15 saniye santrifügasyon gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpü

boşaltıldıktan sonra MiRNeasy spin kolon üzerine 700 µL RWT Buffer eklenmiştir. Tüp oda sıcaklığında, 10.000g'de 15 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifügasyon sonrasında toplama tüpü boşaltılmış ve kolon üzerine 500 µL Buffer RPE eklenmiştir. Tüp oda sıcaklığında, 10.000g'de 15 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifügasyon sonrasında toplama tüpü boşaltılmış ve kolon üzerine tekrar 500 µL Buffer RPE eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında, 10.000g'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Bu aşamada spin kolon üzerinde solüsyon kaldığı gözlemlenirse santrifügasyon tekrar edilebilmektedir. Spin kolon tabanındaki kolona temas etmeden yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alınmıştır. Tüpler oda sıcaklığında, 14.500g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Spin kolon temiz 1,5 mL'lik tüpe aktarılmış ve üzerine kit tarafından sağlanan RNazsız sudan 30 µL eklenmiştir. Tüp oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında, 10.000g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Spin kolon atıldıktan sonra tüp dibinde bulunan RNA -80°C'de saklanmıştır.

3.7.2.1) Mikro RNA (miRNA) Örneklerinden cDNA sentezi

Tek basamakta cDNA sentezine olanak sağlayan miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Qiagen, Amerika) kitinin bu basamakta kullanılan bileşenleri ve miktarları Tablo 9 'da verilmiştir. cDNA sentez koşulları Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 9: miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Qiagen, Amerika) kiti ve cDNA sentezi için gerekli malzemeler ve kullanılan hacim bilgileri.

Kimyasalın Adı	Hacim
5X Tepkime Tamponu	2 µL
Nükleazsız Su	5 µL
Enzim Karışımı	1 µL
Kalıp Total RNA (5 ng/µL)	2 µL
Toplam Hacim	10 µL

Tablo 10: RT-PCR inkübasyon koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre
Ters transkripsiyon	42°C	60 dakika
Revers Transkriptaz inaktivasyonu	95°C	5 dakika
Bekleme	4°C	∞

3.7.2.2) Mikro RNA (miRNA) Miktarının Yarı Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile Tespiti

RT-PCR sonrasında sentezlenen cDNA örnekleri nükleazsız distile su ile 1:60 (v:v) oranında seyreltilerek kullanılmıştır. qPCR aşamasında kullanılan miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Qiagen, Amerika) kitinin bu basamakta kullanılan içeriği ve miktarları Tablo 11’de verilmiştir. qPCR koşulları Tablo 12’de belirtilmiştir. Örneklerdeki hsa-miR-101-3p, hsa-miR-502-3p kantitasyonu için kullanılan primerler miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Qiagen, Amerika) kiti kataloğundan seçilmiştir. İçsel kontrol olarak kullanılan β -aktin genine ait primer çiftinin dizisi Tablo 13’te verilmiştir.

Tablo 11: miRNA örneklerinden elde edilmiş cDNA’ların kalıp olarak kullanıldığı qPCR içeriği.

Kimyasalın Adı	Hacim
miRCURY SYBR Green Master Mix	5 μ L
PCR primer seti	1 μ L
cDNA kalıbı (1:60 seyreltilmiş)	3 μ L
ddH ₂ O	1 μ L
Toplam Hacim	10 μL

Tablo 12: qPCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Polimeraz Aktivasyonu ve İlk Denatürasyon	95°C	10 dakika	1 Döngü
Denatürasyon	95°C	10 saniye	
Primer Tavlama (Annealing), Polimerizasyon, Floresan Işımanın Tespiti	56°C	60 saniye	40 Döngü
Erime Eğrisi Analizi	60- 95 °C	3 saniye/ döngüde 0.5°C’lik artışlar ile	1 Döngü

Tablo 13: Beta-aktin genine ait primer dizisi

Gen Adı	Primer Adı	Primer Dizisi	PCR ürünü bilgileri
<i>β-Aktin</i>	<i>β-Aktin-F</i>	5'-GGCACCCAGCACAATGAAG-3'	Ekzon: 5-6 PCR ürünü: 66 baz çifti
	<i>β-Aktin-R</i>	5'-CCGATCCACACGGAGTACTTG-3'	

qPCR analizleri CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Amerika) cihazında gerçekleştirilmiştir. Deney her örnek için iki tekrar ve bir kalıp eklenmeyen kontrol (Negatif kontrol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Otomatize edilmiş sistem ile gerçekleştirilen reaksiyonların analizler kullanıcı talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir (CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Amerika)). qRT-PCR sonuçlarının sayısal olarak belirlenmesi SYBR-Green boyasına ait emisyon dalga boyu olan 521nm'deki floresan sinyallerin algılanması ile gerçekleşmiştir. Her PCR döngüsünde floresan sinyal tespiti yapılarak yarı logaritmik skalada grafikler ortaya çıkartılmıştır.

qPCR analizi Livak ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak yapılmıştır (178). Bu yöntemi qPCR ürünlerinin karşılaştırmalı olarak analizini sağlamaktadır. Yöntemde, kontrol grubuna ait kalıp DNA'da içsel bir referans genine ait ifadenme seviyeleri tespit edilerek bu verilere göre örnekler ait ifadenme düzeyleri normalize edilmektedir. Hsp-miR-101-3p ve Hsp-miR-502-3p miRNA'larına ait ifadenme verileri Beta-aktin geni referans alınarak analiz edilmiştir (Eşitlik 4 ve Eşitlik 5).

$$\text{Değişim miktarı (Kat)} = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

$$\Delta\Delta CT = (C_T \text{ Hedef} - C_T \text{ Referans Gen}) \text{ Deney grubu} - (C_T \text{ Hedef} - C_T \text{ Referans Gen}) \text{ Kontrol Grubu} \quad (\text{Eşitlik 5})$$

qPCR sırasında kullanılan plakalar arasındaki kalibrasyon için MCF7/400Dox hücre hattının kontrol grubu kalibratör örnek kullanılmıştır. Kalibratör gen olarak hsp-miR-101-3p kullanılmıştır.

3.8) Çalışmada Kullanılan İstatistik Analiz Yöntemleri

Tüm istatistik analizlerinde SPSS (IBM, Amerika) yazılımının 24. sürümü kullanılmıştır. Deney gruplarının sayısı 30'dan fazla olduğu için ve iki veya daha fazla deney grubu birbiri ile karşılaştırıldığı için istatistik analizlerinde Student T-Test ve tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. ANOVA testinde kullanılan post hoc testi, deney gruplarındaki varyansların homojenliği dikkate alınarak seçilmiştir. Tüm analizlerde 0,05'ten küçük anlamlılık değerine sahip ($p < 0,05$) olan sonuçların arasındaki fark anlamlı olarak kabul edilmiştir.

MTT testi ile *XRCC4*, *XLFI*, hsp-miR-101-3p ve hsp-miR-502-3p ifadenme analizlerine ait deney sonuçlarının istatistiki değerlendirmesi Student T-Test ile yapılmıştır.

Deney grupları arasındaki varyanslar homojen olduğu için ($p > 0,05$) ve grupların ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olduğu için ($p < 0,05$) *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7* ve *LIG4* genlerinin ifadenme analizleri ve alkali tek hücre elektroforezi deneyine ait deney sonuçlarının istatistiki değerlendirmesi tek yönlü ANOVA testinin Tukey post hoc testi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Deney grupları arasındaki varyanslar homojen olmadığı için ($p < 0,05$) ve grupların ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olduğu için ($p < 0,05$) 53BP1 immonofloresan boyama deneyine ait sonuçlar tek yönlü ANOVA testinin Tamhane post hoc testi ile analiz edilmiştir.

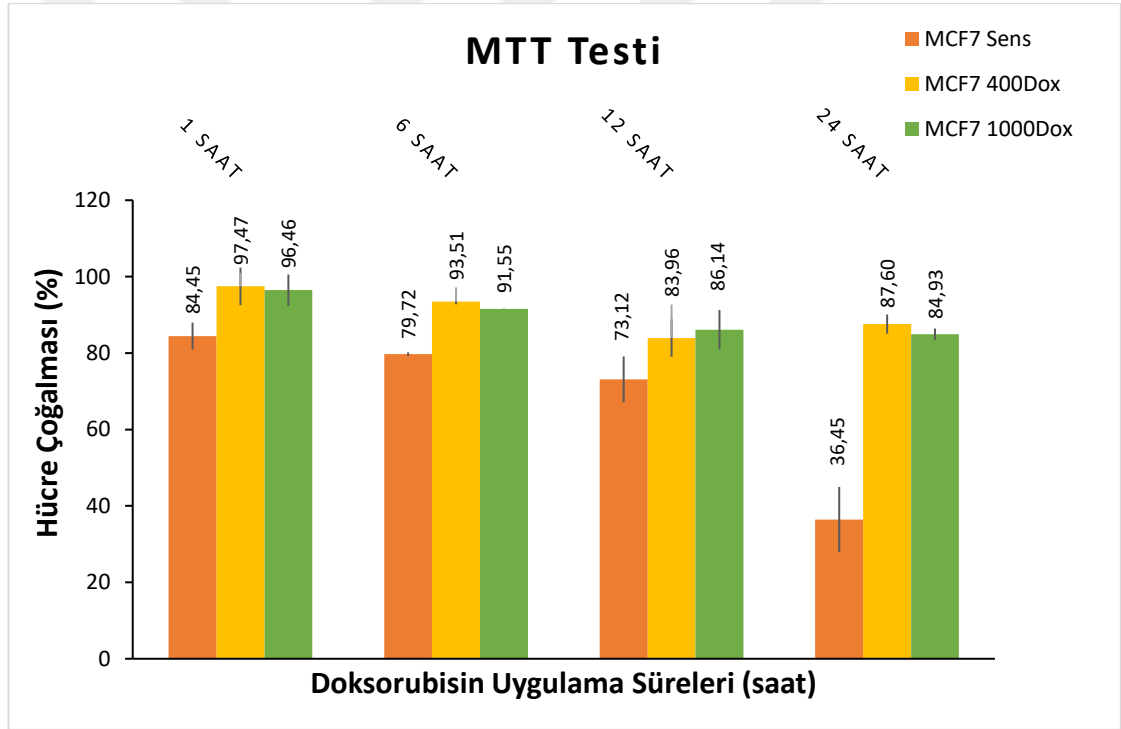
4) BULGULAR

4.1) Sitotoksosite Testi (MTT)

MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında ilaç uygulamasına bağlı olarak hücre canlılığının belirlenmesi için MTT testi yapılmıştır. Canlılık oranlarının değişimi Eşitlik 6'da belirtilen biçimde hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = (\text{Absorbans}_{\text{(Kontrol Grubu)}} / \text{Absorbans}_{\text{(Deney Grubu)}}) \times 100 \quad \text{(Eşitlik 6)}$$

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi Student T-Test ile yapılmış ve 0,05'ten küçük anlamlılık değerine sahip ($p < 0,05$) olan sonuçların arasındaki fark anlamlı olarak kabul edilmiştir. Deney sonuçları Şekil 10'da, istatistiksel değerlendirme sonuçları da Tablo 14'te gösterilmiştir.



Şekil 10: Doksorubisin uygulamasına bağlı hücre çoğalması.

Tablo 14: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre MTT testi analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

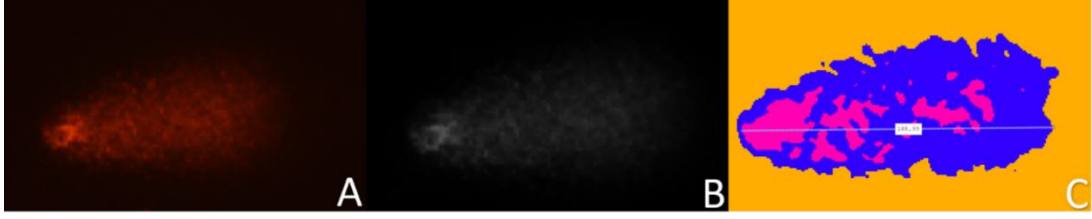
MTT														
S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
				p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05					
S-K														
S-1S					p<0,05	p<0,05	p<0,05							
S-6S					p<0,05	p<0,05	p<0,05							
S-12S					p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05				p<0,05
S-24S					p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05				p<0,05
400-K								p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-1S								p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-6S								p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-12S									p<0,05					
400-24S										p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
1000-K													p<0,05	p<0,05
1000-1S														
1000-6S														
1000-12S														
1000-24S														

MCF7/S hücre hattında, 4µM doksorubisin uygulaması sonrasında proliferasyonun %63,6 azaldığı belirlenmiştir (p<0,05). MCF7/400Dox hücre hattında, proliferasyonun ilaç uygulamasının 12. saatinde %16 azaldığı saptanmıştır (p<0,05). MCF7/1000Dox hücre hattında, proliferasyonun ilaç uygulamasının 12. ve 24. saatlerinde sırasıyla %13,9 ve %15,1 azalmış olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

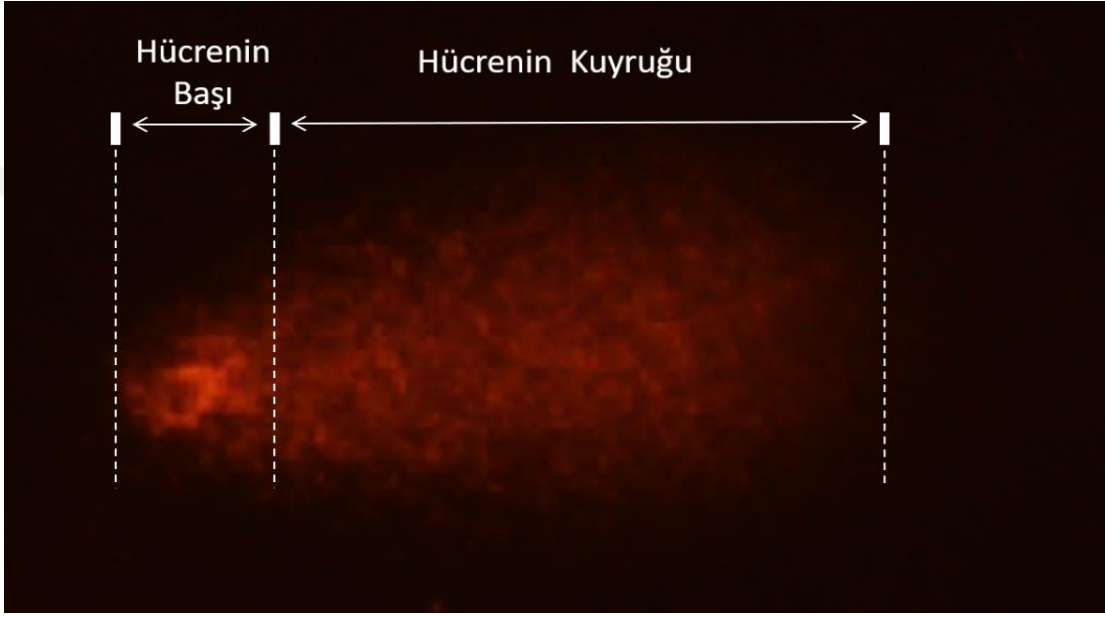
4.2) Alkali Tek Hücreli Jel Elektroforezi

MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında, DNA hasarının analizi için alkali tek hücreli jel elektroforezi (Comet analizi) yapılmıştır. Hücre kültüründe 1, 6, 12 ve 24 saat 4µM doksorubisine maruz bırakılmış MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarının analiz sonrasında görüntülemesi floresan mikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Analizler Meşe ve arkadaşlarının 2017 yılında geliştirmiş oldukları bir yazılım ile Şekil 11’de gösterildiği gibi yapılmıştır (179). Deney sonrasında kuyruklu yıldız görünümünü alan hücrelerdeki kafa ve kuyruk görüntüsü analiz edilmiştir (Şekil 12).



Şekil 11: Alkali tek hücreli jel elektroforezi analizi. A: Floresan mikroskopta TRITC filtresi ile görüntülenen hücre; B: Programın gri skalaya dönüştürdüğü görüntü; C: Analiz ekranı ve cetvel aracı.



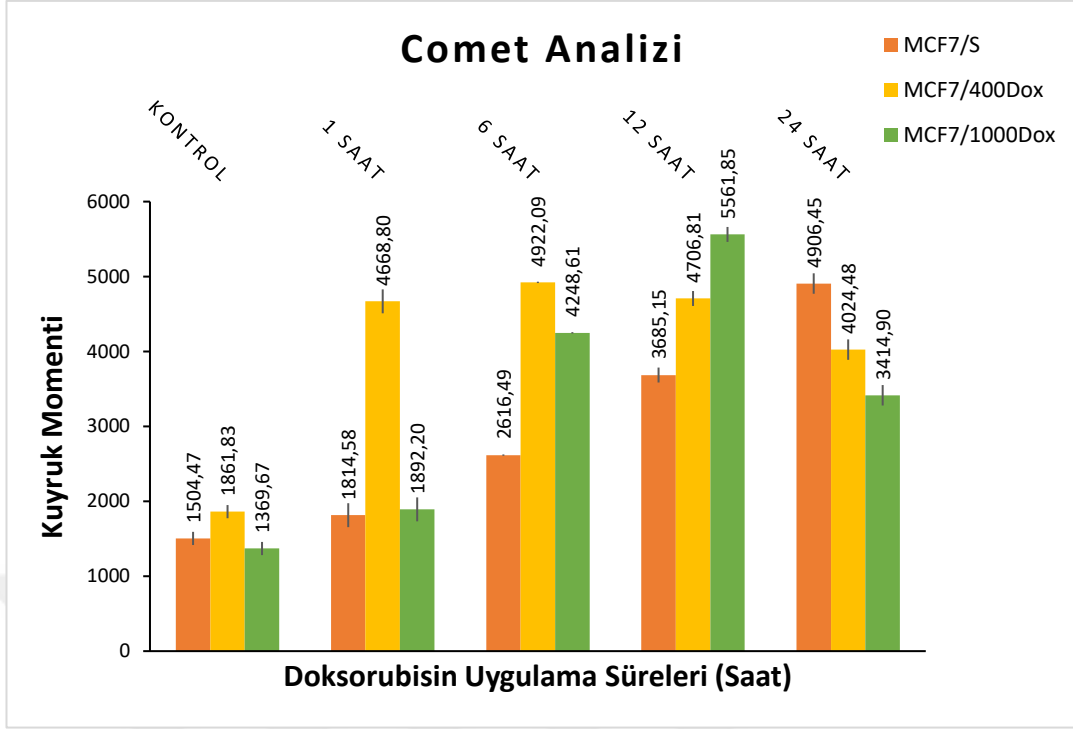
Şekil 12: Alkali tek hücreli jel elektroforezinde genotoksisitenin hesaplanmasında kullanılan parametreler.

Görüntü analizleri sonucunda, Eşitlik 7’de belirtilen hesaplamalar yapılmış ve değerlendirmelerde DNA hasarının son sayısal parametresi olarak Eşitlik 8’de verilen kuyruk momenti kullanılmıştır.

$$\text{Kuyruktaki \%DNA Miktarı} = (1 - \text{Kuyruğun Total Yoğunluğu} / \text{Total Comet Yoğunluğu}) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 7})$$

$$\text{Kuyruğun Momenti} = \text{Kuyruk uzunluğu} \times \text{Kuyruktaki \%DNA Miktarı} \quad (\text{Eşitlik 8})$$

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi tek yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır. Hangi gruplar arasında fark olduğu Tukey post hoc testi ile incelenmiş ve $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde birbirinden farklı olan gruplar belirlenmiştir. Deney sonuçları Şekil 13’te, istatistik değerlendirme sonuçları da Tablo 15’te gösterilmiştir.



Şekil 13: Doksorubisin uygulamasına bağlı DNA hasarı.

Tablo 15: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre alkali tek hücre elektroforezi analizinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

Alkali Tek Hücre Elektroforezi														
S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
		p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05
			p<0,05	p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05
				p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05
					p<0,05				p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05
						p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05
										p<0,05				
											p<0,05			
												p<0,05		
													p<0,05	
														p<0,05

MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında yapılan alkali tek hücreli jel elektroforezi doksorubisinin hücrelerde DNA hasarını uyardığını göstermiştir. MCF7/S hücre hattında 6. saatte DNA hasarı tespit edilirken MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında sırasıyla 1. ve 6. saatte hasar tespit edilmiştir.

MCF7/S hücre hattında doksorubisin uygulama süresine bağlı olarak DNA hasarı artmıştır. İlaç uygulamasının 24. saatinde oluşan DNA hasarının, kontrol grubuna göre 3,3 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

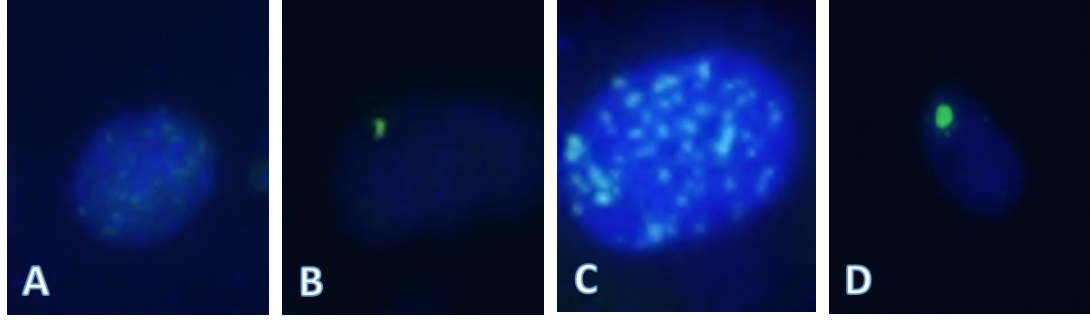
MCF7/400Dox hücre hattında doksorubisin uygulamasına bağlı oluşan maksimum DNA hasarının 6. saatte meydana geldiği belirlenmiştir. İlaç uygulamasının 6. saatindeki DNA hasarının doksorubisin uygulanmayan kontrol grubuna göre 2,7 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Doksorubisin uygulamasının 6. saatinden 24. saatine kadar DNA hasarı azalmış olup 24. saatteki DNA hasarının 6. saate göre yaklaşık %20 oranında azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

MCF7/1000Dox hücre hattında ilaç uygulamasından itibaren 12. saate kadar DNA hasarında yaklaşık 4 katlık bir artış meydana gelirken 24. saatte DNA hasarında 12. saate göre %40 oranında bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$).

4.3) 53BP1 İmmünofloresan Boyama Analizi

Bir çift iplikli DNA kırığı belirteci olan 53BP1 proteini poliklonal Anti-53BP1 antikor ve bu antikoru hedefleyen Alexa Fluor® 488 konjuge edilmiş ikincil antikor ile floresan olarak işaretlenmiştir.

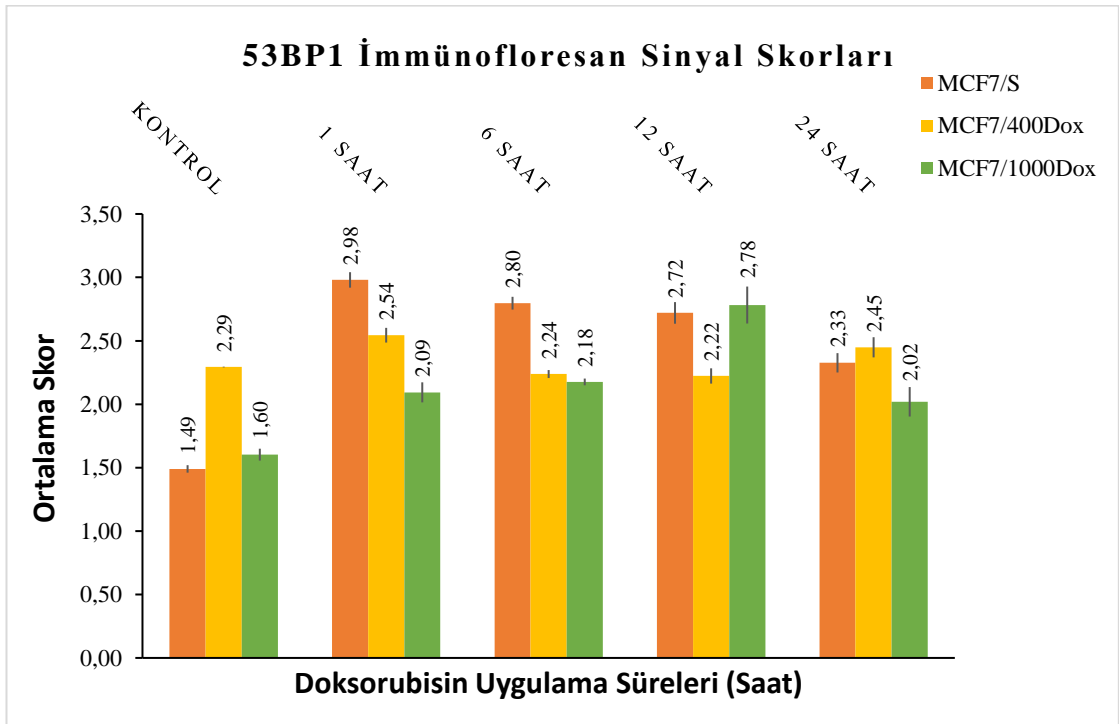
Başlangıç hücre sayısı 100.000 olarak belirlenmiş kültürlerde 1, 6, 12 ve 24 saat boyunca 4 μ M doksorubisine maruz bırakılmış MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında immünofloresan olarak boyanan 53BP1 proteini floresan mikroskop ile analiz edilmiştir. Analizler, Matsuda ve arkadaşlarının belirlemiş olduğu skora göre yapılmıştır (180). Bu sisteme göre, sinyaller kategorize edilmiş ve 4 üzerinden skorlanmıştır (Şekil 16). Sönük ve difüz boyanma stabil tip; bir veya iki belirgin sinyal odağı düşük DNA hasar cevabı (DDR); üç veya daha fazla belirgin sinyal odağı yüksek DNA hasar cevabı (DDR); 1 μ m çaptan daha büyük ve belirgin sinyal odakları büyük odaklar olarak kategorize edilmiştir. Bu kategorilere göre; stabil tip 1 puan; düşük DNA hasar cevabı (DDR) 2 puan; yüksek DNA hasar cevabı (DDR) 3 puan; büyük sinyal odakları 4 puan olarak skorlanmıştır.



Stabil Düşük DDR Yüksek DDR Büyük Odaklar

Şekil 14: MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında gözlemlenen dört tip ifadenme biçimine ait mikrograflar: (A) Stabil tip: Sönük ve difüz boyanma; (B) Düşük DNA Hasar Cevabı (DDR): Bir veya iki belirgin sinyal odağı; (C) Yüksek DNA Hasar Cevabı (DDR): Üç veya daha fazla belirgin sinyal odağı; (D) Büyük odaklar: 1µm çaptan daha büyük ve belirgin sinyal odağı.

MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında yapılan analizlerden elde edilen ortalama skorlar Şekil 15'te gösterilmektedir. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi tek yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır. Tamhane post hoc testi ile $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde birbirinden farklı olan gruplar belirlenmiştir. (Tablo 16).



Şekil 15: 53BP1 proteininin immüno floresan boyama sonuçları.

Tablo 16: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre 53BP1 immünoflorasan boyama analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

53BP1 İmmünoflorasan Boyama Deneyi Tek Yönlü ANOVA Testi Analizi														
S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
S-K	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05					p<0,05
S-1S					p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05
S-6S										p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05
S-12S										p<0,05		p<0,05		p<0,05
S-24S										p<0,05				
400-K										p<0,05				
400-1S										p<0,05				
400-6S														
400-12S														
400-24S										p<0,05				
1000-K														p<0,05
1000-1S														p<0,05
1000-6S														p<0,05
1000-12S														p<0,05
1000-24S														p<0,05

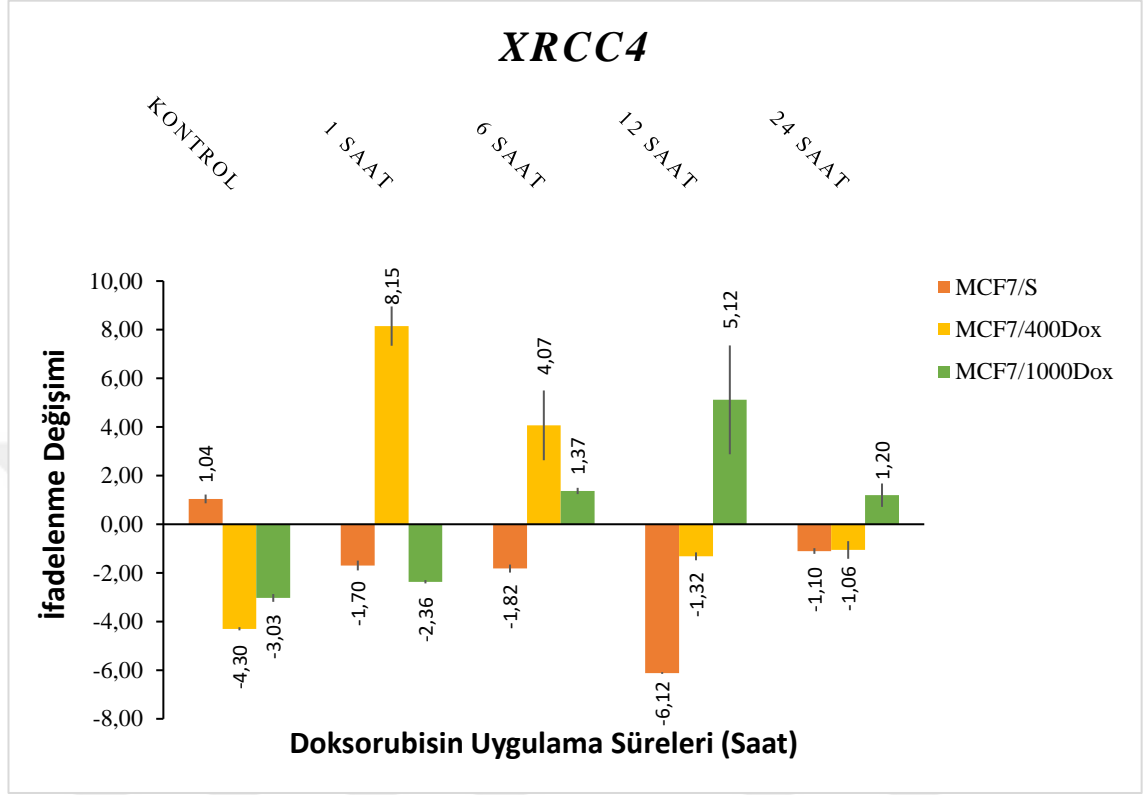
DNA çift iplikli kırıklarının 53BP1 proteininin immünoflorasan olarak boyanmasıyla gerçekleştirilen deneyin sonuçlarına göre; 1 saatlik doksorubisin uygulamasının MCF7/S hücrelerinde çift iplikli DNA kırıklarına neden olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, MCF7/1000Dox hücre hattında 12. saatte çift iplikli DNA kırıkları tespit edilmiştir. Öte yandan, MCF7/400Dox hücre hattında 24 saatlik doksorubisin uygulamasına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir skor değişimi belirlenmemiştir.

4.4) mRNA İfadeleme Analizleri

MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat sürelerle 4µM doksorubisin uygulanan örneklerden RNA izole edilmiştir. RNA kalıplarından sentezlenen cDNA'lar *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *LIG4*, *XLF* ve *GAPDH* genlerinin ifadeleme analizi için kalıp olarak kullanılmıştır. İfadeleme analizinde *GAPDH* geni referans gen olarak kullanılmıştır. *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *LIG4* ve *XLF* genlerinin amplifikasyon verileri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile değerlendirilmiştir (203). Erime eğrisi analizleri ile *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *LIG4*, *XLF* ve *GAPDH* genine ait PCR ürünlerinin özgün olarak çoğaldığı doğrulanmıştır.

XRCC4 genine ait sonuçlar ve istatistik analizi sırasıyla Şekil 16 ve Tablo 17'de gösterilmiştir. İstatistik analizleri, Student T-Test ile yapılmış ve 0,05'ten küçük

anlamlılık değerine sahip olan ($p<0,05$) sonuçların arasındaki fark anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 16: XRCC4 geni ifadeleme analizleri.

Tablo 17: Hücre hatlarına 4 μ M doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre XRCC4 geni ifadeleme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

		XRCC4														
		S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
S-K					p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05			
S-1S					p<0,05			p<0,05	p<0,05							p<0,05
S-6S					p<0,05			p<0,05	p<0,05							p<0,05
S-12S						p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05				p<0,05	p<0,05
S-24S							p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-K										p<0,05						p<0,05
400-1S										p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05
400-6S										p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05			
400-12S																
400-24S																
1000-K																
1000-1S																
1000-6S																
1000-12S																
1000-24S																

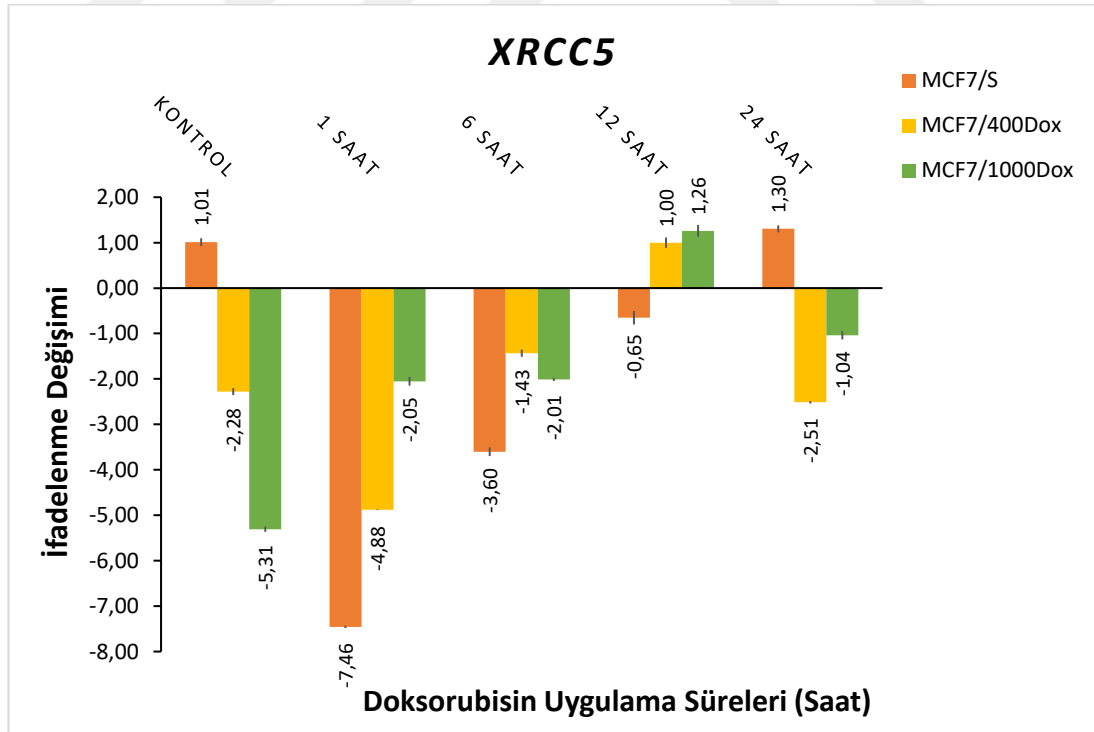
İfadeleme analizlerine göre, MCF7/S hücre hattındaki XRCC4 ifadeleme düzeyinin MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarına göre sırasıyla 5,34 ve 4,07 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). MCF7/S hücre hattında doksorubisin uygulamasından 12 saat sonra XRCC4 ifadelemesinde kontrol grubuna

göre 7,16 katlık bir düşüş olduğu ($p<0,05$), 24. saatte ise 5,06 katlık bir artış olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir ($p<0,05$).

MCF7/400Dox hücrelerinde doksorubisin uygulamasının 1. saatinde *XRCC4* gen ifadenmesi kontrol grubuna göre 12,45 kat artmıştır ($p<0,05$). 6. ve 12. saatlerde sırasıyla 4,08 ve 9,47 katlık anlamlı bir düşüş belirlenmiştir ($p<0,05$).

MCF7/1000Dox hücre hattındaki *XRCC4* ifadenme düzeyi ilaç uygulamasından sonraki 12. saate kadar anlamlı bir artış göstermiştir. *XRCC4* geninin MCF7/1000Dox hücre hattındaki ifadenmesi 6. ve 12. saatlerde sırasıyla kontrol grubuna göre 4,4 ve 8,15 katlık bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Öte yandan, doksorubisin uygulamasının 12. ve 24. saatleri arasında 3,92 katlık bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$).

XRCC5 genine ait sonuçlar ve istatistik analizi sırası ile Şekil 17 ve Tablo 18’de gösterilmiştir. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi tek yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır. Tukey post hoc testi ile $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde birbirinden farklı olan gruplar belirlenmiştir.



Şekil 17: *XRCC5* gen ifadenme analizleri.

Tablo 18: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre *XRCC5* geni ifadenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

XRCC5														
S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
S-K	p<0,05	p<0,05				p<0,05			p<0,05	p<0,05				
S-1S			p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
S-6S			p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05					p<0,05	p<0,05
S-12S					p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05		
S-24S					p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05		
400-K										p<0,05				
400-1S							p<0,05	p<0,05					p<0,05	p<0,05
400-6S										p<0,05				
400-12S									p<0,05	p<0,05				
400-24S										p<0,05			p<0,05	
1000-K											p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
1000-1S													p<0,05	
1000-6S													p<0,05	
1000-12S														
1000-24S														

İfadenme analizleri sonuçlarına göre, MCF7/S hücre hattındaki *XRCC5* ifadenme düzeyinin MCF7/1000Dox hücre hattına göre 6,32 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. ($p<0,05$).

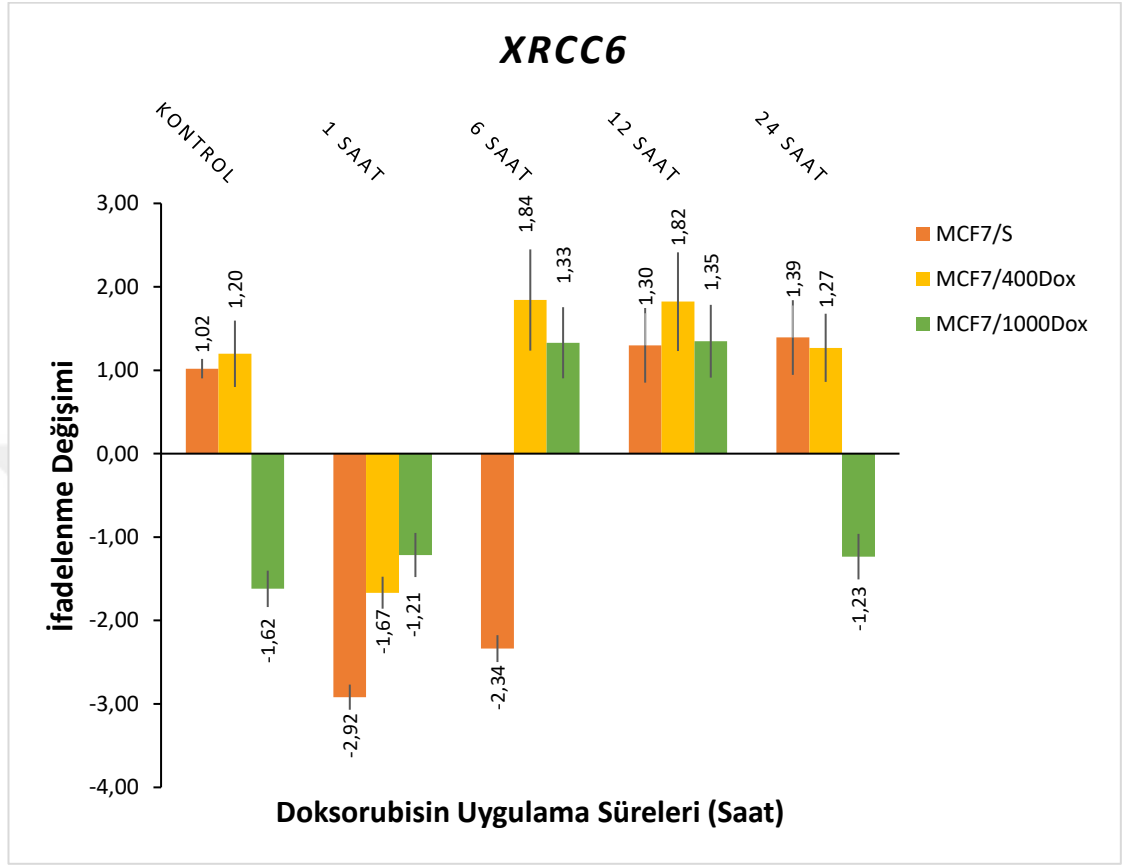
MCF7/S hücre hattındaki *XRCC5* ifadenmesinde doksorubisin uygulamasının 1. saatinde 8,47 kat azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Öte yandan 6, 12, ve 24 saat doksorubisin uygulamasına bağlı sırasıyla 2,86 kat, 6,81 kat ve 8,76 kat ifadenme artışı saptanmıştır ($p<0,05$).

MCF7/400Dox hücre hattında doksorubisin uygulamasının 1. saatinden 12. saatine kadar *XRCC5* ifadenmesinde artış saptanmıştır. Doksorubisin uygulamasının ilk saatine göre 6. saatte 3,45 kat ve 12. saatinde ise 5,88 katlık artış belirlenmiştir. Uygulamanın 24. saatinde *XRCC5* geninin hücre içindeki ifadenme düzeyinin 12. saate göre 3,51 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

MCF7/1000Dox hücre hattındaki *XRCC5* ifadenmesi 1. saatten 12. saate kadar artış gösterirken 24. saatte azalma göstermiştir. Doksorubisin uygulamasından sonra 1. saatte kontrol grubuna göre 3,26 kat; 6. saatte, 3,30 kat ve 12. saatte 6,57 katlık ifadenme artışı belirlenmiştir ($p<0,05$). İlaç uygulamasının 24. saatinde *XRCC5* ifadenmesinde 12. saate göre 2,3 kat bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$).

XRCC6 genine ait sonuçlar ve istatistik analizi sırası ile Şekil 18 ve Tablo 19'de gösterilmiştir. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi tek yönlü ANOVA

testi ile yapılmıştır. Tukey post hoc testi ile $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde birbirinden farklı olan gruplar belirlenmiştir.



Şekil 18: XRCC6 gen ifadenme analizleri.

Tablo 19: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre XRCC6 geni ifadenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

		XRCC6														
		S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
S-K																
S-1S		p<0,05														
S-6S			p<0,05													
S-12S				p<0,05												
S-24S					p<0,05											
400-K						p<0,05										
400-1S							p<0,05									
400-6S								p<0,05								
400-12S									p<0,05							
400-24S										p<0,05						
1000-K											p<0,05					
1000-1S												p<0,05				
1000-6S													p<0,05			
1000-12S														p<0,05		
1000-24S															p<0,05	

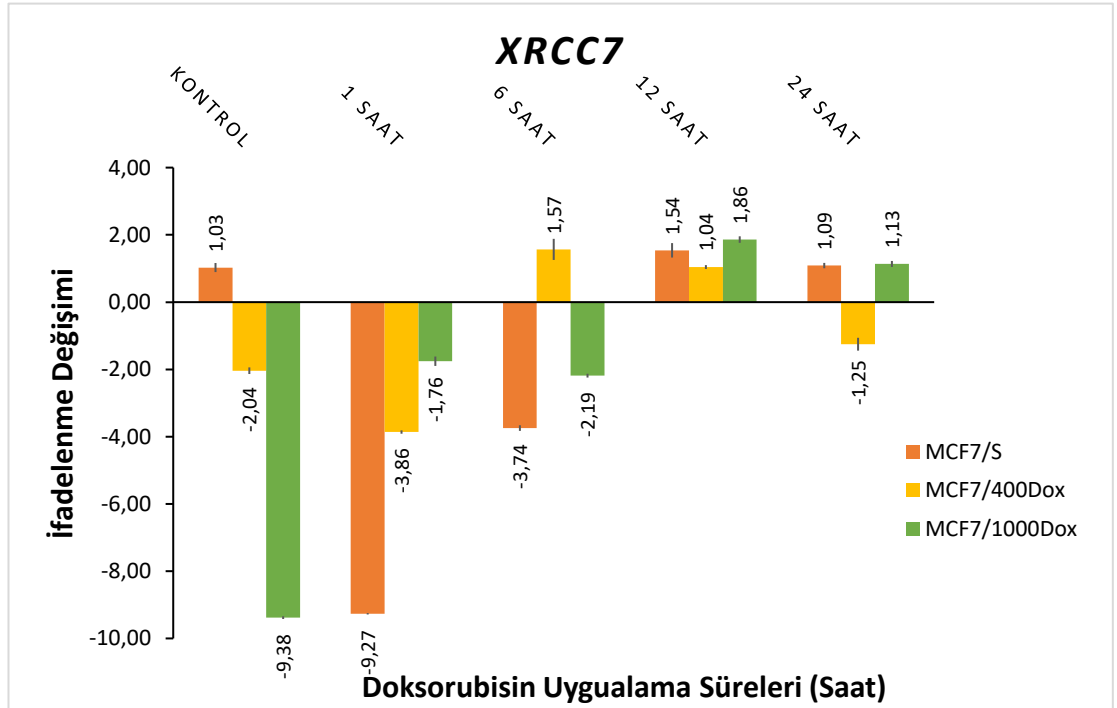
Duyarlı ve dirençli hücre hatları kontrol grupları arasında XRCC6 geninin ifadenme düzeyinde anlamlı bir istatistik fark bulunmadığı saptanmıştır. MCF7/S

hücre hattında 4µM doksorubisin uygulamasının 1. saatinde *XRCC6* geninin ifadenlenmesinde 3,94 katlık bir düşüş belirlenmiştir. 1. ve 24. uygulama saatleri arasında *XRCC6* geninin ifadenlenmesinde zamana bağlı artış saptanmıştır ($p<0,05$). Doksorubisin uygulamasından sonra 6. ve 24. saatlerdeki *XRCC6* düzeylerinde 1. saate göre sırasıyla 0,58 ve 4,31 kat artış belirlenmiştir ($p<0,05$).

MCF7/400Dox hücre hattındaki *XRCC6* ifadenleme düzeyinde doksorubisin uygulamasının 1. saatinde 2,87 katlık bir düşüş saptanmıştır ($p<0,05$). 6, 12 ve 24 saat doksorubisin uygulanan hücrelerdeki *XRCC6* ifadenlenmesinin 1 saatlik uygulamaya göre sırasıyla 3,31 kat, 3,29 kat ve 2,9 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

MCF7/1000Dox hücre hattında doksorubisin uygulaması sonrasında 6 ve 12. saatlerdeki *XRCC6* geni ifadenlenmesinin kontrol grubuna göre 2,95 ve 2,97 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

XRCC7 genine ait sonuçlar ve istatistik analizi sırası ile Şekil 19 ve Tablo 20’de verilmektedir. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi tek yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır. Tukey post hoc testi ile $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde birbirinden farklı olan gruplar belirlenmiştir.



Şekil 19: *XRCC7* gen ifadenleme analizleri.

Tablo 20: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre *XRCC7* geni ifadenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

XRCC7															
	S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
S-K															
S-1S		p<0,05	p<0,05												
S-6S				p<0,05	p<0,05	p<0,05							p<0,05	p<0,05	p<0,05
S-12S							p<0,05	p<0,05						p<0,05	p<0,05
S-24S															
400-K															
400-1S															
400-6S															
400-12S															
400-24S															
1000-K															
1000-1S															
1000-6S															
1000-12S															
1000-24S															

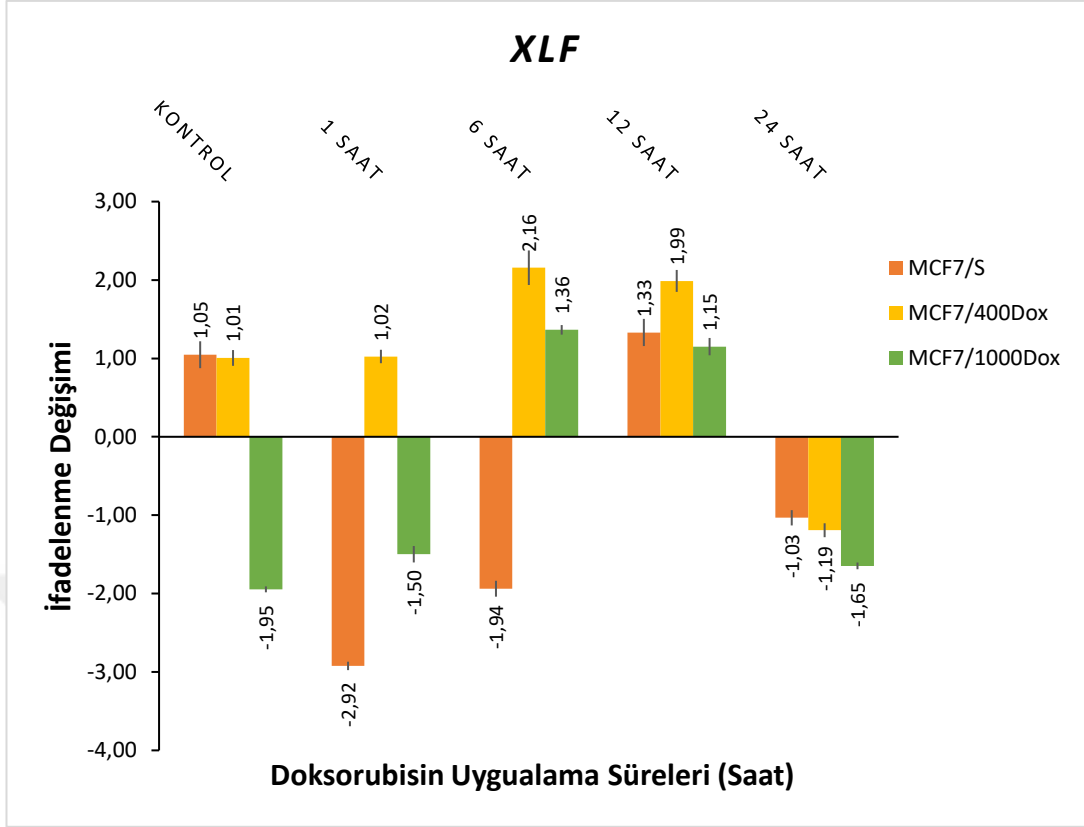
XRCC7 geninin ifadenme analizlerinde, MCF7/S hücre hattındaki *XRCC7* ifadenmesinin MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarına göre sırasıyla 3,07 ve 10,41 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

MCF7/S hücre hattında 4µM doksorubisin uygulamasının ardından *XRCC7* ifadenmesinde 1. saatte 10,3 katlık bir düşüş belirlenmiştir (p<0,05). Doksorubisin uygulamasının 6. saatinde uygulamanın ilk saatine göre 5,53 katlık bir artış saptanmıştır (p<0,05). Doksorubisin uygulamasının 6. ve 12. saatleri arasındaki *XRCC7* ifadenme değişiminin 5,28 kat olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

MCF7/400Dox hücre hattındaki *XRCC7* ifadenme düzeyinde doksorubisin uygulamasının 6. saatinde istatistiksel olarak anlamlı olan 3,61 katlık bir artış saptanmıştır (p<0,05). Doksorubisin uygulamasının 6. ve 12. saatlerindeki *XRCC7* ifadenmesi uygulamanın ilk saatine göre sırasıyla 5,43 ve 4,9 kat daha fazladır (p<0,05).

MCF7/1000Dox hücre hattında doksorubisin uygulaması sonrasında 1, 6, 12 ve 24. saatlerdeki *XRCC7* ifadenmesinin kontrol grubuna göre sırasıyla 7,62 kat; 7,19 kat; 11,13 kat ve 10,51 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

XLf genine ait sonuçlar ve istatistik analizi sırası ile Şekil 20 ve Tablo 21’de verilmektedir. Deney sonuçlarının istatistik değerlendirmesi Student T-test ile yapılmış ve 0,05’ten küçük anlamlılık değerine sahip olan sonuçların arasındaki fark anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 20: *XLF* gen ifadenme analizleri.

Tablo 21: Hücre hatlarına 4 μ M doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre *XLF* geni ifadenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

		XLF												
	S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
S-K		p<0,05	p<0,05							p<0,05				p<0,05
S-1S				p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
S-6S					p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	
S-12S						p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05
S-24S							p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05		p<0,05
400-K								p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05		p<0,05
400-1S									p<0,05	p<0,05		p<0,05		p<0,05
400-6S										p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-12S											p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-24S												p<0,05	p<0,05	p<0,05
1000-K													p<0,05	p<0,05
1000-1S														p<0,05
1000-6S														
1000-12S														p<0,05
1000-24S														p<0,05

Yapılan analizlerde, MCF7/S hücre hattında *XLF* geninin MCF7/1000Dox hücre hattına göre 3 kat daha fazla ifadelenmiş olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). MCF7/S hücre hattı ile MCF7/400Dox hücre hattı arasında *XLF* ifadenme düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Bununla birlikte, MCF7/400Dox hücre

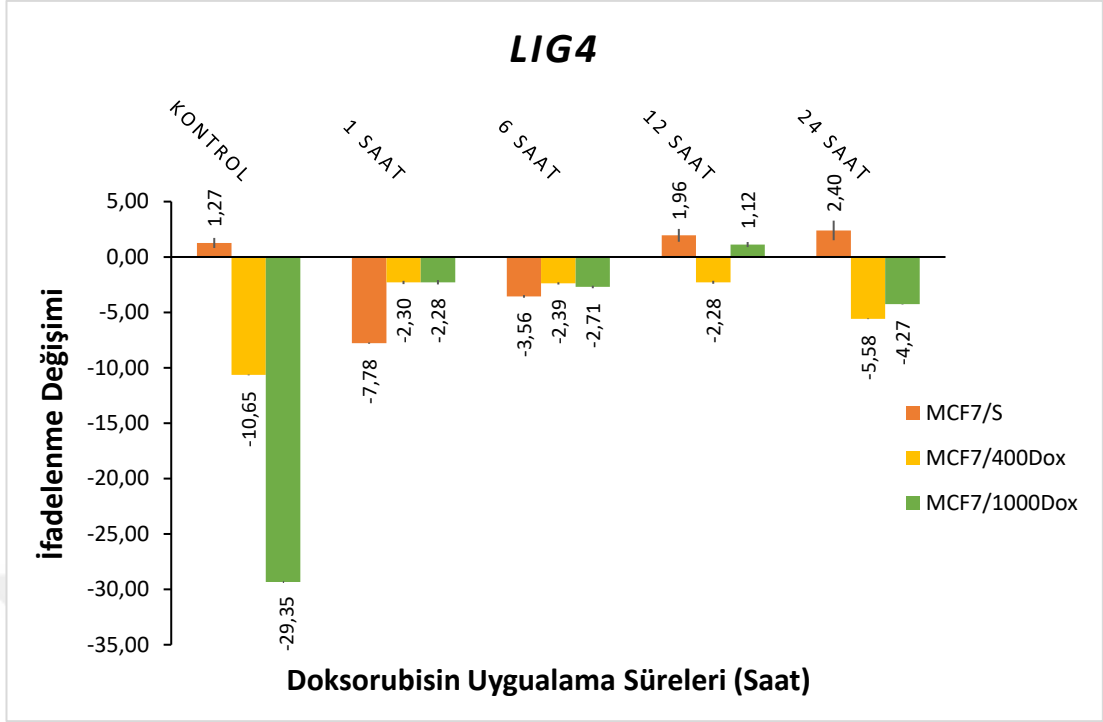
hattındaki *XLF* geni ifadenme düzeyinin MCF7/1000Dox hücre hattına göre 2,96 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

MCF7/S hücre hattındaki *XLF* geni ifadenmesinin ilaç uygulamasının 1. ve 6. saatlerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 3,97 ve 2,99 kat daha az olduğu belirlenmiştir. Doksorubisin uygulamasının 1. ve 12. saatleri arasında *XLF* ifadenmesinin sürekli artarak 6. saatte 0,98 kat ve 12. saatte 4,25 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

MCF7/400Dox hücre hattında doksorubisin uygulamasının 6. ve 12. saatlerinde kontrol grubuna göre *XLF* ifadenmesinin sırasıyla 1,15 ve 0,98 kat arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte doksorubisin uygulamasının 12. ve 24. saatleri arasında *XLF* ifadenmesinin 3,18 kat azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

İlaç uygulamasından 6 ve 12 saat sonra MCF7/1000Dox hücre hattındaki *XLF* ifadenmesinin kontrol grubuna göre sırasıyla 3,31 ve 3,1 kat fazla olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Bununla birlikte, ilaç uygulamasının 24. saatinde *XLF* ifadenmesinin 12. saate göre 2,8 kat azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

LIG4 genine ait sonuçlar ve istatistik analizi sırası ile Şekil 21 ve Tablo 22’te gösterilmiştir. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi tek yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır. Tukey post hoc testi ile $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde birbirinden farklı olan gruplar belirlenmiştir.



Şekil 21: *LIG4* gen ifadenme analizleri.

Tablo 22: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre *LIG4* geni ifadenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

LIG4															
	S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
S-K		p<0,05				p<0,05					p<0,05				
S-1S			p<0,05	p<0,05	p<0,05									p<0,05	
S-6S				p<0,05	p<0,05										p<0,05
S-12S					p<0,05					p<0,05	p<0,05				p<0,05
S-24S						p<0,05				p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05
400-K															p<0,05
400-1S									p<0,05					p<0,05	p<0,05
400-6S											p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-12S														p<0,05	
400-24S															p<0,05
1000-K															p<0,05
1000-1S														p<0,05	p<0,05
1000-6S														p<0,05	p<0,05
1000-12S															p<0,05
1000-24S															

Duyarlı ve dirençli hücre hatlarında yapılan analizlerde, *LIG4* ifadenmesinin MCF7/S hücre hattında dirençli hücelere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarındaki *LIG4* ifadenmesinin MCF7/S hücre hattına göre sırasıyla 10,82 ve 30,62 kat daha az olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

MCF7/S hücrelerine doksorubisin uygulamasının ilk saatinde *LIG4* ifadenmesi 9,15 kat azalmıştır ($p<0,05$). Uygulamanın 12. ve 24. saatinde *LIG4*

ifadelenmesinin 1. saate göre sırasıyla 9,74 kat ve 10,18 kat daha az olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

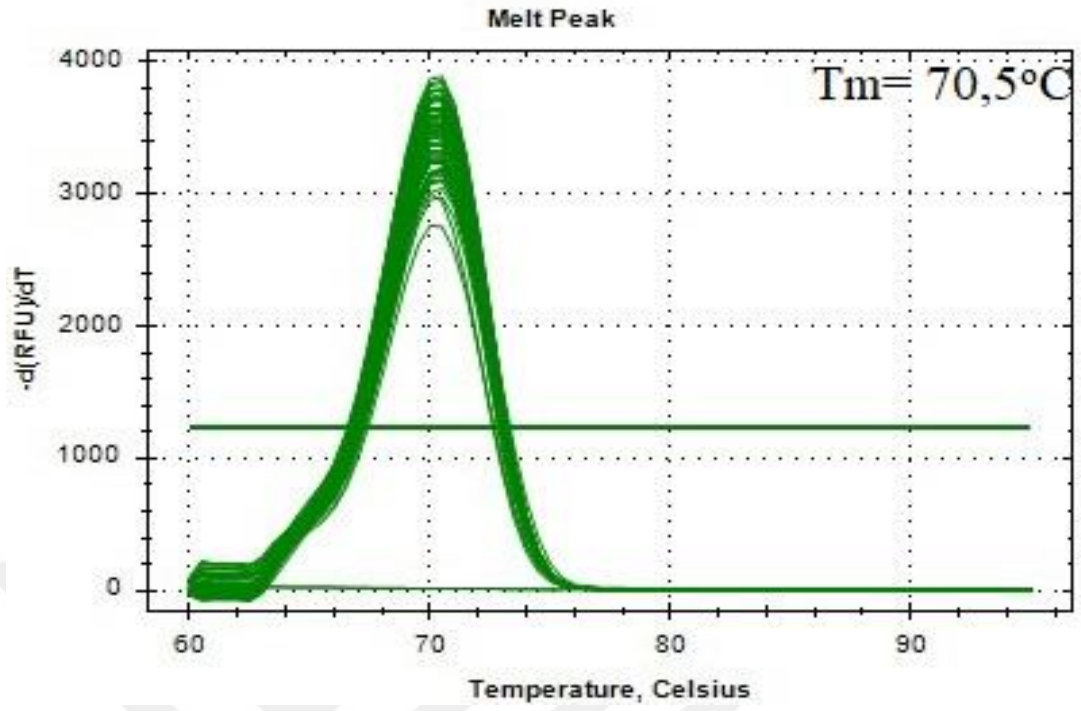
MCF7/400Dox hücre hattında doksorubisin uygulamasının *LIG4* ifadelenmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. MCF7/1000Dox hücre hattında 1, 6, 12 ve 24 saat doksorubisin uygulamasının yapıldığı deney gruplarında *LIG4* ifadelenmesinin kontrol grubuna göre sırasıyla 27,07 kat, 26,65 kat, 30,47 kat ve 25,08 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

4.5) miRNA ifadelenme Analizleri

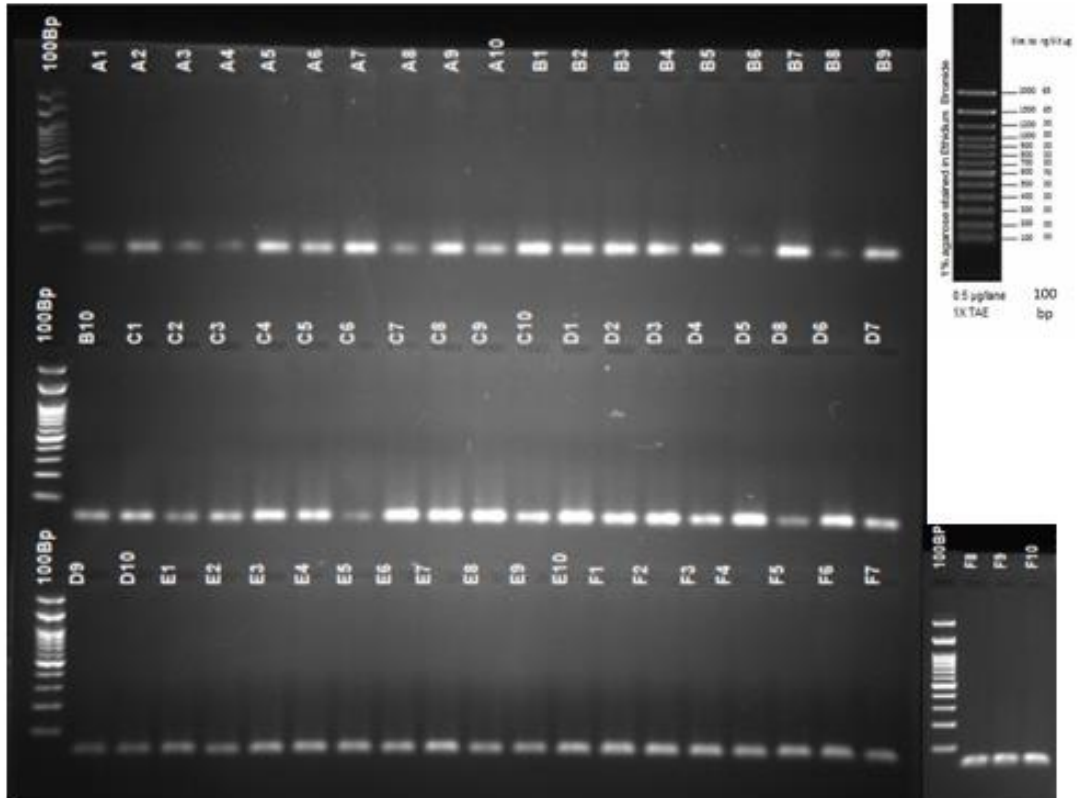
MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarına 1, 6, 12 ve 24 saat sürelerle 4 μ M doksorubisin uygulanmış, hücrelerden MiRNeasy ile RNA izole edilmiş ve cDNA sentezlenmiştir. cDNA'lar hsp-miR-101-3p, hsp-miR-502-3p ve β -aktin ifadelenme analizleri için kalıp olarak kullanılmıştır. Hsp-miR-101-3p ve hsp-miR-502-3p'nin amplifikasyon verileri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile değerlendirilmiştir (203). Deney sonuçlarının istatistik değerlendirmesi Student T-Test ile yapılmış ve 0,05'ten küçük anlamlılık değerine sahip olan ($p<0,05$) sonuçların arasındaki fark anlamlı olarak kabul edilmiştir.

miRNA ifadelenme analizlerinde referans gen olarak β -aktin geni kullanılmıştır. Erime eğrisi analizleri ile β -aktin genine ait PCR ürünün özgül olarak çoğaldığı doğrulanmıştır.

Hsp-miR-101'e ait erime eğrisi grafiği ve agaroz jel elektroforezi görüntüleri sırası ile Şekil 22 ve Şekil 23'te verilmektedir. Erime eğrisi analizleri ve agaroz jel elektroforezi ile Hsp-miR-101-3p'ye ait PCR ürünün özgül olarak çoğaldığı doğrulanmıştır.

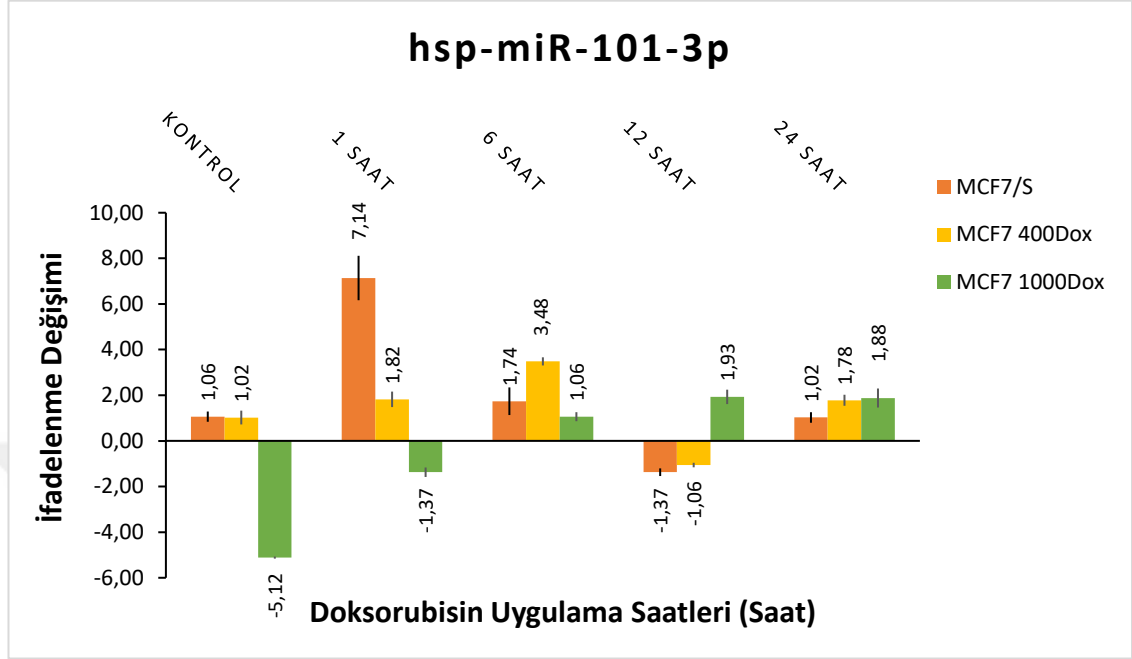


Şekil 22: Hsp-miR-101 için erime eğrisi analizleri.



Şekil 23: Hsp-miR-101 PZR amplifikasyonlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri ve 100bp DNA markır

Hsp-miR-101'e ait sonuçlar ve istatistik analizi sırası ile Şekil 24 ve Tablo 23'te verilmektedir.



Şekil 24: Hsp-miR-101'in ifadenme değişimi grafiği.

Tablo 23: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre Hsp-miR-101-3p ifadenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

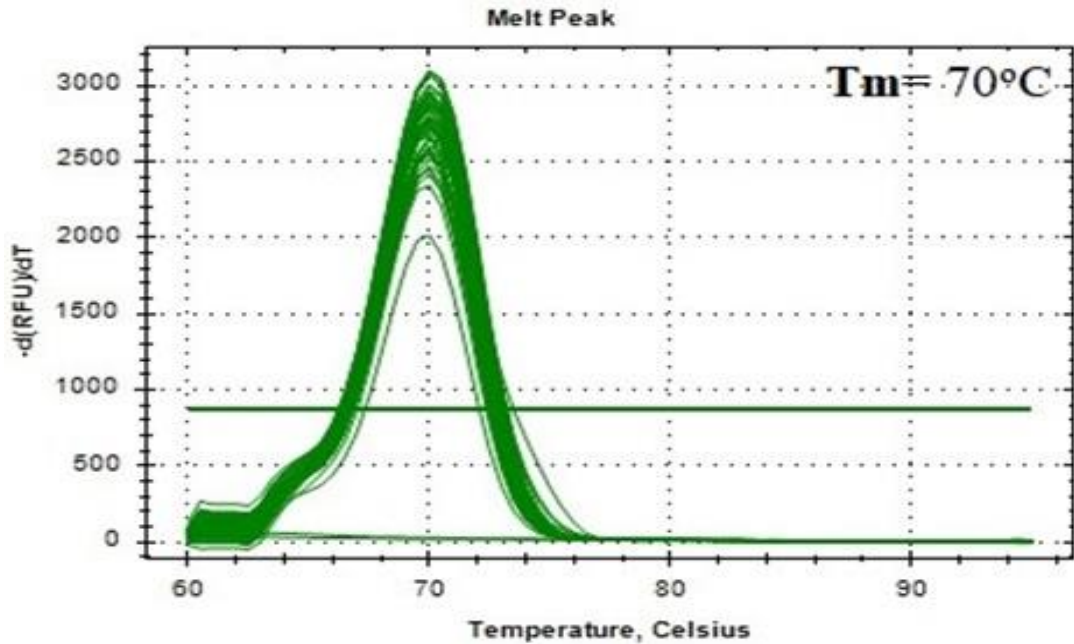
		Hsp-miR-101													
	S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
S-K		p<0,05		p<0,05							p<0,05				
S-1S			p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
S-6S				p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
S-12S					p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
S-24S						p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-K							p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-1S								p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-6S									p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-12S										p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
400-24S											p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
1000-K												p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
1000-1S													p<0,05	p<0,05	p<0,05
1000-6S														p<0,05	p<0,05
1000-12S															p<0,05
1000-24S															

Analiz sonuçlarına göre, MCF7/S ve MCF7/400Dox hücre hatlarında Hsp-miR-101-3p ifadenme düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. MCF7/1000Dox hücre hattındaki hsp-miR-101-3p ifadenmesinin MCF7/S hücre hattına göre 6,18 kat daha az olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

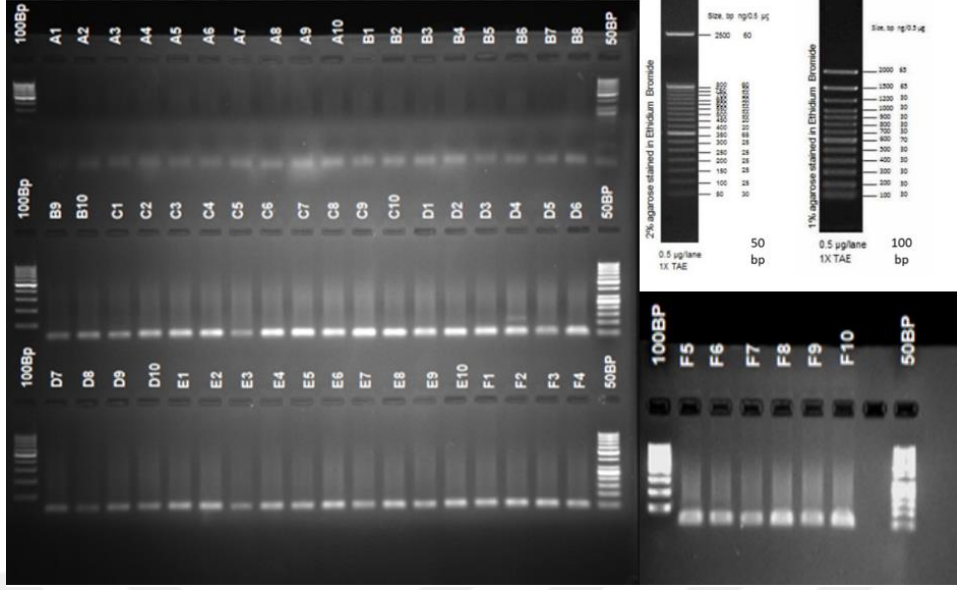
Doksorubisin uygulamasının 1. saatinde hsp-miR-101-3p ifadenmesinin MCF7/S hücre hattında kontrol grubuna göre 6,08 kat arttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu hücre hattında, 6, 12 ve 24 saat doksorubisin uygulanmış gruplardaki hsp-miR-101-3p ifadenmesinin doksorubisin uygulamasının ilk saatine göre sırasıyla 5,4 kat; 8,51 kat ve 6,12 kat daha az olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). MCF7/400Dox hücre hattında doksorubisin uygulama süreleri arasında hsp-miR-101-3p ifadenme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

MCF7/1000Dox hücre hattında ilaç uygulamasının başlangıcından 12. saatine kadar hsp-miR-101-3p'nin ifadenmesinde artış belirlenmiştir. Doksorubisin uygulamasının 6. ve 12. saatlerinde hsp-miR-101-3p ifadenmesi kontrol grubuna göre sırasıyla 6,18 kat ve 7,15 kat artmıştır ($p<0,05$).

Hsp-miR-502'ye ait erime eğrisi grafiği ve agaroz jel elektroforezi görüntüleri sırası ile Şekil 25 ve Şekil 26'da verilmektedir. Erime eğrisi analizleri ve agaroz jel elektroforezi ile Hsp-miR-502-3p'ye ait PCR ürünün özgül olarak çoğaldığı doğrulanmıştır.

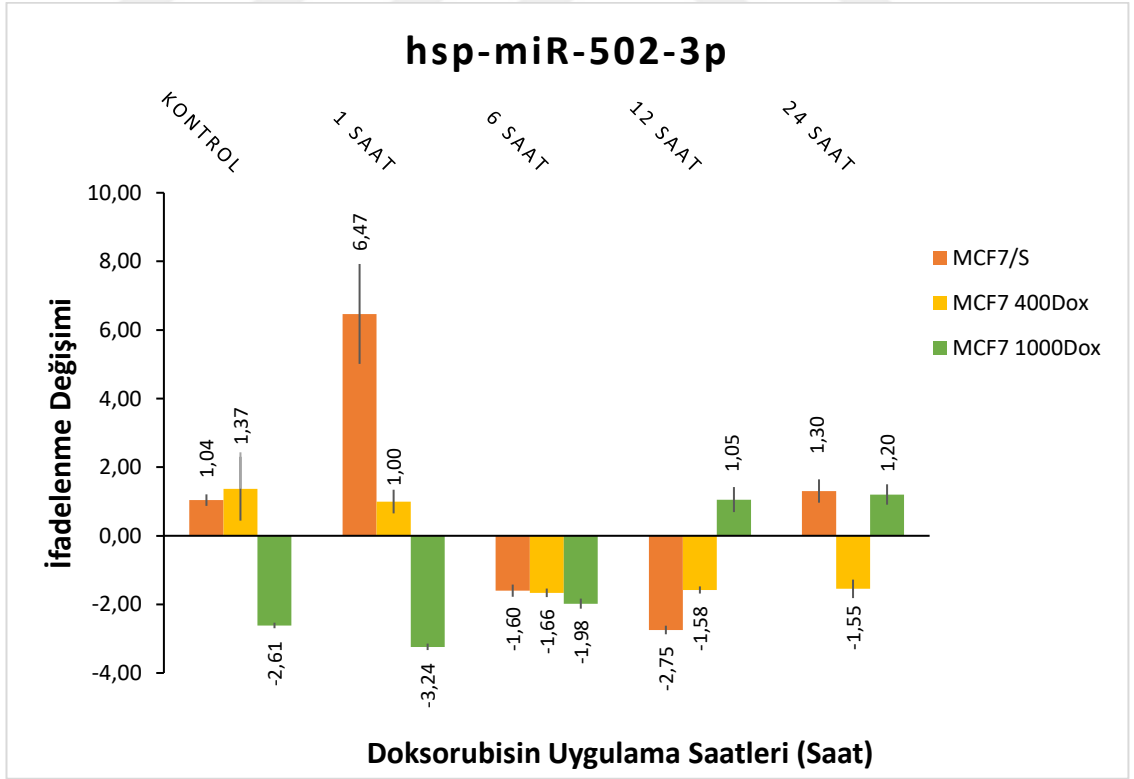


Şekil 25: Hsp-miR-502-3p erime eğrisi grafiği.



Şekil 26: Hsp-miR-502-3p PZR amplifikasyonlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri, 50bp ve 100bp markır

Hsp-miR-502'ye ait sonuçlar ve istatistik analizi sırası ile Şekil 27 ve Tablo 24'te verilmektedir.



Şekil 27: Hsp-miR-502-3p ifadenleme değişimi.

Tablo 24: Hücre hatlarına 4µM doksorubisin uygulamasından sonra saatlerine göre Hsp-miR-502-3p ifadenme analizlerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

Hsp-miR-502														
S-K	S-1S	S-6S	S-12S	S-24S	400-K	400-1S	400-6S	400-12S	400-24S	1000-K	1000-1S	1000-6S	1000-12S	1000-24S
S-K	p<0,05		p<0,05							p<0,05	p<0,05			
S-1S		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
S-6S														
S-12S				p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05			p<0,05	p<0,05	p<0,05
S-24S								p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05	p<0,05	
400-K														
400-1S														
400-6S										p<0,05				
400-12S										p<0,05	p<0,05	p<0,05		
400-24S										p<0,05				
1000-K													p<0,05	p<0,05
1000-1S													p<0,05	p<0,05
1000-6S														
1000-12S														
1000-24S														

Hsp-miR-502-3p ifadenme analizlerinde, MCF7/S hücrelerindeki ifadenme analizinin MCF7/1000Dox hücrelerine göre göre 3,65 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (p<0,05). MCF7/S hücre hattında, doksorubisin uygulamasının 1. saatinde Hsp-miR-502-3p ifadenmesinin kontrol grubuna göre 6,43 kat arttığı belirlenmiştir (p<0,05). Bu hücrelerde, 6, 12 ve 24 saat doksorubisin uygulanmış deney gruplarındaki hsp-miR-502-3p ifadenmesinin uygulamanın ilk saatinde göre sırasıyla 4,87 kat; 3,72 kat ve 6,12 kat daha az olduğu saptanmıştır (p<0,05). MCF7/400Dox hücre hattında, doksorubisin uygulama süreleri arasında hsp-miR-502-3p ifadenme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

MCF7/1000Dox hücre hattında, doksorubisin uygulaması ile hsp-miR-101-3p'de ifadenmesinde 24. saate kadar zamana bağlı artış olduğu belirlenmiştir. Doksorubisin uygulamasının 6., 12. ve 24. saatlerinde hsp-miR-502-3p ifadenmesinin kontrol grubuna göre sırasıyla 0,63 kat, 3,66 kat ve 3,81 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (p<0,05).

5) TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, doksorubisine karşı dirençlilik gösteren MCF7 meme kanseri alt hücre hatlarında NHEJ yolağının, gelişen ilaç direncindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, hem yolaktaki genlerin dirençli ve duyarlı hücrelerde DNA hasarı indüklenmesi ile zamana bağlı ifadelenmesi hem de yolağı kontrol eden miRNA'ların bu hücrelerdeki ifadelenmesinin çalışılması hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasına konu olan 400 nM (MCF7/400Dox) ve 1000 nM (MCF7/1000Dox) doksorubisine dirençli MCF7 hücre hatları *in vitro* koşullarda artan doksorubisin uygulanması ile heterojen hücre grupları arasından doksorubisine direnç gösteren hücrelerin kademeli olarak seçilimiyle elde edilmiştir (13). Alt hücre hatlarının dirençlilik endeksleri sitotoksosite analizi ile elde edilen inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerlerinin parental hücre hatlarından elde edilen değerlere bölünmesiyle hesaplanır. Dirençlilik endeksinin 1'den büyük olması alt hücre hatlarının seçilen ilaca dirençli olması anlamına gelir. Seçilen MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında dirençlilik endeksi sırasıyla 107 ve 160'dır. Önceki çalışmalar, tümör hücrelerinin seçici ilaca dirençlilik geliştirmesinin kademeli olarak gerçekleştiğini (1) ve farklı dirençlilik endeksine sahip alt hücre hatlarındaki etkin dirençlilik mekanizmalarının farklı olduğunu göstermiştir (2). Örneğin, farklı dirençlilik endekslerine sahip dosetaksele dirençli alt hücre hatlarının (MCF-7/30nM Doc ve MCF-7/120nM Doc) tüm gen ifadelenme analizleri, P-gp pompa ifadelenmesinin az olduğu 30nM dosetaksele dirençli hücrelerde anti-apoptotik yolakların, 120 dosetaksele dirençli hücrelerde ise P-gp bağlı ilaç atımının ve epitel-mezenkimal geçişin etkin dirençlilik mekanizması olduğunu göstermiştir. Dönmez ve Gündüz tarafından 2011'de yapılan bir başka çalışmada MCF-7/1000Dox hücrelerinde siRNA ile *MDR1* geninin ifadelenmesi %80-90 oranında azaltılmış ve buna bağlı olarak hücre içi ilaç birikimi duyarlı hücrelere yakın düzeylere çıkarılmıştır (181). Ancak, siRNA uygulamasının ardından bu hücrelerin dirençlilik endeksinin 31 olduğu yani parental hücrelere göre doksorubisine hala 31 kat daha dirençli oldukları saptanmıştır. Sonuç olarak, çoklu ilaç dirençliliği fenotipine sahip hücrelerde sitotoksik etkinin bertaraf edilmesi zaman içerisinde kademeli olarak kazanılan ve birden fazla yolak üzerinden gelişen ve hücrelerde global fenotipik değişikliklerin olduğu bir durumdur. Bu nedenle, bu tez çalışmasında daha önceki çalışmalarda

kademeli direnç gelişimi ile ilişkilendirilmemiş NHEJ tamir yolağı çalışılmıştır. Bir topoizeomeras II baskılayıcısı olan doksorubisin, hücrelerde farklı yollarla DNA tek ve çift iplik kırıklarına neden olmaktadır. Bu nedenle, doksorubisine farklı düzeylerde dirençlilik gösteren MCF7 hücre hatlarındaki ilaç direncinin NHEJ tamir yolağı ile ilişkilendirebileceği düşünülmüştür.

Çalışmada, hem duyarlı hem de dirençli hücre hatlarına doksorubisin uygulanarak NHEJ yolağının etkin onarım yolağı olarak tercih edildiği ilk 24 saatlik sürede tüm parametreler çalışılmıştır. Bu sürede 1, 6, 12 ve 24. saatler analiz parametreleri açısından değerlendirmeye alınmış ve örneklemeler yapılmıştır. Zaman aralıkları belirlenirken NHEJ yolağı ile ilgili çalışmalar, doksorubisin etki mekanizması ve dirençli hücrelerde ilaç akümülyasyon süreleri daha önceki çalışmalar dikkate alınarak belirlenmiştir. Doksorubisin uygulama konsantrasyonu duyarlı ve dirençli hücrelerdeki ilaç akümülyasyonu ve bölünme sürelerine bağlı farklı etkiler dikkate alınarak belirlenmiştir. Nitekim, uygulanan konsantrasyonun duyarlı hücrelerde uygulama sürelerinde hücrelerin tamamının ölümüne neden olmaması, ancak, dirençli hücrelerde doksorubisinin hücre içine alınarak genotoksik etkinin görülmesi gerekmektedir. Dönmez ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada MCF/S ve MCF/1000Dox hücrelerine 4 µM doksorubisin uygulaması sonucunda her iki hücre grubunda da ilaç akümülyasyonu ve ifadelenme değerlendirmeleri açısından analiz edilebilir sitotoksik etki indüklenmiştir (182). Ancak, bu çalışmada 1 saat sonra hücre içi doksorubisin akümülyasyonunun duyarlı hücrelerde dirençli hücrelere göre 6 kat fazla olduğu konfokal mikroskopi ile gösterilmiş olup tez çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde bu durum da göz önünde bulundurulmuştur. Dört µM doksorubisinin bu hücrelerdeki zamana bağlı sitotoksik etkisi MTT hücre proliferasyon çalışması ile değerlendirilmiştir. Hücre proliferasyon çalışmaları sonucunda, 1, 6, 12 ve 24 saatlik doksorubisin uygulamalarına bağlı MCF7/S, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarının proliferasyon değişimleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Doksorubisinin duyarlı hücrelerde zamana bağlı artan sitotoksik etki gösterdiği, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücrelerinde ise ilk 24 saat içerisinde zamana bağlı sitotoksik etkinin duyarlı hücrelere göre daha az olduğu belirlenmiştir (Şekil 10). Her ne kadar hücre proliferasyonunda azalma olsa da doksorubisinin sitotoksik etkisinin 24 saat sonra görüldüğü sonucuna varılmaktadır. Nitekim, bu hücrelerle yapılan daha önceki çalışmada MCF7/S

hücrelerinin bölünme süresinin (t_d) 27,9 saat olduğu, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücrelerinde ise bu zamanın sırasıyla 49,7 ve 51, 5 saate çıktığı rapor edilmiştir (13). MTT analizleri, doksorubisin uygulamasına bağlı hücre proliferasyonlarındaki değişimler hakkında bilgi vermekle birlikte hücrelerde zamana bağlı meydana gelen genotoksik hasar alkali tek hücre elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Doksorubisinin etki mekanizması dikkate alındığında, hücre bölünmesinin durması ve/veya apoptotik ve nekrotik süreçlerin başlaması için hücre döngüsünün tamamlanması gerekmektedir. Ancak, önceki çalışmalar NHEJ yolağı ile DNA onarımının DNA hasarı oluşumundan itibaren yaklaşık 30 dakika içerisinde gerçekleştiğini göstermektedir (183). Farhane ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış oldukları bir çalışmada doksorubisin uygulamasından sonra ilacın ilk 6 saatlik süreçte hücre çekirdeği içerisinde birikip en yüksek konsantrasyona ulaştığı ve 12. saate çekirdek etrafına yayılmaya başladığı gösterilmiştir (184). Aynı çalışmada doksorubisinin 0-12 saat aralığında DNA ile etkileşime girdiği ve DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir. de Campos-Nebel ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, insan ve hamster hücrelerine etopozit uygulaması sonrasında oluşan çift iplikli DNA kırıklarının 2. saate en yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir (185). Meme kanseri hücre hatlarıyla yapılan bir başka çalışmada ise, etopozit uygulamasına bağlı oluşan DNA çift iplikli kırıklarının 24. saate uygulama öncesi düzeyine döndüğü gösterilmiştir (185, 186). Nitekim, alkali tek hücre elektroforezi sonuçlarına göre (Şekil 13), önceki çalışmalarla uyumlu olarak, MCF7/400Dox hücre hattında, 6. saate kadar genotoksik hasar artmış, 6. saatten itibaren DNA hasarında düşüş belirlenmiştir. MCF7/1000Dox hücrelerinde ise 12. saate kadar doksorubisine bağlı oluşan genotoksik hasarda artış olurken, 12. saatten itibaren DNA hasarında düşüş meydana gelmiştir. Doksorubisine duyarlı hücrelerde ise 24 saatlik doksorubisin uygulaması zamana bağlı ve doğru orantılı genotoksik hasara neden olmuştur. Bununla birlikte, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında 24 saatlik uygulamanın sonunda duyarlı hücrelere göre daha düşük genotoksik hasar meydana gelmiştir.

Doksorubisin uygulaması sonrasında 53BP1 proteininin immünofloresan olarak boyanmasıyla NHEJ ile gerçekleşen DNA çift iplikli kırıklarının onarımı analiz edilmiştir (Şekil 15). 53BP1 immünofloresan boyama analizlerinde MCF7/S hücre hattında doksorubisin uygulamasının ilk saatinde çift iplikli kırık onarımı başlarken, MCF7/1000Dox hücre hattında 12. saate NHEJ mekanizması ile çift iplikli DNA

kırıklarının onarımı başlamıştır (Şekil 15). Bu bilgiler ışığında, MCF7/S hücre hattında DNA çift iplikli kırıklarının onarımında NHEJ mekanizmasının onarımdaki rolünün daha düşük olabileceği sonucuna varılmaktadır. Öte yandan, MCF7/1000Dox hücre hattında 12. saatte meydana gelen DNA hasarındaki azalmanın, 12. saatte NHEJ mekanizmasıyla DNA çift iplikli kırıklarının onarımının başlamış olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte, MCF7/1000Dox hücre hattında doksorubisin uygulamasının 12. saatinde *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XRCC7*, *XLF* ve *LIG4* genlerinin ifadenmesinde anlamlı artış meydana gelmiştir (Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18, Şekil 19, Şekil 20, Şekil 21). Bu bilgiler ışığında, MCF7/1000Dox hücre hattında doksorubisin uygulamasının 12. saatinde NHEJ onarım mekanizmasının aktivitesi nedeniyle DNA hasarının azaldığı söylenebilir. Öte yandan, 53BP1 immünofloresan boyama analizinde MCF7/400Dox hücre hattında doksorubisin uygulaması ile NHEJ mekanizması etkinliğinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark meydana gelmemiştir. Bu durum, MCF7/400Dox hücre hattında doksorubisin uygulamasının 6 ile 24 saatleri arasında genotoksik hasardaki azalmanın NHEJ mekanizmasından bağımsız onarım yolları tarafından gerçekleştirildiğini düşündürmektedir.

İfadenme analizleri yapılan genlerden *XRCC6* dışında tüm genler için, MCF7/S hücre hattı en yüksek ifadenme düzeyine sahipken MCF7/1000Dox hücre hattı bu genleri en az ifadelendiren hücre hattıdır. Bu durum, MCF7/1000Dox hücre hattında doksorubisin aktif pompalar ile hücre dışına atılması ve ilacın hücre içi akümülyasyonunun düşük olması ile ilişkilendirilebilir. MCF7/1000Dox hücre hattında *MDR1* geni kontrol grubuna göre yaklaşık 270 kat daha fazla ifadenmektedir (13). *MDR1* geninin kodladığı P-glikoprotein (P-gp), ABC taşıyıcı protein ailesine üyedir. Bu protein, doksorubisin de dahil olmak üzere pek çok kemoterapötik ajanın hücre dışına pompalanmasını sağlamaktadır. Nitekim MCF7/1000Dox hücre hattında *MDR1* gen ifadenmesine ek olarak, P-gp pompaları aktivite düzeyinde de tespit edilmiştir (1). P-gp, MCF7/1000Dox hücre hattında geliştirilen çoklu ilaç direncinin en önemli mekanizmalarından bir tanesidir. MCF7/1000Dox hücre hattında yüksek düzeyde ifadelenen P-gp proteini, DNA çift iplik kırıklarına neden olan doksorubisini hücrelerden uzaklaştırmaktadır. Bu durum, daha az DNA hasarının oluşmasına neden olmaktadır. MCF7/1000Dox hücre hattında NHEJ onarım yolağındaki genlerinin diğer hücre hatlarına göre daha az ifadenmesi, bu hücrelerde P-gp proteinine bağlı olarak hücre içi doksorubisin konsantrasyonunun daha az olması ile ilişkilendirilebilir.

İfadeleme analizleri, MCF7/S hücre hattında hsp-miR-101-3p miRNA ifadenme değişikliklerinin *XRCC7* ifadenmesiyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Şekil 19 ve Şekil 24). Bununla birlikte, dirençli MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında miR-101'in NHEJ yolağı üzerindeki regülasyon etkisini kaybetmiş olabileceği düşünölmektedir. "miRNA Data Base" (miRDB) verilerinde daha önceki çalışmalarda, miR-101'in ifadenmesindeki artışın nükleer miRNA taşıyıcısı olan exportin-5 proteininin ifadenmesini baskıladığı ve bu nedenle negatif geribildirim ile etkinliğinin azalabileceği belirtilmiştir. Hsp-miR-502-3p ifadenmesinin MCF7/S hücre hattındaki *XRCC5*, *XLF* ve *LIG4* ifadenme değişimleriyle ilişkili olduğu belirlenirken, doksorubisin dirençli hücre hatlarında böyle bir korelasyon belirlenememiştir. Ancak, dirençli hücrelerde miR-101 ve miR-502 regülasyonunun daha iyi anlaşılabilmesi için ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Daha önce MCF7/1000Dox hücre hattında yapılmış olan mikrodizin çalışmalarında (13), NHEJ mekanizmasıyla ilişkili olan *53BP2*, *p21* ve *Chk1* genlerinde sırasıyla 3,1 kat; -0,3 kat; ve 4,1 katlık değişimler olduğu ($p < 0,05$) saptanmıştır. 53BP2 proteini çift iplikli DNA hasarı durumunda p53 proteinine bağlanıp p53'ün DNA'ya bağlanmasını teşvik eder. p53, proteini apoptotik genlerin promotör bölgelerine bağlanarak bu genlerin transaktivasyonunu sağlar (187). DNA çift iplik kırıklarının kontrolü görevinde önemli rol oynayan p53 proteininin ifadenmesindeki 3,1 katlık artış bu kontrol mekanizmasının etkisini daha da arttırmaktadır. Siklin bağımlı kinaz inhibitör 1 (Cip1) olarak da bilinen p21 proteini DNA hasarı durumunda p53 proteini ile etkileşerek siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2), CDK4 ve CDK6'yı inhibe eder ve hücre döngüsünün G1 aşamasında durmasına neden olur (188). p21 proteinin ifadenmesindeki 0,25 katlık azalma hücrelerin G1 fazındaki bu kontrol noktasından kaçarak G1 fazında daha fazla etkinlik gösteren NHEJ mekanizmasının çalışmasına engel olabilir. Hücre döngüsü kontrol noktası 1 (Chk1) proteini hücre döngüsünde CDK2 proteinlerini baskılayarak hücre döngüsünün S ve G2 evrelerinde duraklamasını önler. Bununla birlikte, Chk1 proteini p53 proteinini aktive ederek hücre döngüsünün G1 fazında duraklatılmasına neden olur (189). Bu nedenle, S ve G2 evrelerinde daha fazla etkinlik gösteren homolog rekombinasyonla DNA onarımı yerine NHEJ mekanizmasının tercih edilmesini sağlar. Bu bilgiler ışığında, MCF7/1000Dox hücre hattındaki 4,1 katlık *Chk1* ifadenme artışının NHEJ mekanizmasının etkinliğini arttırdığı düşünölmektedir.

Özetle, MCF7/1000Dox hücre hattının kontrol grubunda MCF7/S ve MCF7/400Dox hücre hatlarının kontrol gruplarına göre NHEJ onarım yolağındaki genlerin ifadelenme düzeylerinin daha düşük olması, bu hücrelerde ilaç taşıyıcı proteinlere bağılı olarak hücre içi doksorubisin konsantrasyonunun az olması ile ilişkilendirilebilir. Buna rağmen, yüksek dozda doksorubisin uygulanan MCF7/1000Dox hücre hattında, NHEJ yolağındaki genlerde gerçekleşen ifadelenme artışıyla NHEJ yolağı DNA onarımında etkin bir rol üstlenmektedir. MCF7/1000Dox hücre hattında, NHEJ mekanizmasının merkezinde rol oynayan bu genlerin 4 µM ilaç uygulamasına bağılı olarak çok daha hızlı bir şekilde artıp diğere hücre hatlarına göre daha yüksek bir seviyeye gelerek MCF7/1000Dox hücre hattının sağkalımı açısından avantaj sağladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, 53BP1 immünofloresan boyama analizinde MCF7/400Dox hücre hattında doksorubisin uygulaması sonrasında NHEJ mekanizması etkinliğinde anlamlı bir fark meydana gelmemiştir. Bu durum, MCF7/400Dox hücre hattında genotoksik hasardaki azalmanın NHEJ mekanizmasından bağımsız onarım yolları tarafından gerçekleştirildiğini düşündürmektedir.

6) SONUÇ ve ÖNERİLER

- Doksorubisinin, duyarlı hücrelerde zamana bağlı artan sitotoksik etki gösterdiği, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücrelerinde ise ilk 24 saat içerisinde zamana bağlı sitotoksik etkinin duyarlı hücelere göre daha az olduğu belirlenmiştir.
- MCF7/400Dox hücre hattında, 6. saate kadar genotoksik hasar artmış, 6. saatten itibaren DNA hasarında düşüş belirlenmiştir. MCF7/1000Dox hücrelerinde ise 12. saate kadar doksorubisine bağlı oluşan genotoksik hasarda artış olurken, 12. saatten itibaren DNA hasarında düşüş meydana gelmiştir. Doksorubisine duyarlı hücrelerde ise 24 saatlik doksorubisin uygulaması zamana bağlı ve doğru orantılı genotoksik hasara neden olmuştur. Bununla birlikte, MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında 24 saatlik uygulamanın sonunda duyarlı hücelere göre daha düşük genotoksik hasar meydana gelmiştir.
- 53BP1 immünofloresan boyama analizlerinde MCF7/S hücre hattında doksorubisin uygulamasının ilk saatinde çift iplikli kırık onarımı başlarken, MCF7/1000Dox hücre hattında 12. saatte NHEJ mekanizması ile çift iplikli DNA kırıklarının onarımı başlamıştır. MCF7/1000Dox hücre hattında doksorubisin uygulamasının 12. saatinde NHEJ onarım mekanizmasının aktivitesi nedeniyle DNA hasarının azaldığı söylenebilir.
- İfadeleme analizleri yapılan *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC7*, *XLFI* ve *LIG4* genleri için, MCF7/S hücre hattı en yüksek ifadeleme düzeyine sahipken MCF7/1000Dox hücre hattı bu genleri en az ifadelendiren hücre hattıdır.
- MCF7/1000Dox hücre hattının kontrol grubunda MCF7/S ve MCF7/400Dox hücre hatlarının kontrol gruplarına göre NHEJ onarım yolağındaki genlerin ifadeleme düzeylerinin daha düşük olması, bu hücrelerde P-gp proteinine bağlı olarak hücre içi doksorubisin konsantrasyonunun az olması ile ilişkilendirilebilir.
- 4µM doksorubisin uygulanan MCF7/1000Dox hücre hattında, NHEJ yolağındaki genlerde gerçekleşen ifadeleme artışıyla NHEJ yolağının DNA onarımında etkin bir rol üstlendiği sonucuna varılmaktadır.
- İfadeleme analizleri, MCF7/S hücre hattında hsp-miR-101-3p miRNA ifadeleme değişikliklerinin *XRCC7* ifadenmesiyle ilişkili olduğunu göstermiştir.

- Hsp-miR-502-3p ifadenmesinin, MCF7/S hücre hattındaki *XRCC5*, *XLF* ve *LIG4* ifadenme değişimleriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir.
- Dirençli MCF7/400Dox ve MCF7/1000Dox hücre hatlarında miR-101 ve miR-502'nin NHEJ yolağı üzerindeki regülasyon etkisini kaybetmiş olabileceği düşünölmektedir.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda NHEJ yolağının kontrolünü sağlayan DNA hasar kontrolü mekanizmasına ait *53BP2*, *p21* ve *Chk1* proteinlerinin doksorubisin dirençli hücre hatlarındaki DNA hasar cevabı regülasyonu belirlenmelidir. Bunun yanı sıra, HR yolağının RNA interferans teknolojisi veya inhibitör ilaçlarla durdurulmasıyla DNA çift iplik kırıklarının onarımına dair önemli bulgular elde edilebilir. Bununla birlikte gelecekte yapılacak çalışmalarda, araştırılan bu genlere ait protein ifadenme düzeyleri de araştırılmalıdır.

7) KAYNAKLAR

- 1) Kars MD, Iseri OD, Gunduz U, Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Research* 26: 4559-68, 2006.
- 2) Darcansoy Iseri ÖD, Kars M, Gunduz U, Drug resistant MCF7 cells have altered expression levels of β -Tubulin isotypes and mutations in TUBB gene. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 20(2), 2010.
- 3) Walker JR, Corpina RA, Goldberg J, Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847):607–14, 2001.
- 4) Chan DW, Lees-Miller SP, The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(15):8936–41, 1996.
- 6) Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP, Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Current Biology - Cell Press*, 7(8):588–98, 1997.
- 7) Grawunder U, Wilm M, Wu X, Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388(6641):492–95, 1997.
- 8) Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP, XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2):301–13, 2006.
- 9) Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, 124(2):287–99, 2006.
- 10) Lieber MR, The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79:181–211. 2010.
- 11) Yan D, Loon Ng W, Zhang X, Targeting DNA-PKcs and ATM with miR-101 sensitizes tumors to radiation. *PLoS One*, 5(7): e11397, 2010.

- 12) Smolińska A, Swoboda J, Fendler W, MiR-502 is the first reported miRNA targeting simultaneously classical non-homologous end joining (NHEJ) and the cell cycle response. *Pancreatology*, 18(4):119, 2018.
- 13) Darcansoy İşeri Ö, Investigation of docetaxel and doxorubicin resistance in MCF7 breast carcinoma cell line. PhD thesis in METU Graduate School of Applied Sciences, Department of Biotechnology, 2009.
- 14) Siegel, RL, Miller KD, Jemal A, Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1):7-30. 2018.
- 15) Miao H, Verkooijen HM, Chia KS, Incidence and outcome of male breast cancer: an international population-based study. *Journal of Clinical Oncology*, 29:4381–86, 2011.
- 16) İlter H, Türkiye Kanser İstatistikleri 2015, Sağlık Bakanlığı, 2018.
- 17) Howell A, Sims AH, Ong KR, Mechanisms of Disease: prediction and prevention of breast cancer cellular and molecular interactions. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2(12): 635-46, 2013.
- 18) Citri A, Yarden Y, EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:505–16, 2006.
- 19) García-García C, Ibrahim YH, Serra V, Protein kinase calpha negatively regulates cell spreading and motility in MDA-MB-231 human breast cancer cells downstream of epidermal growth factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307:839–46, 2003.
- 20) Hu S, Pluth JM, Cucinotta FA, Putative binding modes of Ku70-SAP domain with double strand DNA: a molecular modeling study. *Journal of Molecular Modeling*, 18(5):2163–74 2012.
- 21) Kufe DW, MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene*, 32(9):1073-81, 2012.
- 22) Naderi A, Meyer M, Dowhan DH, Cross-regulation between FOXA1 and ErbB2 signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Neoplasia*, 14:283–96, 2012.

- 23) Wang Z, Fukushima H, Inuzuka H, Skp2 is a promising therapeutic target in breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 1:18702, 2012.
- 24) Xue G, Restuccia DF, Lan Q, Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF- β signaling axes. *Cancer Discovery*, 2:59–248 American Cancer Society Breast cancer facts and figures 2011–2012. American Cancer Society, Atlanta, 2012.
- 25) Tomao F, Papa A, Zaccarelli E, Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *Onco Targets Therapy*, 8:177-93, 2015.
- 26) Marusyk A, Polyak K, Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1805:105. 2010.
- 27) Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98:10869-74, 2001.
- 28) Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 100:8418-23, 2003.
- 29) Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of Clinical Oncology*, 23:7350-60, 2005.
- 30) Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology*, 52:67-81, 2008.
- 31) Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 27:1160-7, 2009.
- 32) Sotiriou C, Pusztai L, Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 360:790-800, 2009.
- 33) Correa Geyer F, Reis-Filho JS, Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? *International Journal of Surgical Pathology*, 17:285-302, 2009.

- 34) Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121:2750-67, 2011.
- 35) Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clinical Cancer Research*, 19:5533-40. 2013.
- 36) Bergonié J, Tribondeau L, Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 76(4- 6):181-2, 2003.
- 37) Demirel Kars M, Darcansoy İşeri Ö, Kemoterapi. *Kanser Moleküler Biyolojisi* (Baran Y.), Ankara, Kısayol Yayınları, 2018.
- 38) Robert J, Larsen AK, Drug resistance to topoisomerase II inhibitors. *Biochimie*, 80:247-54, 1998.
- 39) Zheng HC, The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35):59950-64, 2017.
- 40) Housman G, Byler S, Heerboth S, Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6:1769-92.
- 41) Zahreddine H, Borden KL, Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4:28, 2013.
- 42) Sampath D, Cortes J, Estrov Z, Pharmacodynamics of cytarabine alone and in combination with 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in AML blasts in vitro and during a clinical trial. *Blood*, 107:2517–74, 2006.
- 43) Michael M, Doherty MM, Tumoral drug metabolism: Overview and its implications for cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 23:205–29, 2005.
- 44) Shen H, He M, Liu H, Comparative metabolic capabilities and inhibitory profiles of CYP2D6.1, CYP2D6.10, and CYP2D6.17. *Drug Metabolism & Disposition*, 35:1292–1300, 2007.
- 45) Townsend DM, Tew KD, The role of glutathione-S-transferase in anticancer drug resistance. *Oncogene*, 22:7369–75, 2003.

- 46) Manolitsas TP, Englefield P, Eccle DM, No association of a 306 bp insertion polymorphism in the progesterone receptor gene with ovarian and breast cancer. *British Journal of Cancer*, 75:1397–99, 1997.
- 47) Cumming RC, Lightfoot J, Beard K, Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nature Medicine*, 7:814–20, 2001.
- 48) Stavrovskaya AA, Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc.)*, 65:95–106, 2000.
- 49) Hinds M, Deisseroth K, Mayes J, Identification of a point mutation in the topoisomerase II gene from a human leukemia cell line containing an amsacrine resistant form of topoisomerase II. *Cancer Research*, 51:4729–31, 1991.
- 50) Zwelling L, Hinds M, Chan D, Characterization of an amsacrine-resistant line of human leukemia cells. Evidence for a drug resistant form of topoisomerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 264:16411–20, 1989.
- 51) Mehta K, Fok JY, Targeting transglutaminase-2 to overcome chemoresistance in cancer cells. *Drug Resistance in Cancer Cells* (Mehta K), New York, NY, USA, Springer, 95–114, 2009.
- 52) Gorre ME, Mohammed M, Ellwoo K, Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR–ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293:876–80, 2001.
- 53) Chang G, Roth C, Structure of MsbA from *E. coli*: A homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, 293:1793–1800, 2001.
- 54) Sauna Z, Ambudkar S, Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *Journal of Biological Chemistry*, 276:11653–61, 2001.
- 55) Borst P, Elferink O, Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*, 71:537–92, 2002.

- 56) Schinkel A, Smit J, van Tellingen O, Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77:491–502, 1994.
- 57) Gottesman MM, Fojo T, Bates SE, Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2:48–58, 2002.
- 58) Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metabolism & Disposition*, 35, 1333–40. 2007.
- 59) Haber M, Smith J, Bordow S, Flemming C, Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24:1546–53 2006.
- 60) Yanase K, Tsukahara S, Asada S, Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3:1119–25, 2004.
- 61) Imai Y, Ishikawa E, Asada S, Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer Research*, 65:596–604, 2005.
- 62) Mutoh K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Estrogen-mediated post transcriptional downregulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells. *Cancer Science*, 97:1198–1204, 2006.
- 63) Katayama K, Yoshioka S, Tsukahara S, Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6:2092–2102, 2007.
- 64) Fukuyo Y, Hunt CR, Horikoshi N, Geldanamycin and its anticancer activities. *Cancer Letters*, 290:24–35, 2010.
- 65) Frew AJ, Lindemann RK, Martin BP, Combination therapy of established cancer using a histone deacetylase inhibitor and a TRAIL receptor agonist. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences, USA* 105:11317–22, 2008.
- 66) Soria J, Smit E, Khayat D, Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in

patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28:1527–33, 2010.

67) Mataga M, Rosenthal S, Heerboth S, Anti-breast cancer effects of histone deacetylase inhibitors and calpain inhibitors. *Anticancer Research*, 32:2523–30. 2012.

68) Sarkar S, Faller DV, T-oligos inhibit growth and induce apoptosis in human ovarian cancer cells. *Oligonucleotides*, 21:47–53, 2011.

69) Sarkar S, Faller DV, Telomere-homologous G-rich oligonucleotides sensitize human ovarian cancer cells by combination therapy. *Nucleic Acid Ther.* 2013, 23, 167–174. *Cancers*, 6:1789, 2014.

70) Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Chloroquine potentiates the anticancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer*, 10:e370, 2010.

71) Cook KL, Wärrri A, Soto-Pantoja DR, Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 20:3222–32, 2014.

72) Shang Y, Cai X, Fan D, Roles of epithelial-mesenchymal transition in cancer drug resistance. *Current Cancer Drug Targets*, 13:915–29, 2013.

73) Singh A, Settleman J, EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29:4741–51, 2010.

74) Chaffer C, Brueckmann I, Scheel C, Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences USA*. 108:7950–55, 2011.

75) Chaffer C, Weinberg R, A perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* 331:1559–1564, 2011.

76) Sarkar S, Horn G, Moulton K, Cancer development, progression and therapy: An epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:21087–113, 2013.

77) Byler S, Goldgar S, Heerboth S, Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Research*, 34:1071–77, 2014.

- 78) Byler S, Sarkar S, Do epigenetic drug treatments hold the key to killing cancer progenitor cells? *Epigenomics*, 6:161–165, 2014.
- 79) Lenisak D, Xu Y, Deschenes J, Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Research*, 69:8620–28, 2009.
- 80) Sarkar S, Svoboda M, de-Beaumont R, Freedman A, The role of AKT and RAFTK in beta1 integrin mediated survival of precursor B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*, 43:1663–71, 2002.
- 81) Galliher AJ, Schiemann WP, β 3 integrin and Src facilitate transforming growth factor- β mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Research*, 8:R42, 2006.
- 82) Shibue T, Weinberg RA, Integrin β 1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences, USA*, 106:10290–95, 2009.
- 83) Bates RC, Mercurio AM, The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biology & Therapy*, 4:365–70, 2005.
- 84) Witz IP, The selectin-selectin ligand axis in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27:19–30, 2008.
- 85) Paschos KA, Canovas D, Bird NC, The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cell Signaling*, 21:665–74, 2009.
- 86) Laubli H, Borsig L, Selectins promote tumor metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 20:169–77, 2010.
- 87) Desgrosellier JS, Cheresh DA, Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 10:9–22, 2010.
- 88) Bendas G, Borsig L, Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *International Journal of Cell Biology*, 2012:676731, 2012.

- 89) Barkan D, Kleinman H, Simmons JL, Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Research*, 68:6241–50, 2008.
- 90) Ning Y, Gerger A, Zhang W, Platin polymorphisms predict gender- and stage-specific colon cancer recurrence after adjuvant chemotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13:528–39, 2014.
- 91) Bégué E, Jean-Louis F, Bagot M, Inducible expression and pathophysiologic functions of T-platin in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 120:143–154, 2012.
- 92) Staussman R, Morikawa T, Shee K, Tumor micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 487:500–4, 2009.
- 93) Parkin B, Ouillette P, Li Y, Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*, 121:369–77, 2013.
- 94) Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome Research*, 20:68–80, 2010.
- 95) Campbell P, Yachida S, Mudie L, The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*. 467:1109–13, 2010.
- 96) Bonanno L, Favaretto A, Rosell R, Platinum drugs and DNA repair mechanism in lung cancer. *Anticancer Research*, 34:493–502, 2014.
- 97) Olaussen K, Dunant A, Fouret P, DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 355:983–91, 2006.
- 98) Selvakumaran M, Pisarcik D, Bao R, Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Research*, 63:1311–16, 2003.
- 99) Curtin NJ, DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews*, 12:801–17, 2012.
- 100) Esteller M, Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: Promoter hypermethylation of DNA repair genes. *European Journal of Cancer*, 36:2294–2300, 2000.

- 101) Goode E, Ulrich C, Potter J, Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11:1513–30 2002.
- 102) Rabik C, Fishel M, Holleran J, Enhancement of cisplatin cytotoxicity by O6-benzylguanine involves endoplasmic reticulum stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327:442–52, 2008.
- 103) Gegi M, Diserens A, Gorlia T, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352:997–1003, 2005.
- 104) Dong X, Liu R, Chen W, Correlation of promoter methylation in MGMT gene with glioma risk and prognosis: A meta-analysis. *Molecular Neurobiology*, 52(3):1887, 2014.
- 105) Durante M, Bedford JS, Chen DJ, From DNA damage to chromosome aberrations: joining the break. *Mutation Research*, 756 (1–2):5–13, 2013.
- 106) Hoeijmakers JH, DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361 (15):1475–85, 2009.
- 107) Wyman C, Kanaar R, DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual Review of Genetics*, 40:363–83, 2006.
- 108) van Gent DC, van der Burg M, Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene*, 26 (56):7731–40, 2007.
- 109) Bekker-Jensen S, Mailand N, Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*, 9(12):1219–28, 2010.
- 110) Riballo E, Kuhne M, Rief N, A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma H2AX foci. *Molecular Cell*, 16(5):715–24, 2004.
- 111) Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10):5858–68, 1998.

- 112) Noon AT, Shibata A, Rief N, 53BP1- dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nature Cell Biology*, 12(2):177–84, 2010.
- 113) Shibata A, Conrad S, Birraux J, Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *The EMBO Journal*, 30(6):1079–92, 2011.
- 114) Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Molecular Cell*, 31(2):167–77, 2008.
- 115) Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal*, 28(21):3413–27, 2009.
- 116) Gottlieb TM, Jackson SP, The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72(1):131–42. 1993.
- 117) Ding Q, Reddy YV, Wang W, Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, 23 (16):5836–48, 2003.
- 118) Jin S, Weaver DT, Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions. *The EMBO Journal*, 16(22):6874–85, 1997.
- 119) Gell D, Jackson SP, Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Research*, 27(17):3494–3502, 1999.
- 120) Araki R, Fujimori A, Hamatani K, Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 94(6):2438–43, 1997.
- 121) Blunt T, Gell D, Fox M, Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the SCID mouse. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 93(19):10285–90, 1996.

- 122) Kurimasa A, Kumano S, Boubnov NV, Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Molecular and Cellular Biology*, 19(5):3877–84, 1999.
- 123) Modesti M, Hesse JE, Gellert M, DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity. *EMBO Journal*, 18(7):2008–18, 1999.
- 124) Gao Y, Sun Y, Frank KM, A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell*, 95(7):891–902, 1998.
- 125) Frank KM, Sharpless NE, Gao Y, DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. *Molecular Cell*, 5(6):993–1002, 2000.
- 126) Barnes DE, Stamp G, Rosewell I, Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Current Biology*, 8(25):1395–98, 1998.
- 127) Karanjawala ZE, Adachi N, Irvine RA, The embryonic lethality in DNA ligase IV-deficient mice is rescued by deletion of Ku: implications for unifying the heterogeneous phenotypes of NHEJ mutants. *DNA Repair (Amst)*, 1(12):1017–26, 2002.
- 128) Li G, Alt FW, Cheng HL, Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination. *Molecular Cell*, 31(5):631–640 2008.
- 129) Ochi T, Blackford AN, Coates J, PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science*, 347 (6218):185–8, 2015.
- 130) Xing M, Yang M, Huo W, Interactome analysis identifies a new paralogue of XRCC4 in non-homologous end joining DNA repair pathway. *Nature Communications*, 6:6233, 2015.
- 131) Yannone SM, Roy S, Chan DW, Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(41):38242–48, 2001.

- 132) Quennet V, Beucher A, Barton O, CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1. *Nucleic Acids Research*, 39(6):2144–52, 2011.
- 133) Koch CA, Agyei R, Galicia S, Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO Journal*, 23(19):3874–85, 2004.
- 134) Ramsden DA, Asagoshi K, DNA polymerases in nonhomologous end joining: are there any benefits to standing out from the crowd? *Environ Molecular Mutagen*, 53(9):741–51, 2012.
- 135) Mahajan KN, Gangi-Peterson L, Sorscher DH, Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 96:13926–31, 1999.
- 136) Zha S, Guo C, Boboila C, ATM damage response and XLF repair factor are functionally redundant in joining DNA breaks. *Nature*, 469(7329):250–54, 2011.
- 137) Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ, Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular Cell*, 47(4):497–510, 2012.
- 138) Helleday T, Lo J, van Gent DC, DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)*, 6(7):923–35, 2007.
- 139) Kumar R, Cheek CF, RIF1: A novel regulatory factor for DNA replication and DNA damage response signaling. *DNA repair*, 15(1):54-9, 2014.
- 140) Huertas P, Jackson SP, Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(14):9558–65, 2009.
- 141) Escribano-Diaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Molecular Cell*, 49(5):872–83, 2013.
- 142) Drost R, Bouwman P, Rottenberg S, BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. *Cancer Cell*, 20(6):797–809, 2011.

- 143) Bunting SF, Callen E, Wong N, 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*, 141(2):243–54, 2010.
- 144) Chapman JR, Barral P, Vannier JB, RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous endjoining and suppression of DNA double-strand break resection. *Molecular Cell*, 49(5):858–71, 2013.
- 145) Zimmermann M, Lotterberger F, Buonomo SB, 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 50 end resection. *Science*, 339(6120):700–4, 2013
- 146) Hannon GJ, RNA interference. *Nature*, 418(6894):244–51, 2002.
- 147) Haley B, Zamore B, Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11:599–606, 2004.
- 148) Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106:23–34, 2001.
- 149) Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*, 293:834–38, 2001.
- 150) Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development*, 15:2654–59, 2001.
- 151) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75:843–54, 1993.
- 152) Lee RC, Ambros V, An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294:862–64, 2001.
- 153) Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106:23–34, 2001.
- 154) Paddison PJ, RNA Interference in Mammalian Cell Systems. *RNA Interference*. (Paddison PJ), Berlin, Springer, 2008.

- 155) Matranga C, Tomari Y, Shin C, Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123: 607–20, 2005.
- 156) Leuschner P, Ameres S, Kueng S, Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Reports*, 7:314–20, 2006.
- 157) Parker G, Eckert D, Bass B, RDE-4 preferentially binds long dsRNA and its dimerization is necessary for cleavage of dsRNA to siRNA. *RNA*, 12:807–18, 2006.
- 158) Liu Q, Rand T, Kalidas S, R2D2, A bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, 301:1921–25, 2003.
- 159) Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432:231–35, 2004.
- 160) Song E, Lee SK, Wang J, RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine*, 9:347–51, 2003.
- 161) Song JJ, Liu J, Tolia NH, The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10:1026–32, 2003.
- 162) Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305:1434–37, 2004.
- 163) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Duplexes of 21- nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411:494–8, 188.
- 164) Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Development*, 20:515–24, 2006.
- 165) Calin GA, Croce CM, MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6(11):857–66, 2006.
- 166) Nairz K, Rottig C, Rintelen F, Overgrowth caused by misexpression of a microRNA with dispensable wild-type function. *Developmental Biology*, 291:314–24, 2006.
- 167) Tagawa H, Seto M, A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia*, 19:2013–6, 2005.

- 168) Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Research*, 65:9628–32, 2005.
- 169) Hemann MT, He L, Thomson JM, A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435:828–33, 2005.
- 170) Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65:7065–70, 2005.
- 171) Esquela-Kerscher A, Slack FJ, Oncomirs microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4):259–69, 2006.
- 172) Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PLoS One*, 5: e10630, 2010.
- 173) Takahashi RU, Miyazaki H, Ochiya T, The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 7: 598-616, 2015.
- 174) Allen JD, Van Dort SC, Buitelaar M, Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. *Cancer Research*, 63:1339-44, 2003.
- 175) Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF7 breast cancer cells to cisplatin. *International Journal of Cancer*, 127:1785-94, 2010.
- 176) Bacus SS, Kiguchi K, Chin D, Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. *Molecular Carcinogenesis*, 3:350-62, 1990.
- 177) Chomczynski P, Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162 (1):1987, 156-9, 1987.
- 178) Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25:402-8.

- 179) Meşe AK, Erdamar A, İşeri ÖD, Image analysis for single cell gel electrophoresis. Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU), IEEE, 25:1-4, 2017.
- 180) Matsuda K, Miura S, Kurashige T, Significance of p53-binding protein 1 nuclear foci in uterine cervical lesions: endogenous DNA double strand breaks and genomic instability during carcinogenesis. *Histopathology*, 59(3):441-51, 2011.
- 181) Dönmez Y, Gündüz U, Reversal of multidrug resistance by small interfering RNA (siRNA) in doxorubicin-resistant MCF7 breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65(2):85-89, 2011.
- 182) Dönmez Y, Akhmetova L, İşeri ÖD, Effect of MDR modulators verapamil and promethazine on gene expression levels of MDR1 and MRP1 in doxorubicin-resistant MCF7 cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 67(4):823-8, 2011.
- 183) Mao Z, Bozella M, Gorbubova V, Comparasion of nonhomolohous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA repair*. 7(10):1765-71, 2009.
- 184) Farhane Z, Bonnier F, Bryne HJ, Monitoring doxorubicin cellular uptake and trafficking using in vitro Raman microspectroscopy: short and long time exposure effects on lung cancer cell lines. *Bioanalytical Chemistry*, 409(5):1333–46, 2016.
- 185) de Campos-Nebel M, Larripa I, Gonza´lez-Cid M, Topoisomerase II-Mediated DNA Damage Is Differently Repaired during the Cell Cycle by Non-Homologous End Joining and Homologous Recombination. *Plos One*, 9:e12541, 2010.
- 186) Sunter NJ, Cowell IG, Willmore E, Role of Topoisomerase II β in DNA Damage Response following IR and Etoposide, *Journal of Nucleic Acids*, 2010:710589, 2010.
- 187) Ducoux M, Urbach S, Baldacci G, Mediation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-dependent DNA replication through a conserved p21(Cip1)-like PCNA-binding motif present in the third subunit of human DNA polymerase delta. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:49258-66, 2001.
- 188) Uhlmann-Schiffler H, Kiermayer S, Stahl H, The DEAD box protein Ddx42p modulates the function of ASPP2, a stimulator of apoptosis. *Oncogene*, 28:2065-73, 2009.

189) Niida H, Nakanishi M, DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 21(1):3-9,2005.



8) EKLER

Ek A: RPMI 1640 (Cegrogen, Almanya) İeriği

İerik	Konsantrasyon (mg/L)	Moleküler Ağırlık (g/mol)	Konsantrasyon (mM)
L-Alanyl-L-Glutamine	300.00	217.22	1.38
L-Arginine	200.00	174.20	1.15
L-Asparagine	50.00	132.12	0.38
L-Aspartic Acid	20.00	133.10	0.15
L-Cystine 2HCl	65.20	240.30	0.27
L-Glutamine	300.00	146.15	2.05
Glycine	10.00	75.07	0.13
L-Glutamic Acid	20.00	147.13	0.14
L-Histidine	15.00	155.15	0.10
L-Hydroxy-L-Proline	20.00	131.13	0.15
L-Isoleucine	50.00	131.17	0.38
L-Leucine	50.00	131.17	0.38
L-Lysine HCl	40.00	182.65	0.22
L-Methionine	15.00	149.21	0.10
L-Phenylalanine	15.00	165.19	0.09
L-Proline	20.00	115.13	0.17
L-Serine	30.00	105.09	0.29
L-Threonine	20.00	119.12	0.17
L-Tryptophan	5.00	204.23	0.02
L-Tyrosine	21.84	181.19	0.12
L-Valine	20.00	117.15	0.17
p-Amino Benzoic Acid	1.00	137.14	0.0073
D-Biotin	0.20	244.31	0.0008
Choline chloride	3.00	139.62	0.0215
D-Calcium Pantothenate	0.25	476.53	0.0005
Folic Acid	1.00	441.40	0.0023
myo-Inositol	35.00	180.16	0.1943
Nicotinamide	1.00	122.12	0.0082
Pyridoxine HCl	1.00	203.62	0.0049
Riboflavin	0.20	376.36	0.0005
Thiamine HCl	1.00	337.27	0.0030
Vitamin B12	0.005	1355.37	0.0000037

Ek B: Tampon ve Solüsyonlar

1. RNA İzolasyonu

Dietilpirokarbonatla muamele edilmiş ddH₂O (1 L)

DEPC	1000 µL
dH ₂ O	1 L

DEPC suya eklendikten sonra köpürene kadar güçlü biçimde çalkalanır. Su kapağı açık biçimde çeker ocak içerisinde 16 saat bekletildikten sonra otoklavlanır.

2. Agaroz Jel Elektroforezi

TAE (Tris- Asetik asit- EDTA) Tamponu (50X, 1 L)

Tris-baz (MW: 121.14)	242 g
Glasiyel Asetik Asit	57.1 mL
EDTA disodium dihydrate (MW: 372.24) (0.5 M)	100 mL

Hacim distile su ile 1L'ye tamamlanır. pH 8,5'e ayarlanır ve solüsyon otoklavlanır.

Ethidium Bromide (EtBr) Solüsyonu (10mg/mL)

EtBr (MW: 394.31)	10 mg
dH ₂ O	1 mL

Solüsyon karanlıkta ve +4°C'de saklanır.

3. Alkali Tek Hücre Elektroforezi Solüsyonları

Liziz Tamponu (1L)

NaCl	146,2 g
Tris-baz (MW: 121.14)	1,2 g
EDTA disodium dihydrate (MW: 372.24) (0,1 M)	37,2g

Elektroforez Tamponu (1 L)

NaOH (10 N)	30 mL
-------------	-------

EDTA (200 mM)	5 mL
Nötralizasyon Tamponu (pH:7.5, 1 L)	
Tris baz	48,5 g
EDTA (200 mM)	5 mL

4. İmmüno Floresan Boyama Solüsyonları

PBS Solüsyonu (200 mL)

PBS (Tablet)	1 Adet
ddH ₂ O	100 mL

PBS tableti suya atılı ve manyetik karıştırıcıda tamamen çözünene kadar karıştırılır.

Permeabilizasyon Solüsyonu (100 mL)

Triton X-100	200 µL
PBS(1X)	100 mL

Triton X-100 PBS'e eklenir ve iyice çözdürüldükten sonra +4°C'de saklanır.

Bloklama Solüsyonu (100 mL)

Bovin Serum Albumin (BSA)	1 g
Triton X-100	200 µL
ddH ₂ O	100 mL

Öncelikle Triton X-100 eklenerek köpürtmeden karıştırılır. Daha sonra BSA eklenir ve tamamen çözdürüldükten sonra +4°C'de saklanır.