



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRLERİNİN (HDACi)  
GLİOBLASTOMA MULTİFORME (GBM) HÜCRE  
HATLARINDA APOPTOTİK YOLAK ÜZERİNDEKİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Levent ELMAS

Eylül 2017  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRLERİNİN (HDACi)  
GLİOBLASTOMA MULTİFORME (GBM) HÜCRE HATLARINDA  
APOPTOTİK YOLAK ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

Levent ELMAS

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

İkinci Danışman: Doç. Dr. Tuğba BAĞCI-ÖNDER

Denizli, 2017

## DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Levent ELMAS tarafından Prof. Dr. Gülseren BAĞCI yönetiminde hazırlanan “**Histon Deasetilaz İnhibitörlerinin (HDACi) Glioblastoma Multiforme (GBM) Hücre Hatlarında Apoptotik Yolak Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş olup, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Hakan AKÇA  
Pamukkale Üniversitesi



Danışman:

Prof. Dr. Gülseren BAĞCI  
Pamukkale Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM  
Akdeniz Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Yavuz DODURGA  
Pamukkale Üniversitesi

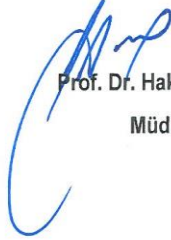


Üye:

Doç. Dr. Tuğba EDGÜNLÜ  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22/09/2017 tarih ve 17/6 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Hakan AKÇA  
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Levent ELMAS

İmza :



## ÖZET

### HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRLERİNİN (HDACi) GLİOBLASTOMA MULTİFORME (GBM) HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK YOLAK ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Levent ELMAS  
Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI  
İkinci Danışman: Doç. Dr. Tuğba BAĞCI-ÖNDER

Eylül 2017, 154 Sayfa

Glioblastoma multiforme, genellikle yetişkinlerde görülen merkezi sinir sisteminin en yaygın ve agresif primer beyin tümörüdür. Cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavilere rağmen hastalığın sağ kalım 14.6 aydır. Konvansiyonel kemoterapi düşük kan-beyin bariyeri penetrasyonu, tümör içi heterojenite, intrinsik GBM direnci ve spesifik olmayan toksisite nedeniyle sınırlı etkiye sahiptir. TRAIL normal hücrelere herhangi bir etki yapmadan, kanser hücrelerini hedeflemesi yönünden oldukça ilgi çekici bir ajandır. GBM'in TRAIL-aracılı apoptoza direnç gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle HDACi gibi ajanların TRAIL ile birlikte kombine olarak uygulanması GBM tedavisi için güncel bir stratejidir. Bu çalışmanın amacı, Vorinostat, MS-275, Belinostat ve Romidepsin HDACi'lerinden TRAIL-aracılı ölümü en iyi şekilde arttıran 2 HDAC'yi belirlemek ve bu HDACi'lerin GBM hücrelerinde apoptotik yolak üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Bu sebeple, LN18, T98G, U87MG ve U373 hücrelerinde TRAIL'in etkisi, HDACi'lerin sitotoksik etkisi ve TRAIL ile kombine uygulaması CellTiter-Glo yöntemi ile belirlenmiş ve GraphPad Prism programı ile IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Belinostat ve Romidepsin'in TRAIL ile kombine uygulamasının apoptoza olan etkisi akım-sitometri yöntemi ile hesaplanmıştır. Belinostat ve Romidepsin'in pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonuna olan etkisi kantitatif gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Apoptozda rol oynayan kaspaz-8, -9, Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyonu western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlarımıza göre; Vorinostat, Romidepsin ve Belinostat GBM hücrelerinde diğer HDACi'lere göre daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Belinostat ve Romidepsin'in diğer HDACi'lere göre TRAIL-aracılı ölümden daha etkili olduğu bulunmuştur. Akım-sitometri analizlerine göre, Belinostat ve Romidepsin'in TRAIL ile kombine uygulamayla apoptozu ciddi şekilde arttırdığı, gerçek-zamanlı PCR sonucuna göre de pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu arttırırken, anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. Protein seviyesinde ise anlamlı bir fark görülememiştir. Bu sonuçlar bize, Belinostat ve Romidepsin'in GBM tedavisi için potansiyel birer ajan olduklarını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Glioblastoma multiforme, Apoptoz, TRAIL, HDACi

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2015SBE001).**

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS (HDACi) ON APOPTOTIC PATHWAY IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)

ELMAS, Levent

PhD. Thesis in Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI (PhD)

2nd Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tuğba BAĞCI-ÖNDER

September 2017, 154 pages

Glioblastoma multiforme is the most common central nervous system and aggressive brain tumour mainly occur in adults. Despite surgical, radiotherapy and chemotherapy, survival of the disease is 14.6 months. Conventional chemotherapy has limited effect due to blood-brain-barrier, intrinsic heterogeneity of tumor, intrinsic GBM resistance and non-specific toxicity. TRAIL which has no effect for normal cells but targets tumour cells, is a promising agent. It is known that GBM shows resistance to TRAIL-mediated apoptosis. Therefore, combined treatment agents such as HDACi combined with TRAIL is current strategy for GBM therapy. The aim of this study to determine the best two HDACi enhancing the TRAIL-mediated cell death among Vorinostat, MS-275, CBHA, Belinostat and Romidepsin and to investigate the effects of these HDACis upon apoptotic pathway on GBM. For this reason, effects of TRAIL, cytotoxic effects of HDACis and effects of combined TRAIL treatment on LN18, T98G, U87MG and TRAIL was determined with CellTiter-Glo method and  $IC_{50}$  doses of HDACis were calculated via GraphPad Prism program. Effects of the combination of TRAIL either Belionstat or Romidepsin to apoptosis were calculated by flow-cytometry. Expression changes of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes were analyzed by real-time PCR. Additionally, protein expressions of Bcl-2, Bax, caspase-8 and caspase-9 were determined by western blot analysis. According to our results, Vorinostat, Romidepsin and Belinostat have more cytotoxic effect on GBM compared with other HDACis. It is found that compared to other HDACis, Belinostat and Romidepsin are more effective for TRAIL-induced cell death. By flow-cytometry analysis, combined treatment of Belinostat and Romidepsin with TRAIL enhanced apoptosis significantly. According to real-time PCR results, Romidepsin and Belinostat increased pro-apoptotic gene expression but decreased anti-apoptotic expression. There isn't any significant changes on protein levels. This results suggest and indicated that Belinostat and Romidepsin is a potential agent for GBM treatment.

**Keywords:** Glioblastoma multiforme, Apoptosis, TRAIL, HDACi

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through Project number 2015SBE001.**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteği sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya,

Tez çalışmam sürecinde deneylerin gerçekleştirilmesinde her türlü alt yapıyı sağlayan ve bilgilerini benden esirgemeyen ikinci danışmanım, Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Tuğba BAĞCI-ÖNDER'e,

Deneylerim aşamasında beni kendi ekiplerinden biri olarak gören ve bilgilerini esirgemeyen başta Ahmet CİNGÖZ, Filiz ŞENBABAĞLU olmak üzere tüm Koç Üniversitesi Beyin Kanseri Terapi ve Araştırma Laboratuvarı ekibine,

Koç Üniversitesi'ndeki görevlendirmem sırasında hem bilgi hem de sıcakkanlı dostlukları bakımından Özgür ALBAYRAK ve Koç Üniversitesi Kök Hücre Laboratuvar ekibine,

Deneylerim için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda her türlü altyapıyı sağlayan ve bilgilerini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya,

Doktora eğitimim boyunca bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hakan AKÇA olmak üzere tüm bölüm hocalarıma,

Doktora eğitimim boyunca deneylerin gerçekleşmesindeki yardımları ve içten dostlukları için Arş. Gör. Mücahit SEÇME, Arş. Gör. Özge CAN, Arş. Gör. Şakir AKGÜN, Nazlı ŞİRİN ve Hakan KÜÇÜKSAYAN'a,

Doktora tez projemin gerçekleşmesini için gerekli kaynağı sağlayan Pamukkale Üniversitesi'ne ve PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, ayrıca PAÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne,

Doktora eğitimim boyunca benimle birlikte her türlü cefaya katlanan ve desteğini bir an bile esirgemeyen sevgili eşim Zuhul ELMAS ve kızım Elif Suna ELMAS'a,

Beni bu günlere getiren, hayatımın her evresinde yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiren sevgili aileme ve kayın validem Hamide YILDIRIM'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım...

## İÇİNDEKİLER

**Sayfa**

<b>ÖZET</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	vii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	x
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Amaç.....	3
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	4
2.1. Beyin Tümörleri .....	9
2.2. Glioblastoma multiforme (GBM).....	11
2.2.1. GBM Genetiği ve Moleküler Belirteçleri .....	14
2.2.2. GBM epidemiyolojisi .....	19
2.2.3. GBM etiyolojisi.....	20
2.2.4. GBM tedavisi .....	21
2.3. Apoptoz .....	23
2.3.1. Apoptozun İntrinsik (İç) Yolağı .....	25
2.3.2. Apoptozun Ekstrinsik (Dış) Yolağı .....	27
2.3.3. TRAIL .....	29
2.3.3.1. Kanserde TRAIL Direnci .....	32
2.3.3.2. TRAIL ve GBM .....	33
2.4. Epigenetik ve Histon Deasetilazlar (HDAC) .....	35
2.5. Histon Deasetilaz İnhibitörleri (HDACi) .....	38
2.6. Hipotez .....	41
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	42
3.1. Hücre Hatlarının Temini, Çoğaltılması ve Saklanması .....	42
3.2. Hücre Sayımı.....	43
3.3. HDACi Konsantrasyonlarının Hazırlanması .....	45
3.4. 293T Hücre Hattından TRAIL Üretimi .....	46
3.5. HDACi'lerin ve TRAIL'in GBM ve BJ Hücre Hatlarına Uygulanması.....	47



3.6.	Hücre Canlılık Analizleri.....	48
3.7.	FITC Anneksin V / Propidyum İyodür (PI) Yöntemi ile Apoptozun Gösterilmesi (Akım-sitometri Yöntemi).....	49
3.8.	GBM Hücrelerinden RNA İzolasyonu.....	53
3.9.	Total RNA Örneklerinden Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	55
3.10.	Kantitatif Gerçek-zamanlı PCR Deneyleri (qPCR).....	56
3.11.	GBM Hücrelerinden Protein Lizatı Hazırlanması.....	59
3.12.	Protein Konsantrasyonlarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi.....	60
3.13.	SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Yöntemi...	61
3.14.	İstatistiksel Analiz.....	64
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b> .....	<b>65</b>
4.1.	Çalışmada Kullanılan Hücelere Ait Invert Mikroskop Görüntüleri.....	65
4.2.	TRAIL'in GBM ve BJ Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	66
4.3.	HDACi'lerin GBM Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkileri.....	69
4.3.1.	Vorinostat'ın GBM Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkisi.....	69
4.3.2.	MS-275'in GBM Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkisi.....	71
4.3.3.	CBHA'nın GBM Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi.....	73
4.3.4.	Belinostat (PXD-101)'in GBM Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi.....	73
4.3.5.	Romidepsin (FK-228)'in GBM Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi.....	76
4.4.	TRAIL ve HDACi'lerin GBM Hücreleri Üzerine Kombine Denemeleri.....	78
4.4.1.	TRAIL ve Vorinostat'ın Kombine Uygulamasının GBM Hücreleri Üzerine Etkisi.....	78
4.4.2.	TRAIL ve MS-275'in Kombine Uygulamasının GBM Hücreleri Üzerine Etkisi.....	81
4.4.3.	TRAIL ve CBHA'nın Kombine Uygulamasının GBM Hücreleri Üzerine Olan Etkisi.....	84
4.4.4.	TRAIL ve Belinostat (PXD-101)'in kombine uygulamasının GBM hücreleri üzerine etkisi.....	87
4.4.5.	TRAIL ve Romidepsin (FK-228)'in kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi.....	89
4.5.	GBM Hücre Hatlarında HDACi'lerin IC <sub>50</sub> Değerlerinin GraphPad Prism, 5.0 ile Analizi.....	92
4.6.	Akım-sitometri Deneyleri.....	98
4.7.	Gerçek-zamanlı PCR Deneyleri.....	105
4.8.	Western Blot Deneyleri.....	115
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>118</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ</b> .....	<b>137</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>140</b>
<b>8.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>154</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1 Birleşik Devletler’de 2017 yılında görülen on ana kanser türünün ve ölüm oranlarının cinsiyete göre dağılımları. ....	6
Şekil 2.2 Ülkemizde erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları.....	7
Şekil 2.3 Ülkemizde kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları.....	8
Şekil 2.4 Türkiye’de erkek ve kadınlarda en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımları. ....	8
Şekil 2.5 Malign primer beyin tümörlerinin dağılımı. ....	10
Şekil 2.6 GBM gelişiminde meydana gelen genetik değişimler (von Neubeck 2015)...	14
Şekil 2.7 Astrosit kökenli tümörlerin dağılımı.....	20
Şekil 2.8 İnsanlarda bulunan kaspazlar ve domainleri.....	24
Şekil 2.9 Bcl-2 ailesi üyelerinin yapısal ve fonksiyonel yönden sınıflandırılması.....	26
Şekil 2.10 Ölüm reseptörleri ve ligandları.....	28
Şekil 2.11 İnsanda bulunan TRAIL’in organizasyonu. ....	29
Şekil 2.12 İnsanlarda bulunan TRAIL reseptörleri.....	30
Şekil 2.13 Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolağı.....	31
Şekil 2.14 HAT ve HDAC’lerin transkripsiyonel aktivasyondaki rolü.....	36
Şekil 2.15 Histon deasetilaz inhibitörlerinin etki mekanizması.....	38
Şekil 3.1 Neubauer lamı.....	45
Şekil 3.2 Neubauer lamı alan görüntüsü.....	45
Şekil 3.3 CTG analizi çalışma prensibi.....	48
Şekil 3.4 FITC Anneksin V / PI boyama mekanizması.....	50
Şekil 3.5 FITC Anneksin V / PI boyaması sonucu akım sitometri cihazında oluşan histogram görüntüsü.....	51
Şekil 3.6 FITC Anneksin V / PI deneyi için 6-kuyucuklu hücre kültür kabı düzeni.....	52
Şekil 4.1 Çalışmamızda kullanılan hücrelere ait invert-mikroskop görüntüleri.....	66
Şekil 4.2 TRAIL’in LN18, T98G ve BJ hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi.....	67
Şekil 4.3 TRAIL’in U87MG hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi.....	68
Şekil 4.4 TRAIL’in U373 hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi.....	68
Şekil 4.5 Vorinostat’ın LN18, T98, U87MG ve U373 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi.....	70
Şekil 4.6 MS-275’in LN18, T98G, U87MG ve U373 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi.....	72
Şekil 4.7 CBHA’nın GBM ve BJ hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi.....	74
Şekil 4.8 Belinostat (PXD-101)’in GBM ve BJ hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi.....	75
Şekil 4.9 Romidepsin (FK-228)’in GBM ve BJ hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi.....	77
Şekil 4.10 TRAIL ve Vorinostat’ın kombine uygulamasının BJ hücreleri üzerine etkisi.....	78
Şekil 4.11 TRAIL ve Vorinostat’ın kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.....	79
Şekil 4.12 TRAIL ve Vorinostat’ın kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.....	79

Şekil 4.13 TRAIL ve Vorinostat'ın tekli ve kombine dozlarının U87MG hücreleri üzerine etkisi.....	80
Şekil 4.14 Vorinostat ve TRAIL'in kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi.....	81
Şekil 4.15 TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının BJ hücreleri üzerine etkisi....	81
Şekil 4.16 TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.....	82
Şekil 4.17 TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.....	82
Şekil 4.18 TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının U87MG hücreleri üzerine etkisi.....	83
Şekil 4.19 TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.20 TRAIL ve CBHA'nın kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.....	85
Şekil 4.21 TRAIL ve CBHA'nın kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.....	85
Şekil 4.22 TRAIL ve CBHA'nın kombine uygulamasının U87MG hücreleri üzerine etkisi.....	86
Şekil 4.23 TRAIL ve CBHA'nın kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi.....	86
Şekil 4.24 TRAIL ve Belinostat'ın kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.....	87
Şekil 4.25 TRAIL ve Belinostat'ın kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.....	88
Şekil 4.26 TRAIL ve Belinostat'ın kombine uygulamasının U87MG hücreleri üzerine etkisi.....	88
Şekil 4.27 TRAIL ve Belinostat'ın kombine uygulamasının U373 hücre hattı üzerine etkisi.....	89
Şekil 4.28 TRAIL ve Romidepsin'in kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.....	90
Şekil 4.29 TRAIL ve Romidepsin'in kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.....	90
Şekil 4.30 TRAIL ve Romidepsin'in kombine uygulamasının U87MG hücreleri üzerine etkisi.....	91
Şekil 4.31 TRAIL ve Romidepsin'in kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi.....	91
Şekil 4.32 Vorinostat'ın GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.....	93
Şekil 4.33 MS-275'in GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.....	94
Şekil 4.34 CBHA'nın GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.....	95
Şekil 4.35 Belinostat'ın GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.....	96
Şekil 4.36 Romidepsin'in GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.....	97
Şekil 4.37 Belinostat ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının T98G hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi.....	99
Şekil 4.38 Belinostat ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının U87MG hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi.....	100
Şekil 4.39 Belinostat ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının U373 hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi.....	101

Şekil 4.40 Romidepsin ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının T98G hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi.....	102
Şekil 4.41 Romidepsin ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının U87MG hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi. ....	103
Şekil 4.42 Romidepsin ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının U373 hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisinin akım-sitometri sonuçları.....	104
Şekil 4.43 Belinostat'ın T98G hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi. ....	106
Şekil 4.44 Belinostat'ın T98G hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi. ....	106
Şekil 4.45 Belinostat'ın U87MG hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi. ....	107
Şekil 4.46 Belinostat'ın U87MG hücrelerinde Bik gen ekspresyonu üzerine olan etkisi. ....	107
Şekil 4.47 Belinostat'ın U87MG hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.....	108
Şekil 4.48 Belinostat'ın U373 hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi. ....	109
Şekil 4.49 Belinostat'ın U87MG hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.....	109
Şekil 4.50 Romidepsin'in T98G hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi. ....	110
Şekil 4.51 Romidepsin'in T98G hücrelerinde Bik gen ekspresyonu üzerine olan etkisi. ....	111
Şekil 4.52 Romidepsin'in T98G hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.....	111
Şekil 4.53 Romidepsin'in U87MG hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi.....	112
Şekil 4.54 Romidepsin'in U87MG hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.....	113
Şekil 4.55 Romidepsin'in U373 hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi. ....	114
Şekil 4.56 Romidepsin'in U373 hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.....	114
Şekil 4.57 Bradforda yöntemi sonucu standartlara yönelik çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği.....	116
Şekil 4.58 Belinostat ve Romidepsin'in T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarında kaspaz-9, kaspaz-8, Bax, Bcl-2 proteinlerin ekspresyonuna olan etkisi. ....	117

## TABLOLAR DİZİNİ

### Sayfa

Tablo 2.1 IDH-yabanıl tip ve IDH-mutant GBM'lerin karakteristik özellikleri.....	13
Tablo 2.2 Primer ve sekonder GBM'de meydana gelen epigenetik ve genetik farklılıklar .....	15
Tablo 2.3 Histon deasetilaz ailesi.....	37
Tablo 2.4 HDACi sınıfları ve bu sınıflara ait üyeler.....	39
Tablo 3.1 HDACi'lerin moleküler ağırlıkları, ana ve çalışma stok konsantrasyonları....	46
Tablo 3.2 GBM ve BJ hücre hatları için belirlenen TRAIL konsantrasyonları.....	48
Tablo 3.3 FITC Anneksin V / PI boyamasına göre hücrelerin analizi. ....	51
Tablo 3.4 cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	55
Tablo 3.5 cDNA sentezi için revers transkriptaz reaksiyon karışımı. ....	55
Tablo 3.6 Gerçek-zamanlı PCR yöntemi için gerekli reaksiyon karışımı.....	56
Tablo 3.7 Çalışmamızda kullanılan genlere ait primerler ve ilgili sekansları. ....	57
Tablo 3.8 Gerçek-zamanlı PCR çalışması için reaksiyon koşulları.....	59
Tablo 3.9 %11'lik Seperating jel hazırlanışı.....	62
Tablo 3.10 Stacking jel (%5) hazırlanışı. ....	62
Tablo 4.1 Vorinostat'ın GBM hücreleri üzerindeki IC <sub>50</sub> (µM) değerleri. ....	93
Tablo 4.2 MS-275'in GBM hücreleri üzerindeki IC <sub>50</sub> (µM) değerleri. ....	94
Tablo 4.3 CBHA'nın GBM hücreleri üzerindeki IC <sub>50</sub> (µM) değerleri. ....	95
Tablo 4.4 Belinostat'ın GBM hücreleri üzerindeki IC <sub>50</sub> (µM) değerleri.....	96
Tablo 4.5 Romidepsin'in GBM hücreleri üzerindeki IC <sub>50</sub> (µM) değerleri.....	97
Tablo 4.6 Bradford yöntemi sonucu üç hücre hattında kontrol, Belinostat ve Romidepsin gruplarına ait protein konsantrasyonları. ....	116

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa.....	Aminoasit
AIF.....	Apoptoz İndükleyici Faktör
APAF-1.....	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APS.....	Amonyum Persülfat
ATP.....	Adenozin Tri Fosfat
ATRX.....	X-bağımlı alfa Talasemi/Mental Retardasyon Sendromu
Bak.....	Bcl-2 antagonist/öldürücü 1
Bax.....	Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2.....	B Hücreli Lenfoma-2
BH.....	Bcl-2 Homoloji Domaini
Bid.....	BH-3 ilişkili Domain Ölüm Agonisti
Bim.....	Bcl-2 ile etkileşen protein
Bok.....	Bcl-2 ilişkili Ovaryan Öldürücü
CAD.....	Kaspaz ile Aktive olan DNaz
CDK.....	Siklin Bağımlı Kinaz
cDNA.....	Komplementer DNA
c-FLIP.....	HücreSEL FLICE İnhibitör Proteini
ciAP.....	HücreSEL-ilişkili Apoptoz İnhibitör Proteini
DcR.....	Decoy Reseptörü
DD.....	Ölüm Domaini
DED.....	Ölüm Efektör Domaini
DIABLO.....	Düşük PI'de Direk IAP Bağlanan Protein
DISC.....	Ölüm İndükleyen Sinyal Kompleksi
DNA.....	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ.....	Dünya Sağlık Örgütü
Endo G.....	Endonükleaz G
EGFR.....	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ER.....	Endoplazmik Retikulum
FADD.....	Fas ilişkili Ölüm Domaini
FasL.....	Fas Ligandı
FBS.....	Fetal Dana Serumu
GALNT14.....	N-asetilgalaktozaminiltransferaz 14
GBM.....	Glioblastoma Multiforme
G-CIMP.....	Glioma CpG Adası Metilatör Fenotipi
HDAC.....	Histon deasetilaz
HDACi.....	Histon Deasetilaz İnhibitörü
HDM2.....	İnsan double minute 2
HRP.....	Horseradish Peroksidaz
hTERT.....	İnsan Telomeraz Revers Transkriptaz
IAP.....	Apoptoz İnhibitör Protein
IARC.....	Uluslararası Kanser Ajansı
IDH.....	İzositrat Dehidrojenaz
kb.....	Kilobaz
LOH.....	Heterozigotluk Kaybı
lt.....	Litre
MDM-2.....	Fare double minute-2
miRNA.....	Mikro RNA
MGMT.....	O <sup>6</sup> -metilguanin-DNA metiltransferaz
ml.....	Mililitre
mM.....	Milimolar
MMP.....	Matriks Metalloproteinaz
MOM.....	Mitokondri Dış Membranı
MOMP.....	Mitokondriyal Dış Membran Permeabilizasyonu
mRNA.....	Mesajcı Ribo Nükleik Asit

ng.....	Nanogram
OPG.....	Osteoprotegerin
PAGE.....	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR.....	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGFRA.....	Platelet Kökenli Büyüme Faktör Reseptörü A
PI3K.....	Fosfotidilinositol 3-Kinaz
PRB1.....	Retinoblastom Yatkinlık Lokusu Proteini 1
PTEN.....	Fosfataz ve Tensin Homolog
PVDF.....	Poliviniliden diflorid
PUMA.....	Apoptozun p53 upregüle Edici Modülatörü
SDS.....	Sodyum Dodesil Sülfat
SMAC.....	Mitokondriden Türemiş Kaspaz İnhibitörü
TMZ.....	Temozolomid
TNF.....	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR.....	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TNFSF.....	Tümör Nekrozis Faktör Süper Ailesi
TP53.....	Tümör Protein p53
TRAIL.....	Tümör Nekrozis Faktör İlişkili Apoptoz İndükleyen Ligand
XIAP.....	X-ilişkili Apoptoz İnhibitör Protein
VEGF.....	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
µg.....	Mikrogram
µl.....	Mikrolitre
µM.....	Mikromolar

## 1. GİRİŞ

Kanser başlıca onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genlerinde meydana gelen genetik veya epigenetik değişimlerin birikmesinin sonucu olarak ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Bununla birlikte, hücre döngüsü kontrol noktalarındaki aksaklıklar ve apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar da birçok kanser türünde önemli rol oynamaktadır. Birleşik Devletlerde, 2017 yılı itibariyle 1.688.780 yeni kanser olgusu teşhis edilmiş ve bu olguların 600.920'si yaşamını yitirmiştir. Ülkemizdeki en son alınan resmi rakamlara göre, bir yılda 96.213 erkek ve 67.203 kadın olmak üzere yaklaşık 163.500 kişi kanser teşhisi almıştır. Önümüzdeki 20 yılda kanserden dolayı meydana gelecek ölüm oranının %70 oranında artması ve 2030 yılında yaklaşık olarak 22 milyon kişinin kanser vakası olarak tanımlanması beklenmektedir.

Glioblastoma multiforme (GBM), başlıca serebral hemisferde yerleşim gösteren, genellikle yetişkinlerde görülen en sık ve en malign beyin tümörüdür. Multiforme teriminin kullanılmasının nedeni; bu tip tümörün klinik gösterimi, patolojisi, genetik işareti ve tedaviye cevap vermesi açısından heterojenlik göstermesinden dolayıdır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından Evre IV astrositroma olarak sınıflandırılmıştır. Hızlı ilerleme (progresyon) göstermesi, normal dokuya infiltre olması, genetik olarak kararsız oluşu, radyoterapi ve kemoterapiye karşı dirençli olması nedeniyle en kötü prognoza sahip olan kanserlerden birisidir. GBM; ameliyat, radyoterapi, Temozolomid (TMZ) gibi agresif tedavi yöntemleri olmasına rağmen, toplam sağkalım süresi 14.6 ay olan, çok zayıf bir prognoza sahiptir. Bu nedenle, GBM hastaları için yeni tedavi yaklaşımlarının tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.



TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand (TRAIL veya Apo2L), TNF süperailisinin bir üyesidir. TRAIL, T ve B lenfositleri, Doğal Öldürücü (NK) hücreler, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi immün sistem hücrelerinin yüzeylelerinde bulunur ve buralardan spesifik metalloproteinazlarla kesilerek, hücreler arası sıvıya çözünebilir bir formda salınarak biyolojik aktivitesini gösterir. TRAIL-indüklü ekstrinsik apoptoz yolağı, homotrimerik TRAIL'in TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörlerine bağlanmasıyla birlikte başlamaktadır. Meme, prostat, ovaryum, akciğer, multiple miyelom, lösemi, nörolastom ve GBM'i içeren çeşitli kanser tiplerinin TRAIL tarafından indüklenen apoptoza dirençli olduğu görülmüştür.

Efektif kanser terapötikleri için, normal hücrelerde herhangi bir değişim olmadan, özellikle malign tümör hücrelerinde apoptozu indüklemek çok önemli bir stratejidir. TRAIL birçok tümör hücresinde apoptozu indüklemesi fakat normal hücrelere minimal toksisite göstermesi ya da göstermemesi yönüyle önemli bir özelliğe sahiptir. Bu özelliği nedeniyle, TRAIL kanser tedavisi için ilgi çekici bir adaydır. Meme, prostat, ovaryum, akciğer, multiple miyelom, lösemi, nöroblastom ve glioblastomayı içeren çeşitli kanser tiplerinin TRAIL tarafından indüklenen apoptoza dirençli olduğu görülmüştür. TRAIL'in kontrol hücrelerinde apoptozu indüklemeden, seçici olarak kanser hücrelerinin apoptozuna neden olması GBM için aday bir tedavi yöndemi olarak düşünülmektedir. TRAIL-dirençli hücreleri apoptoza duyarlı hale getirmek için proteozom inhibitörleri, histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi), fosfotidilinositol 3-kinaz/Protein Kinaz B (PI3K/AKT) inhibitörleri, ikincil mitokondri kökenli kaspaz aktivatör (SMAC) taklitçileri, anti-CD20, konvansiyonel kemoterapi ve radyoterapi gibi birtakım terapötik ajanlar geliştirilmiştir. TRAIL duyarlılığını indüklemek, TRAIL ve TRAIL reseptörlerinin endojen ekspresyonunu yeniden sağlamak, gelecekte uygulanacak terapiler için uygun bir strateji olarak gözükmektedir.

Hücre döngüsünün durdurulması, farklılaşma, yaşlanma, intrinsik ve ekstrinsik apoptoz, mitotik hücre ölümü, otofajik hücre ölümü, reaktif oksijen türlerinin üretiminin indüklenmesi ve anjiyogenez, metastaz, tümör immünitesinin inhibisyonuna neden olmalarından dolayı HDACi'ler efektif terapötik anti-kanser ajanı olarak düşünülmektedir. HDACi'lerin normal hücrelerden ziyade tranforme olmuş hücrelere seçicilik gösterdiği rapor edilmiştir. Kanser hücrelerindeki bu farklı etkiler, HDACi'lerin tek ya da diğer terapilerle kombine olarak uygulanması yönünden çokça ilgi çekmektedir. GBM'in de

içinde bulunduğu farklı tümör tiplerinin tedavisi için, HDAC inhibitörlerinin tekli ve diğer ajanlarla kombine uygulaması deneme aşamasındadır.

### **1.1. Amaç**

Bu çalışmadaki amacımız; Vorinostat, MS-275, CBHA, Belinostat ve Romidepsin HDACi'lerinden, TRAIL-aracılı ölümü en iyi şekilde arttıran 2 HDACi'yi belirlemek ve bu 2 HDACi'nin tek başına GBM hücrelerinde apoptotik yolak üzerindeki etkilerini araştırmak, GBM'de alternatif bir tedavi uygulaması için bu HDACi'lerin etkinliğini belirlemektir.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

Kanser modern yaşamın en önemli hastalıklarından birisidir. Dünya popülasyonunda en sık karşılaşılan hastalık olması ve aynı zamanda da en sık ölüm nedenleri arasında yer alması nedeniyle, kanser önemli bir halk sağlığı problemi olarak devam etmektedir. Günümüzde teknolojik ilerlemelerle birlikte önemli bir yol kat edilmiş olmasına rağmen, kanser oluşumu hakkında hala aydınlatılmayan birçok nokta bulunmaktadır. Bu nedenle, birçok ülkede bilim stratejisi olarak kanser araştırmalarına büyük bütçeler ayrılmakta ve bu hastalık hakkında birçok nokta aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Elmas 2011).

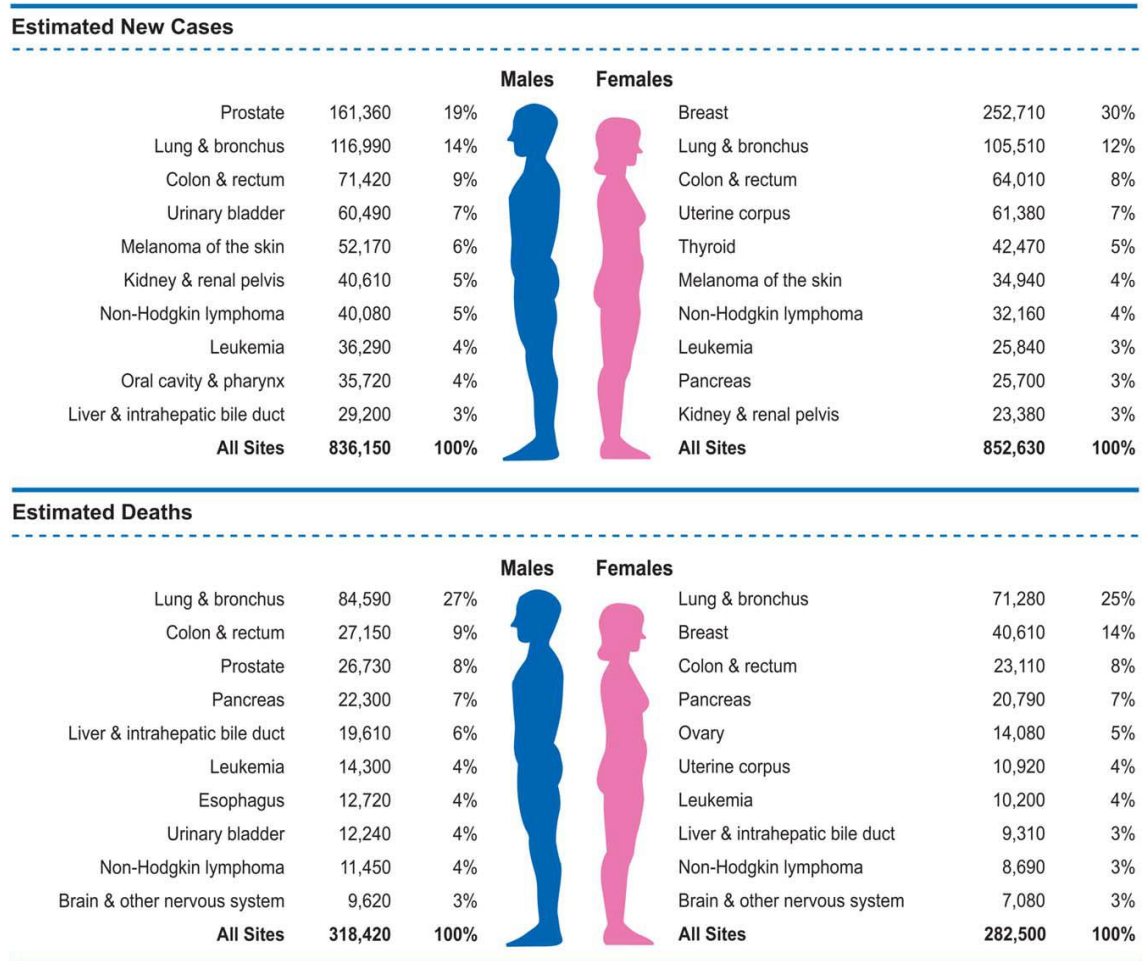
Kanser başlıca onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genlerinde meydana gelen genetik veya epigenetik değişimlerin birikmesinin sonucu olarak ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Bununla birlikte, hücre döngüsü kontrol noktalarındaki aksaklıklar ve apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar da birçok kanser türünde önemli rol oynamaktadır (Elmas 2011). Kanser kontrol edilemeyen hücre büyümesi, invazyon ve anormal hücrenin yayılımı ile karakterize olan bir grup hastalıktır (American Cancer Society 2017). Yüzden fazla türü bulunan kanser, bir hücrenin anormal çoğalması sonucu olduğundan, bu anormallikten meydana gelecek tümör patolojik açıdan benign ya da malign karakterde olabilir. Benign adı verdiğimiz iyi huylu tümörler, buldukları yerde lokal olarak kalarak vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar. Diğer taraftan, kötü huylu dediğimiz malign tümörler bulunduğu yere yakın olan dokulara veya kan ve lenf dolaşımını kullanarak vücudun uzak yerlerine yayılma potansiyeline sahiptirler (Cooper ve Hausman 2016). Kanserler sınıflandırılırken, köken aldıkları hücreye baz alınarak sınıflandırılırlar. Kanserleri başlıca karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar olmak üzere 3 başlık altında toplamak mümkündür. Epitel hücrelerden köken alan karsinomlar kanserlerin %90'ını oluşturmaktadır. Bağ dokudan (kas, kemik, kıkırdak ve

fibröz doku) köken alan solid tümörler sarkomlar adını alır ve bunlar genellikle insanda az görülürler. Üçüncü grup olan lösemi ve lenfomalar, kan ve immün sistem hücrelerinden köken alırlar ve insanda gözükken kanserlerin %8'ini oluştururlar (Cooper ve Hausman 2016). Kanserde, benign karakterden malign karaktere dönüşmek çok aşamalı bir süreçtir ve tek bir hücre uzun zaman boyunca mutasyonlar geçirerek çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri artar. Bu sayede bu özellikler yönünden hücre popülasyonunda baskın hale gelme durumu klonal seçilim olarak adlandırılır. Tümörler, monoklonal ve poliklonal olarak klonalite durumlarına göre sınıflandırılabilir (Weinberg 2007).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nden elde edilen verilere göre; kanser dünya çapında görülen hastalıkların ve ölüm nedenlerinin başında gelmektedir ve 2012 yılında 14 milyon yeni kanser vakası tanımlanmıştır (Ferlay vd 2013, Forman vd 2014, WEB\_1). Dünya çapındaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan kanser, 2015 yılında 8.8 milyon kişinin ölümünden sorumlu olmuştur. Global olarak 6 ölümden birinin kanser nedeniyle meydana geldiği gözükmektedir. Dünya genelinde 2015 verilerine bakıldığında en çok tanı konulan kanser türleri sırasıyla akciğer, karaciğer, kolorektal, mide ve meme kanserleridir (WEB\_1). Erkekler arasında en sık görülen 5 kanser tipi; akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer iken, kadınlarda en sık görülen 5 kanser tipi sırasıyla meme, kolorektal, akciğer, serviks ve mide kanserleridir (Forman vd 2014). Önümüzdeki 20 yılda kanserden dolayı meydana gelecek ölüm oranının %70 oranında artması ve 2030 yılında yaklaşık olarak 22 milyon kişinin kanser vakası olarak tanımlanması beklenmektedir (Hacıkamiloğlu vd 2017, WEB\_1). Kanser olgularının yaklaşık olarak %70'i az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmektedir. Meydana gelen ölümlerin 3'de 1'i 5 ana davranış ve diyet riskinden doyalıdır. Bu riskler; yüksek vücut kitle indeksi, düşük meyve ve sebze tüketimi, fiziksel aktivite yokluğu, tütün ürünleri ve alkol kullanımınıdır. Bununla birlikte tütün ürünleri kullanımı kansere bağlı ölümlerin %22'sinden sorumlu iken, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde hepatit ve insan papilloma virüs (HPV) gibi enfeksiyonlar da kanser vakalarının %25'e yakınından sorumludur (WEB\_1).

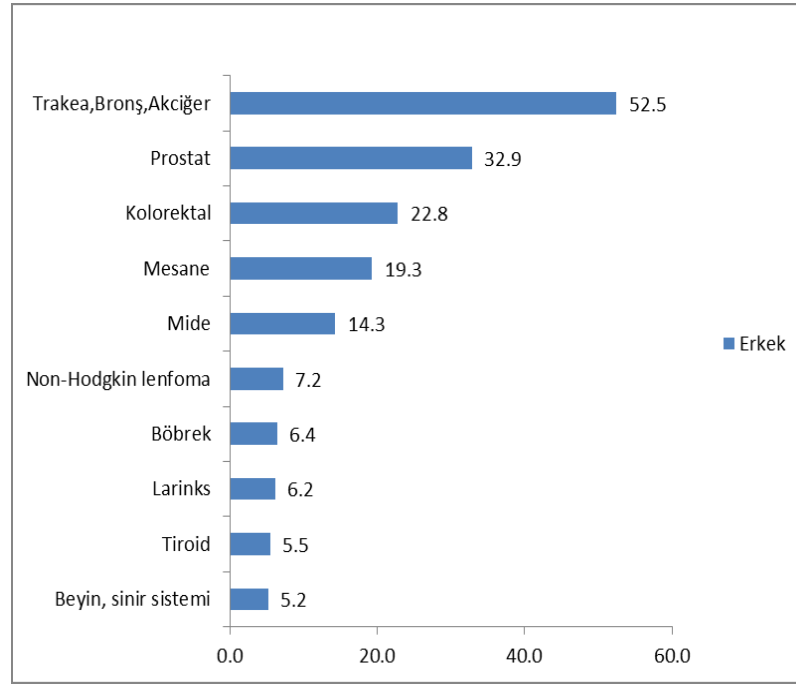
Birleşik Devletler'de kanser başlıca gözükken sağlık problemidir ve ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. 2017 yılı itibariyle 1.688.780 yeni kanser olgusu teşhis edilmiş ve bu olguların 600.920'si yaşamını yitirmiştir. Kanser insidansının erkeklerde kadınlara göre %20 oranında daha yüksek olduğu, aynı şekilde kanser ölüm oranının yine

erkeklerde %40 oranında daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, cinsiyet farklılıkları kanser tipine göre değişiklik göstermektedir. Elde edilen verilere göre; Birleşik Devletler’de yeni teşhis edilen kanser tipi açısından bakıldığında, erkeklerde 836.150 olguda görülen ilk beş kanser tipi prostat (%19), akciğer (%14), kolon (%9), mesane (%7) ve melanomlardır (%6): Kadınlarda ise 852.630 olguda ilk beş kanser tipi sırasıyla meme (%30), akciğer (%12), kolon (%8), uterus (%7) ve tiroid (%5) kanserleridir. Ölümler açısından değerlendirildiğinde ise, erkekler akciğer, kolon, prostat, pankreas ve akciğer, kadınlarda ise akciğer, meme, kolon, pankreas ve ovaryum kanserleri sırasıyla ilk beş sırayı oluşturmaktadır (Şekil 2.1) (Siegel vd 2017).

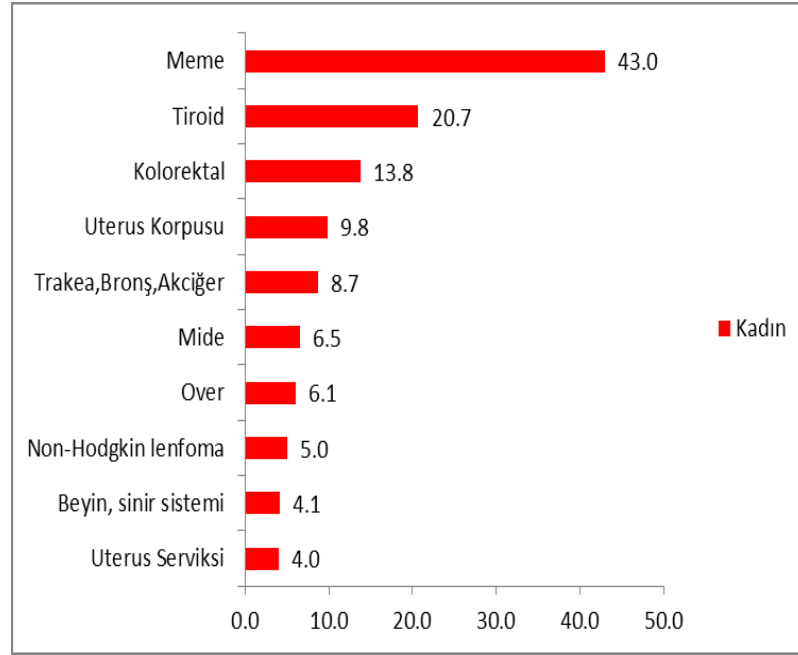


**Şekil 2.1** Birleşik Devletler’de 2017 yılında görülen on ana kanser türünün ve ölüm oranlarının cinsiyete göre dağılımları (Siegel vd 2017).

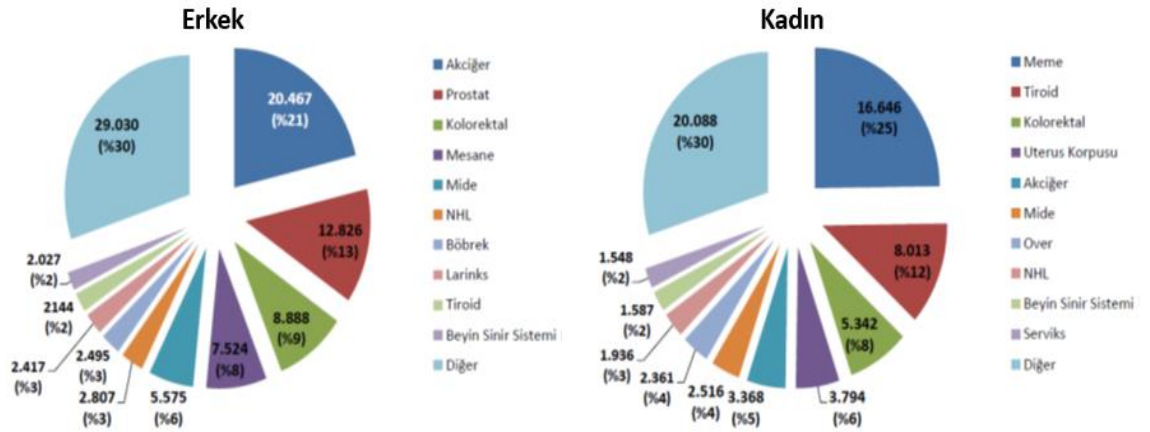
Ülkemiz açısından bakıldığında, kansere ait verileri Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2017 yılında yayınlamış olduğu "Türkiye Kanser İstatistikleri" raporundan öğrenmekteyiz. Bu rapordaki veriler 2014 yılını kapsamaktadır, buna göre; erkeklerde akciğer, prostat, kolorektal, mesane ve mide, kadınlarda ise meme, tiroid, kolorektal, uterus ve akciğer en sık görülen ilk 5 kanser tipidir (Şekil 2.2 ve 2.3) (Hacıkamiloğlu vd 2017). Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2012 verilerine göre de erkek ve kadınlarda görülen en sık kanser tipleri ülkemizdeki raporla aynıdır (Ferlay vd 2013). Ülkemizdeki en son alınan resmi rakamlara göre, bir yılda 96.213 erkek ve 67.203 kadın olmak üzere yaklaşık 163.500 kişi kanser teşhisi almaktadır (Şekil 2.4). Yaşa göre standardize edilmiş kanser hızı erkeklerde 246,8/100.000 iken, kadınlarda 173,6/100.000'dir. Son beş yılın verilerine bakıldığında kanser insidansında herhangi bir artış ya da azalış görülmemektedir. Türkiye kanser sıklığı açısından Avrupa Birliği Ülkeleri ve Amerika gibi ülkelere göre daha düşüktür (Hacıkamiloğlu vd 2017).



**Şekil 2.2** Ülkemizde erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Hacıkamiloğlu vd 2017).



**Şekil 2.3** Ülkemizde kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Hacıkamiloğlu vd 2017).



**Şekil 2.4** Türkiye’de erkek ve kadınlarda en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımları (Hacıkamiloğlu vd 2017).

## 2.1. Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri, beyin dokusundaki hücrelerin anormal çoğalması sonucu oluşmaktadır ve fenotipik olarak malign ve benign formda gözükmektedir. Birleşik Devletlerde, 2017 yılı verilerine göre, beyin ve diğer sinir sistemi kanserleri bakımından 23,800 olguya teşhis konmuş ve bu olguların 16.700'ü yaşamını yitirmiştir (Siegel vd 2017). Tüm kanserlerin %1.4'ünü oluşturan beyin tümörleri, kansere bağlı ölümlerin %2.8'inden sorumludur (WEB\_2).

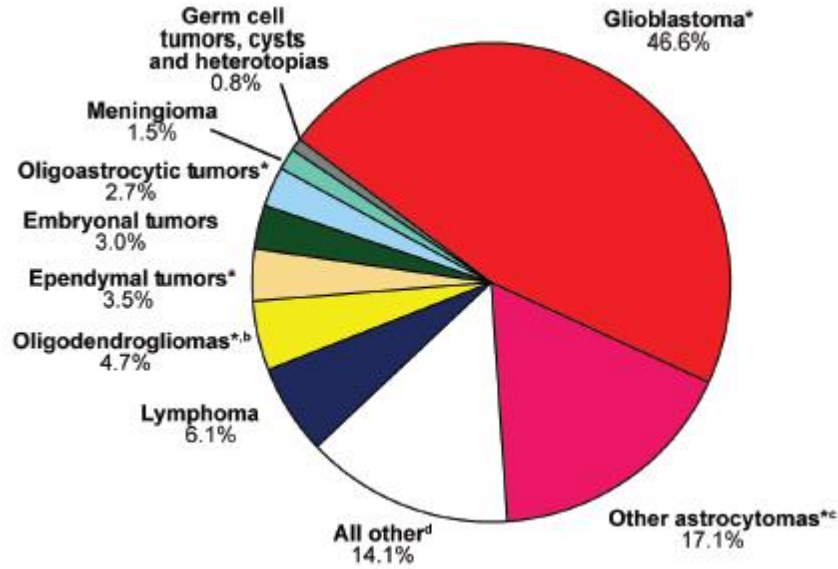
Beyin tümörlerinin sınıflandırılması hakkında ilk görüş 1863 yılında bir patolog olan Rudolf Virchow tarafından yapılmıştır. Harvey Cushing ve ark. 1926 yılında beyin tümörleri için şu an kullanılan terimlerin tanımını yapmışlardır. Beyin tümörlerinin evrelemesi James Watson Kernohan ve ark. tarafından 1949 yılında ilk kez ortaya atılmıştır. Zülch ve arkadaşları 1979 yılında, Cushing Bailey ve Kernohan'ın terminolojisi kullanarak, DSÖ tabanlı ilk sınıflandırmayı yapmışlardır. Beyin tümörlerinin 1993 yılında DSÖ tarafından ikinci, 2000 yılında üçüncü ve 2007 yılında dördüncü baskısı yayınlanmıştır (Louis vd 2007, Sarkar vd 2009). Yayınlanmış tüm bu sınıflandırmalar hücre orijinlerine ve farklılaşma seviyelerinin mikroskopik olarak incelenmesi sonucu histolojik olarak gerçekleştirilmiştir (Louis vd 2016, Banan ve Hartmann 2017). Teknoloji ile birlikte genetik bilgi akışının artması sonucu, beyin tümörleri genetiği hakkında yeni bilgiler elde edilmesiyle birlikte yeni bir sınıflandırmanın yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, 2016 yılında genetik veriler ışığında DSÖ tarafından merkezi sinir sistemi tümörlerinin beşinci baskısı yayınlanmıştır (Louis vd 2016).

Malign beyin tümörleri, sadece kötü prognozlarından dolayı değil, aynı zamanda yaşam kalitesinde ve bilişsel fonksiyonlardaki direkt etkileri nedeniyle en korkulan kanser türleri arasındadır (Omuro ve DeAngelis 2013). Beyin tümörleri, primer ve sekonder tümörler olarak sınıflandırılmaktadır. Primer beyin tümörleri glial dokudan, nöronlardan, meninkslerden, damarlardan veya endokrin hücrelerden köken almaktadır (Bayram 2012).

Gliomlar, primer beyin tümörlerinin en yaygın tipidir ve destekleyici glial dokudan köken alan nöroepitelyal tümörlerdir (Sarkar vd 2009, Bayram 2012, Omuro ve DeAngelis 2013). Beyin tümürlü hastaların %81'inde malign gliomlar gözükmektedir ve



yıllık insidansı 3.9/100.000 olarak hesaplanmıştır (Ostrom vd 2016). Ülkeler arasında belirgin bir farklılık gözükmesi gelişmiş teşhis yöntemlerine bağlı olarak, gelişmiş ülkelerde insidans daha yüksektir. Her yıl yaklaşık 17.000 yeni olguya malign gliom teşhisi konmaktadır (Omuro ve DeAngelis 2013). Tüm malign beyin tümörlerin en sık gözleneni %46.6 ile glioblastomadır(Şekil 2.5) (Ostrom vd 2016).



**Şekil 2.5** Malign primer beyin tümörlerinin dağılımı (Ostrom vd 2016).

Gliomalar oligodendrositler ve astrositler olmak üzere iki farklı hücre tipinden köken almaktadır. Gliomaların çoğu, beynin frontal, temporal, pariyetal ve oksipital lobunda meydana gelmektedir ama çok az bir kısmı da beynin dışında meydana gelmektedir (Ostrom vd 2016). DSÖ, gliomaları farklılaşmanın, anaplazinin ve agresifliğin derecesine bağlı olarak 4 histolojik alt tipe ayırmıştır (Louis vd 2007). Bunlar; astrositromalar, oligodendrogliomalar, ependimomlar ve oligo-astrocitromalardır (karışık gliomalar) (Louis vd 2007, Jovcevska vd 2013). Bu alt tipler, malignite derecelerine göre evrelendirilmiştir. Buna göre; oligodendrogliomalar ve oligo-astrocitromalar Evre I ve Evre II olarak evrelendirilirken, astrositromalardan pilositik astrositroma Evre I, diffüz astrositroma Evre II, anaplastik astrositroma Evre III olarak, glioblastoma multiforme (GBM) ise Evre IV olarak evrelendirilmiştir (Durmaz ve Vural 2007, Jovcevska vd 2013).

## 2.2. Glioblastoma multiforme (GBM)

GBM, başlıca serebral hemisferde yerleşim gösteren, genellikle yetişkinlerde görülen en sık ve en malign beyin tümürüdür (Durmaz vd 2007, Sarkar vd 2009). Multiforme teriminin kullanılmasının nedeni; bu tip tümörün klinik gösterimi, patolojisi, genetik işareti ve tedaviye cevap vermesi açısından heterojenlik göstermesinden dolayıdır (Iacob ve Dinca 2009). DSÖ tarafından Evre IV astrositroma olarak sınıflandırılmıştır (Bayin vd 2014). Hızlı ilerleme (progresyon) göstermesi, normal dokuya infiltrate olması, genetik olarak kararsız oluşu, radyoterapi ve kemoterapiye karşı dirençli olması nedeniyle en kötü prognoza sahip olan kanserlerden birisidir (Ramirez vd 2013). GBM, diğer kanserler gibi, kendi kendine çoğalma, apoptotik uyarıma direnç gösterme, dışsal büyüme kontrolünden ve immün gözetimden kaçınma, dokuya invazyon gerçekleştirme, yeni kan damarları oluşturma ve devam ettirme yeteneği gibi karakteristik malign fenotipler sergilemektedir (Sathornsumetee ve Rich 2008).

GBM başlıca beyinde geliştiğinden, hemisferlerde, beyin sapında ve serebellumda yerleşim göstermektedir. En sık tutulum gösterdiği yer frontal, en az tutulumun olduğu bölge ise oksipital lobdur. Normal doku ile ayırt edilememesinin nedeni beyin içerisine infiltrate olarak gelişmesinden dolayıdır. Serebrospinal sıvı veya kan yolu ile metastazı nadiren gerçekleşir ve dalak, plevra, akciğerler, lenf nodları, akciğer, kemikler, pankreas ve ince bağırsak gibi organları hedeflemektedir (Urbanska vd 2014).

Hastalığın klinik belirtilerine bakıldığında, semptomlar her ne kadar hızlı olarak meydana gelse de, tümörün belirli bir seviyeye erişmesine dek hastalık asemptomatik olarak seyretmektedir. Semptomlar, tümörün patolojik özelliklerinin yanında daha çok tümörün konumu ile alakalıdır (Krakstad ve Chekenya 2010). Tümörün lokalizasyonu ve intrakranyal baskıya bağlı olarak, GBM'in en yaygın belirtileri baş ağrısı, ataksi, baş dönmesi, görme bozuklukları (bulanık görme, çift görme), sık sık bayılma, kusma, hafıza kaybı, fokal nörolojik eksiklikler, konfüzyon ve kişilik değişiklikleridir (Wen ve Kesari 2008, Urbanska vd 2014). Bu spesifik olmayan semptomlardan dolayı, çoğunlukla enfeksiyon, inflamatuvar süreçler, dolaşımsal ve immünolojik hastalıklar olarak tanımlanarak hastalığa yanlış teşhis konmaktadır. Daha önce epilepsi teşhisi konmamış insanlarda kriz ya da hastalık nöbetlerinin meydana gelmesi glioblastoma şüphesinden dolayı nörolojik görüntüleme için bir belirteç olabilmektedir (Urbanska vd 2014). GBM

teşhisi genellikle manyetik rezonans görüntüleme veya bilgisayarlı tomografi yöntemleri ile yapılmaktadır (Wen ve Kesari 2008).

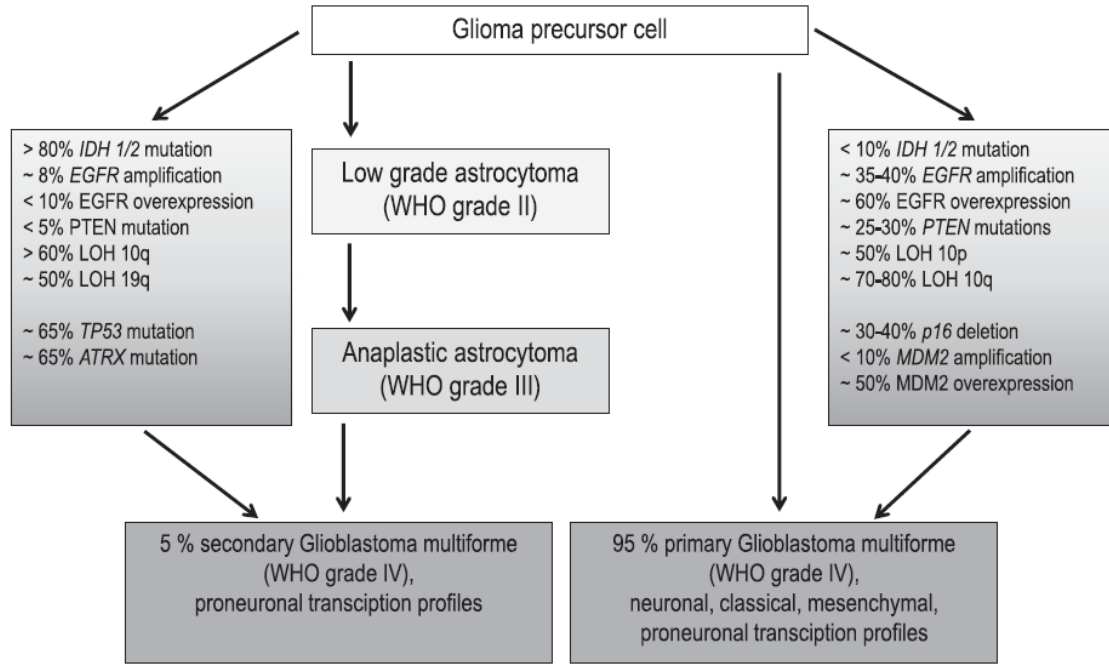
DSÖ'nün 2007 yılında, tümör tipi ve histolojik evrelemeye dayanan mikroskopik kriterleri baz alarak yapmış olduğu sınıflandırmaya göre; GBM'ler nöroepitelyal doku tümörlerinin bir alt grubu olan astrositik tümörler içerisinde dev hücreli glioblastoma ve gliosarkom olarak sınıflandırılmıştır (Louis vd 2007). Yeni-nesil sekanslama ve mikroarray tabanlı analizler gliomaların karakteristik genetik ve epigenetik profillerini ortaya çıkartmıştır (Malzkom ve Reifenberger 2016). DSÖ'nün genetik ve epigenetik olarak açığa çıkan gelişmeleri temel alarak, 2016 yılında yapmış olduğu merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılmasına göre GBM'ler; primer ve de novo olarak 55 yaş üzerinde ortaya çıkan "izositrat dehidrogenaz (IDH)-yabanıl tip" (olguların %90'ı), olguların %10'unu oluşturan, genellikle genç olgularda meydana gelen ve sekonder GBM olarak adlandırılan "IDH-mutant tip" ve IDH mutasyonu bulunmayan "GBM-NOS" (not otherwise specified) olarak 3 gruba ayrılmıştır (Louis vd 2016). IDH-yabanıl tip ve IDH-mutant GBM'lerin karakteristik özellikleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Glioblastomalar klinik karakteristiklerine ve genetik özelliklerine göre "primer" ve "sekonder" tümörler olmak üzere ikiye ayrılırlar (Jovcevska vd 2013, Chang vd 2014, Olar ve Aldape 2014). Her iki grupta glial öncü hücrelerden doğrudan gelişen tümörlerdir (Durmaz vd 2007). GBM olgularının büyük çoğunluğunu (~%90) primer glioblastoma oluşturur ve bir öncül lezyon bulgusu olmadan *de novo* olarak ortaya çıkmaktadır. Genellikle 50 yaş üzerindeki daha yaşlı hastalarda gözlenmektedir. Sekonder glioblastomalar ise düşük dereceli astrositroma (II. Derece) ya da anaplastik astrositromalardan (III. Derece) yavaş progresyonla gelişirler ve daha genç yaşta hastalarda (<45) daha yaygın gözükmektedir (Durmaz vd 2007, Ramirez vd 2013, Ohgaki ve Kleihues 2013, Chang vd 2014, Aldape vd 2015). Düşük dereceli astrositromanın glioblastoma dönüşme süresi yaklaşık 5 yıl iken, anaplastik astrositromanın glioblastoma doğru gelişmesi 2 yıldır (Olar ve Aldape 2014). Primer ve sekonder GBM'ler morfolojik yönde ayırt edilemezler ve hasta yaşına bakılmaksızın kötü prognoza sahiptirler. Her iki tipte de moleküler düzeyde farklı genetik anomaliler görülmektedir (Sarkar vd 2009) (Şekil 2.6).

**Tablo 2.1** IDH-yabanıl tip ve IDH-mutant GBM'lerin karakteristik özellikleri (Louis vd 2016).

	<b>IDH-yabanıl tip GBM</b>	<b>IDH-mutant GBM</b>
<b>Sinonim</b>	Primer glioblastoma	Sekonder glioblastoma
<b>Öncü lezyon</b>	Teşhis edilemez De novo olarak gelişir	Diffüz astrositroma Anaplastik astrositroma
<b>GBM'deki dağılımı</b>	~ %90	~ %10
<b>Teşhiste ortalama yaş</b>	~ 62	~ 44
<b>Erkek : Kadın oranı</b>	1.42 : 1	1.05 : 1
<b>Klinik öykü uzunluğu</b>	4 ay	15 ay
<b>Ortalama sağkalım</b>		
C* + RT*	9.9 ay	24 ay
C + RT + KT*	15 ay	31 ay
<b>Konumu</b>	Supratentoryal	Öncelikle frontal
<b>Nekroz</b>	Geniş	Sınırlı
<b><i>TERT</i> promotor mutasyonu</b>	%72	%26
<b><i>TP53</i> mutasyonu</b>	%27	%81
<b><i>ATRX</i> mutasyonu</b>	Nadir	%71
<b><i>EGFR</i> amplifikasyonu</b>	%35	Nadir
<b><i>PTEN</i> mutasyonu</b>	%24	Nadir

\*C: Cerrahi tedavi, RT: Radyoterapi, KT: Kemoterapi.



**Şekil 2.6** GBM gelişiminde meydana gelen genetik değişimler (von Neubeck 2015).

### 2.2.1. GBM Genetiği ve Moleküler Belirteçleri

GBM'ler DSÖ evre IV olarak tanımlanmıştır ve genetik olarak heterojeniteye sahiptirler. GBM'de O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA metiltransferaz (*MGMT*) promotörünü metilasyonu, izositrat dehidrogenaz enzim 1/2 (*IDH1/2*) mutasyonu, epidermal büyüme faktör reseptörü (*EGFR*) overekspresyonu ve amplifikasyonu, glioma-CpG adası metilatör fenotipi (*G-CIMP*), tümör protein (*TP53*) mutasyonu ve kromozomların genetik olarak kaybını içeren çeşitli prognostik faktörler tanımlanmıştır (Thakkar vd 2014).

Primer GBM'ler *EGFR* overekspresyonu, fosfataz ve tensin homolog geni (*PTEN*) mutasyonları, kromozom 10q'nun heterozigotluk kaybı (LOH), p16 delesyonları, fare double-minute 2 (*MDM2*) amplifikasyonu, yüksek sıklıkta telomeraz revers transkriptaz (*hTERT*) promotör mutasyonları ve *IDH1* mutasyonunun yokluğu gibi genetik altyapıya sahiptir (Ohgaki ve Kleihues 2007). Sekonder GBM'in genetik özelliği ise TP53, X-bağımlı alfa talasemi/mental retardasyon sendromu (*ATRX*) ve *IDH1* mutasyonları ve kromozom 10q'da LOH'dur. Bu grupta ayrıca, platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A (*PDGFRA*), *PDGFRA* ligandında genetik değişiklikler, p16, retinoblastom yatkınlık lokusu protein 1 (*PRB1*) genlerinde mutasyon, siklin bağımlı kinaz 4/6 (*CDK 4/6*), insan double-minute 2 (*HDM2*)'de amplifikasyon ve 19q'da LOH görülmektedir.

(Sathornsumetee ve Rich 2008, Sarkar vd 2009). Primer ve sekonder Glioblastomalarda meydana gelen epigenetik ve genetik değişimler Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.2** Primer ve sekonder GBM'de meydana gelen epigenetik ve genetik farklılıklar (Crespo vd 2015).

	Primer GBM (%95), %	Sekonder GBM (%5), %
<b>Promotor metilasyonu</b>		
<i>MGMT</i>	36	75
<i>TIMP-3</i>	28	71
<i>RB</i>	14	43
<i>CDKN2A-p14<sup>ARF</sup></i>	6	31
<i>CDKN2A-p16<sup>INK4a</sup></i>	3	19
<b>Genetik değişimler</b>		
<i>IDH1</i> mutasyonu	5	67-85
<i>IDH2</i> mutasyonu	0	0
<i>EGFR</i> amplifikasyonu	36-60	8
TERT mutasyonu	58	28
<i>CDKN2A-p16<sup>INK4a</sup></i> del.	31-78	19
<i>TP53</i> mutasyonu	28	65
<i>PTEN</i> mutasyonu	25	4
LOH 10p	47	8
LOH 10q	47; 70	54; 63
LOH 22q	41	82
LOH 1p	12	15
LOH 13q	12	38
LOH 19q	6	54
<b>Gen/protein ekspresyon</b>		
<i>Fas (APO-1; CD95)</i>	100	21
<i>Survivin</i>	83	46
<i>MMP-9</i>	69	14
<i>EGFR</i>	63	10
EGFR protein	Yüksek	Düşük
<i>MDM2</i>	31	0

Devamı arkada

VEGF protein	Yüksek	Düşük
VEGF fms-ilişkili tirozin kinaz 1	Yüksek	Düşük
IGFBP2	Yüksek	Düşük
Tenascin-X-öncülü	Yüksek	Düşük
Enolaz f	Yüksek	Düşük
Sentrozom-ilişkili protein 350	Yüksek	Düşük
<i>TP53</i>	37	97
<i>ASCL1</i>	33	88
<i>TIMP-3</i> kaybı	17	64
PDGFRA/PDGFRB	Düşük	Yüksek
ERCC6	Düşük	Yüksek
DUOX 2	Düşük	Yüksek
HNRPA3	Düşük	Yüksek
WNT-11 protein öncüsü	Düşük	Yüksek
Kaderin-ilişkili tümör baskılayıcı homolog öncüsü	Düşük	Yüksek
ADAMTS-19	Düşük	Yüksek

### *MGMT promotor metilasyonu*

Temozolomid (TMZ), timin ve guanine alkil grubu ekleyen, bunun sonucunda DNA hasarına neden olup, apoptozu başlatan bir alkilleyici ajandır. MGMT, guanin-alkil gruplarını uzaklaştıran ve apoptozu önleyen bir DNA tamir proteindir (Ludwig ve Kornblum 2017). MGMT'in metilasyon yoluyla susturulması, DNA tamiri yapamamasına ve TMZ'ye karşı duyarlılık göstermesiyle, aksine metile-olmayan MGMT kemoterapiye dirençle ilişkilidir (Thakkar vd 2014). MGMT promotoru, yeni tanı almış GBM'lerin %50'sinde metile durumdadır. MGMT metilasyonunun sekonder glioblastomlarda, kadınlarda ve uzun dönem hayatta kalan olgularda daha sıklıkla gözlemlendiği belirtilmiştir (Bleeker vd 2012). MGMT metilasyonunun, sekonder glioblastomda primer glioblastoma göre daha sık gözlenen IDH1/2 mutasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Thakkar vd 2014). MGMT promotor metilasyon sıklığı ve klinik sonucu glioblastomalı 70 yaş üzerindeki olgularda ve 18 yaş altı çocuklarda tanımlanmıştır (Olar ve Aldape 2014).

### IDH Mutasyonu

IDH, izositratın  $\alpha$ -ketoglutarat dekarboksilasyonunu katalizleyen bir enzimdir. IDH 1, 2 ve 3 olmak üzere üç izoformu tanımlanmıştır (Yang vd 2015). IDH1 ve 2 diffüz gliomlarda tanımlanmıştır ve yaklaşık olarak %90'ı IDH1 mutasyonuna sahiptir. *IDH1-R132H* (G395A) en yaygın mutasyondur (~%90), bunları sırasıyla *IDH1-132S* (C394A), *IDH1-R132C* (C394T), *IDH1-R132G* (C394G), *IDH1-R132L* (G395T) ve *IDH1-R132V* (C394V) takip etmektedir. *IDH2* mutasyonları en sık kodon 172'de R172K (G515A) amino asit değişiminde gözlenmektedir (Olar ve Aldape 2014, Yang vd 2015). IDH mutasyonları %70-80 oranında evre II ve III astrositromlarda, oligodendrogliomlarda ve sekonder GBM'de daha yaygındır fakat GBM olgularında *IDH1* mutasyonları yüksek sıklıkta gözlenmektedir (Ludwig ve Kornblum 2017). Primer GBM'de görülme sıklığı sadece %5 civarındadır (Olar ve Aldape 2014). IDH mutasyonları 20-60 yaş aralığındaki genç yetişkinlerde meydana gelme eğilimindedir. *IDH1* mutasyon frekansı yaşamın üçüncü on yılında keskin bir şekilde artar, beşinci on yılında ise frekansı düşmektedir (Thakkar vd 2014). *IDH1* mutasyonuna sahip GBM olgularının, *IDH1* mutasyonu bulunmayanlara göre daha iyi prognoza sahip olduğu bulunmuştur (Lai vd 2011).

### G-CIMP

G-CIMP, GBM'lerin %10'unda bulunan bir DNA metilasyon fenotipidir. IDH1 mutasyonu ve pronöral tümör alttipi ile sıkı ilişkilidir. Primer GBM'lerde nadiren bulunmaktadır (~%5-8). G-CIMP, pronöral tümör alttipi ve IDH1 mutasyonlu olgular sağkalım yönünden belirgin avantaja sahiptirler (Thakkar vd 2014).

### EGFR

Kromozom 7q12'de lokalize ve bir transmembran tirozin kinaz olan EGFR, hücre büyümesi, migrasyon ve sağkalım gibi çeşitli hücrel aktiviteyi düzenlemektedir (Ludwig ve Kornblum 2017). GBM'de EGFR sinyal aktivasyonu hücre bölünmesini, tümör invazyonunu ve radyoterapi ve kemoterapiye direnci indüklemektedir. Glioblastomaların %40-50'sinde *EGFR* amplifikasyonu görülmektedir. *EGFR* amplifikasyonu hem primer hem de sekonder glioblastomada tanımlanmış olmasına rağmen, primer glioblastomalarda daha yaygındır ve 35 yaş üstü olgularda ortaya çıkmaktadır. Primer GBM'de %39-73 oranında, sekonder GBM'de ise %0-9.5 oranında *EGFR* amplifikasyonu gözlenmektedir (Sharifi 2014). Amplifikasyonun yanında, ekzon 2-7 arasında meydana gelen delesyonu (801 bç) nedeniyle, 6-273 amino asitleri için



kodlama sekansının kaybı veya EGFR varyant III (EGFRvIII) en sık gözlenen mutasyonlardır. *EGFR*'in amplifiye olduğu glioblastomların %60-70'inde bu mutasyon saptanmıştır (Olar ve Aldape 2014). *EGFR* overekspresyonunun genç hastalarda kötü prognozla, yaşlı hastalarda iyi prognozla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca hasta yaşı, *p53* ve *EGFR* amplifikasyonu arasında kompleks bir ilişki bulunmaktadır. EGFR overeksprese ve normal *p53* özelliğindeki tümöre sahip genç hastalarda zayıf prognoz gözlenmiştir (Thakkar vd 2014).

### TP53

Tümör baskılayıcı *p53* proteini bir nükleer transkripsiyon faktörüdür ve hücre farklılaşması, apoptoz, DNA hasarı ve senesens olaylarında rol alan farklı genlerin transkripsiyonunu düzenler. Murin Double Minute2 (MDM2) proteini, doğrudan *p53*'e bağlanarak aktivitesini bloklar ve *p53*'ün inaktivasyonu ile sonuçlanan bir kompleks oluşturur (Shangary ve Wang 2009). Bu gendeki tüm mutasyonlar, *p53*'ün tamir kapasitesini inhibe eder ve sonuç olarak kontrolsüz hücre proliferasyonu ve tümör progresyonu görülür. *P53* mutasyonları sekonder GBM'in %60-70'inde, primer GBM'lerin %25-30'unda bulunmuştur ve daha sıklıkla genç olgularda meydana gelmektedir (Ohgaki ve Kleihues 2007, Thakkar vd 2014).

### ATRX

*ATRX* değişimleri başlıca astrositik kökenli tümörlerde bulunmaktadır ve IDH1/2 ve TP53 mutasyonu taşıyan astrositik tümörlere spesifiktir. Primer GBM'lere göre sekonder GBM'lerde daha yaygın olarak bulunmaktadır. *ATRX*, evre II-III astrositromlarda (%71), oligoastroitromlarda (%68) ve sekonder GBM'lerde (%57) sıklıkla, primer (%4) ve pediatrik GBM (%29) ve oligodendrogliyal tümörlerde (%14) nadiren mutasyona uğramış durumdadır. Sekonder GBM'de IDH1 ve TP53 mutasyonları ile birlikte bulunmaktadır (Thakkar vd 2014).

### TERT

*TERT* geni, telomeraz aktivitesi için önemli olan telomeraz revers transkriptazı kodlamaktadır ve bundan dolayı hücre proliferasyonu ve apoptoz için oldukça önemlidir (Nencha vd 2015). *TERT* promotor mutasyonları melanom, pankreatik karsinom gibi farklı tümörlerde rapor edilmiştir fakat GBM'de özellikle primer GBM'de sıklıkla

bulunmaktadır (Nonoguchi vd 2013). GBM'de *TERT* mutasyonları EGFR amplifikasyonu ile önemli ölçüde ilişkilidir fakat IDH ve p53 mutasyonları ile ters ilişkiye sahiptir (Nonoguchi vd 2013, Nenchu vd 2015). GBM'de *TERT* mutasyonu taşıyan olgular taşımayanlara göre daha kısa sağkalıma sahip olma eğilimindedirler. Bununla birlikte, primer ve sekonder alttipler açısından bakıldığında, tüm sağkalım açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Nonoguchi vd 2013).

### Kromozomlardaki genetik kayıplar

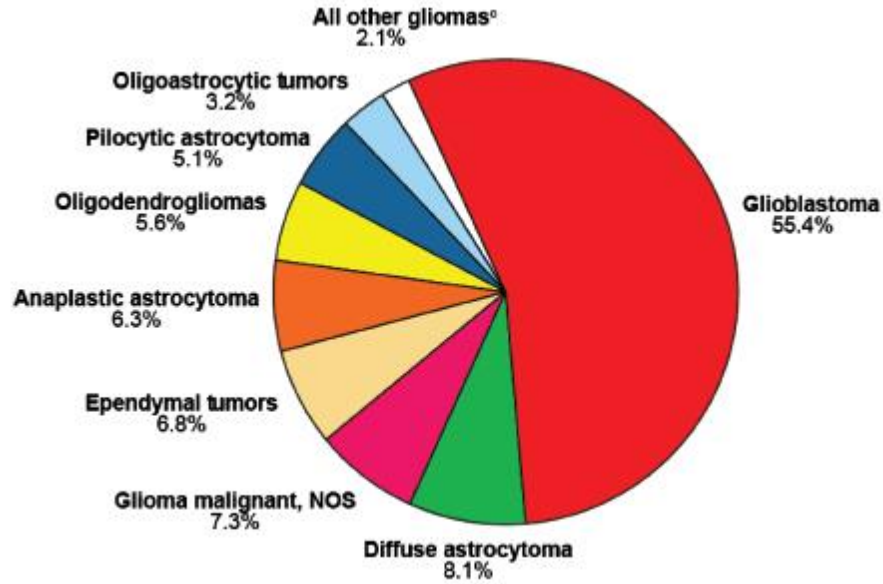
GBM'de en sık gözlenen genetik değişimlerden bazıları %80-90 oranında, kromozom 10'un tamamen veya p ve q kolundan birisinin kaybıyla meydana gelmektedir (Ohgaki ve Kleihues 2007). Kromozom 10q23.3'de lokalize olan *PTEN*, GBM'lerin %20 ile %40'ın da ve özellikle primer GBM'de mutasyona uğramış durumdadır. GBM'de 10q delesyonunun prognostik rolü tartışmalıdır. Bazı çalışmalar 10q'daki delesyonun zayıf prognozun bir belirteci olarak önerirken, bazı çalışmalar prognostik faktör olarak önemli bir rol oynamadığını belirtmektedir (Thakkar vd 2014).

Kromozom 1'in kısa kolunun ve kromozom 19'un uzun kolunun birlikte delesyonu olarak adlandırılan 1p/19q ko-delesyonu, anaplastik oligodendrogliomaların %80'inde bulunmakta, ayrıca kemoterapiye yanıt ve iyi prognozun belirteci olarak düşünülmektedir (Thakkar vd 2014, Ludwig ve Kornblum 2017).

### **2.2.2. GBM epidemiyolojisi**

GBM, ameliyat, radyoterapi, temozolomid (TMZ) gibi agresif tedavi yöntemleri olmasına rağmen toplam sağkalım süresi 14.6 ay olan, çok zayıf bir prognoza sahiptir (Krakstad ve Chekenya 2010, Bayin vd 2014). GBM'in yıllık insidansı 3.19/100.000'dir ve bu nedenle yetişkinlerde merkezi sinir sistemindeki en yaygın malignansidir. Birleşik Devletler'de insidansı 3/100.000'dir (Redzic vd 2014). Avrupa'daki insidansı ise 100.000 kişide 2-5 olgudur (Sümer vd 2012). GBM hastalarının ortalama teşhis yaşı 64 yıldır ve bu durum hastalığın, daha yüksek oranda yaşlı hastalar arasında görüldüğünü belirtmektedir. İnsidans 75-84 yaşları arasında artmaktadır. Çocuklar arasında çok yaygın olmamakla birlikte, MSS ve beyin tümörlerinin sadece %3'ü 0-19 yaş arasında gözlenmektedir (Thakkar vd 2014). GBM tüm primer beyin tümörlerinin yaklaşık

%15.4'ünü, gliomaların %55'ini, tüm astrositromaların ise %60-75'ini oluşturmaktadır (Şekil 2.7) (Ostrom vd 2016, WEB\_3).



**Şekil 2.7** Astrosit kökenli tümörlerin dağılımı (Ostrom vd 2016).

GBM'in 5 yıllık sağkalım oranı çocuklarda %12, yetişkinlerde ise %5'in altındadır (Olar ve Aldape 2014). Cinsiyet açısından bakıldığında, GBM erkeklerde kadınlara göre 1.6 kat daha fazladır. Primer GBM yine erkeklerde kadınlara göre daha sık gözlenmektedir. Beyaz ırkta siyah ırka göre 2 kat daha fazla görülmektedir. En yüksek sağ kalım oranı teşhisten sonraki ilk yılda erkeklerde %36.7, kadınlarda %32.8 olarak gözükmemektedir. İkinci yıl her iki cinsiyette de %13.7'ye düşmektedir (Thakkar vd 2014).

### 2.2.3. GBM etiyojisi

GBM etiyojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bunun başlıca nedeni, GBM'in genetik altyapısından ziyade, diğer bir ifadeyle aile öyküsünden bağımsız olarak spontan biçimde ortaya çıkmasıdır (Urbanska vd 2014). Dolayısıyla, GBM'e neden olan etkenler tamamen belirlenememiştir. Risk faktörleri olarak; diyet, sigara, alkol, travma, enfeksiyonlar, allerjiler, iş-endüstri ilişkisi ve ailesel faktörler belirlenmiştir (Wrensch vd 2002, Blumenthal ve Schulman 2005, Krex vd 2007). İyonize radyasyon başlıca risk

faktörü olarak düşünülmektedir (Louis vd 2007, Prasad ve Haas Kogan 2009). Bununla birlikte pestisitler, polisiklik aromatik bileşikler ve solventler gibi kimyasalların potansiyel olarak tehlikeli olabileceği bildirilmiştir (Urbanska vd 2014). Cep telefonu kullanmanın artmasıyla birlikte, uzun süreli kullanıma bağlı olarak ile beyin tümöründe artışın olabileceği rapor edilmiştir (Khurana vd 2009). Elektro manyetik alanların ve belirli metallerin beyin tümörü gelişiminde rol oynadığı belirtilmektedir (Spinelli vd 2010). GBM'in mesleki maruziyete bağlı olarak meydana geldiği düşünüldüğünden, kauçuk ve petrokimya endüstrisinde çalışan kişilerin daha yüksek riske sahip olduğu kabul edilmektedir (Wrensch vd 2002).

GBM olgularının sadece %5'inde ailesel öykünün bulunduğu bildirilmiştir (Jovcevska vd 2013). Ailesel öykü nadiren gözlense de, bir kez meydana geldiğinde sonraki kuşaklar diğer insanlara göre 2 kat daha fazla risk altındadır (Omuro ve DeAngelis 2013). Kalıtsal genetik hastalıklardan Li-Fraumeni tüberoz skleroz, Turcot sendromu, çoklu endokrin neoplazi tip IIA, Cowden hastalığı ve nörofibromatozis tip I olması durumunda GBM meydana gelebilmektedir (Blumenthal ve Schulman 2005, Adamson vd 2009, Urbanska 2014).

#### **2.2.4. GBM tedavisi**

GBM'in agresif yapısı ve heterojenitesinden dolayı tedavi edilmesi oldukça güç bir hastalıktır. GBM'de tedavinin güç olması birtakım faktörlere bağlıdır. Tümör hücreleri hızlı hücre döngülerine sahip olmaları, beyinin kendini tamir etme kapasitesinin sınırlı olması, kan-beyin bariyeri (BBB) permeabilitesinin, istenen etkideki kemoterapötikleri almada direnç göstermesi, tümör içi heterojenite, intrinsik GBM direnci ve spesifik olmayan toksisite nedenlerinden dolayı konvansiyonel tedavi sınırlı etkiye sahiptir (Iacob ve Dinca 2009, Ellis vd 2015). GBM'in tedavisinde uzun süre cerrahi operasyon ve radyoterapi kullanılmaktaydı. Şuan uygulanan güncel tedavi yaklaşımı tümörün teşhisinin ardından maksimum boyutta ve güvenilir şekilde cerrahi olarak çıkartılması, ardından başlıca temozolomid içeren kemoterapinin eşzamanlı ve adjuvan olarak radyoterapi ile birlikte uygulanmasıdır (Krex vd 2007, Aldape vd 2015, von Neubeck vd 2015).

GBM'in cerrahi tedavisinde amaçlanan hastada nörolojik tahribata neden olmadan tümörün büyük ölçüde çıkartılmasıdır (Bayram 2012). Hastaya teşhisten sonra cerrahi müdahaleye, beyindeki önemli fonksiyonel merkezlerden dolayı tümörün lokalizasyonu ve büyüklüğüne göre karar verilmektedir. GBM'in cerrahi tedavisi total ve kısmi rezeksiyon şeklinde yapılmaktadır. GBM beyin dokusu içine yüksek oranda infiltre olduğundan, tümör total olarak uzaklaştırılsa bile tekrarlayabilmektedir (Iacob ve Dinca 2009). Malesef, cerrahi müdahale sonrası uygulanan radyoterapi ve kemoterapiye rağmen GBM'in %80-90'ı nüksetmektedir (Fornara 2016). Ayrıca, tümörün %90'ından fazlasının uzaklaştırıldığı olguların, %90'dan daha az uzaklaştırılanlara göre 1 yıllık sağkalım oranının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Orringer vd 2012).

GBM'de konvansiyonel radyoterapi uygulanmaktadır. Radyoterapi uygulaması 6 hafta boyunca toplamda 60 Gray (Gy)'in 30 fraksiyona bölünerek fraksiyon başına 2 Gy uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir (von Neubeck 2015, Fornara 2016). Cerrahi müdahale sonrası uygulanan radyoterapi ortalama sağkalımı 14-36 hafta arasında arttırmaktadır. Radyoterapi başlangıçta tüm beyin radyoterapisi şeklinde yapılmaktayken, gelişen teknoloji ile birlikte bölgesel olarak uygulanmaya başlanmış ve oluşabilecek yan etkiler belirgin oranda azalmıştır (von Neubeck 2015).

Kemoterapi olarak; alkilleyici ajan olan temozolomidin (TMZ), radyoterapi sonrası veya radyoterapi ile birlikte kemoradyoterapi olarak uygulanması GBM'de tek kemoterapötik yaklaşımdır (von Neubeck 2015). Kemoradyoterapinin radyoterapiye göre GBM'de sağkalım oranını %10 oranında arttırdığı belirtilmiştir (Sathornsumetee ve Rich 2008). Bununla birlikte, GBM tedavisinde alkilleyici ajanlar, hidroksiüre, 6-tioguanin, 5 fluorourasil ve bir alkaloid olan vinkristin de kullanılmaktadır (Kim ve Glant 2006, Marchesi vd 2007). Uygulanacak kemoterapide maddenin türü, hastaya verilme süresi, uygulanacak dozu ve hastanın kendi genetik altyapısı kemoterapiyi direkt olarak etkileyen faktörlerdir (Hegi vd 2008).

Bir alkilleyici ajan olan TMZ, DNA replikasyonu sırasında Timin ile yanlış eşleşme yapan O6-metilguanin oluşumuna neden olarak DNA yapısını bozmaktadır. TMZ'nin kullanılma nedeni, diğer kemoterapötiklere göre düşük yan etkiye sahip olması ve BBB'yi geçme kapasitesine sahip olmasıdır (Jovcevska 2013). Bir DNA tamir geni olan O6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT)'in metilasyon durumu, GBM'de kullanılan ve

TMZ tedavisine yanıt olarak kullanılan ana biyolojik belirteçdir (Zorzan vd 2015). MGMT ekspresyonunun promotor metilasyonu yoluyla susturulması, tümör hücrelerinin TMZ tarafından indüklenen DNA hasarı tamiri yapmasını engellemektedir. Böylelikle tümör hücrelerinin sağkalımı azalmaktadır (Nishikawa 2010). MGMT geni promotörü metile olmayan tümöre sahip olgular, TMZ uygulaması sonrası daha az yarar göstermektedir (von Neubeck 2015, Marosi ve Preusser 2017). Bu nedenle, radyoterapi ile birlikte TMZ'nin tüm GBM hastalarına kombine uygulaması standart tedavi yöntemidir. Radyoterapi ile kombine olarak uygulanmasıyla, sağkalımı 2-3 ay kadar uzattığı bulunmuştur. Bununla birlikte, TMZ uygulaması ile 2-yıllık sağ kalım oranı %27'dir (Zorzan vd 2015). Bu nedenle, GBM hastaları için yeni tedavi yaklaşımlarının tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda, yeni GBM tedavileri için günümüzde cerrahi, radyasyon ve kemoterapi yaklaşımlarını içeren klinik denemelerde birçok deneysel strateji denenmektedir. Ek olarak, gen terapi, immünoterapi ve sitotoksik viral terapi gibi birtakım yeni biyolojik stratejiler klinik denemeler için test edilmektedir.

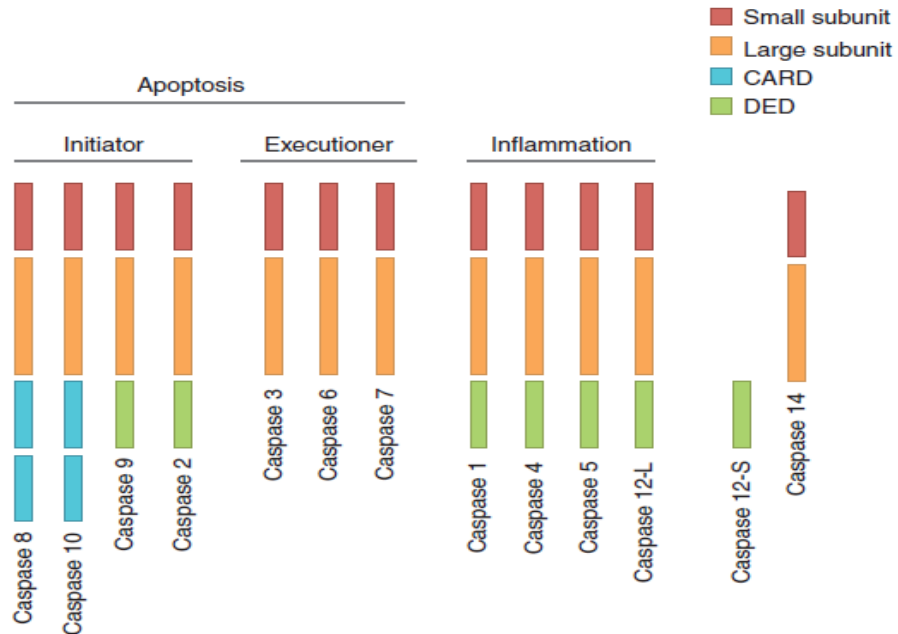
### 2.3. Apoptoz

Tip I hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Ouyang vd 2012). Apoptoz terimi Yunanca "apo" ve "pitozis" sözcüklerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuş ve sonbaharda ağaçlardan dökülen yaprak anlamına gelmektedir (Wong 2011). Apoptoz, gelişimde, homeostazide ve tümör baskılanmasında önemli rol oynamaktadır (20). Gelişimsel belirtilerle, pro-apoptotik reseptörlerin aktivasyonu, hücre sel stresle veya büyüme faktörlerinin kaybı, ısı şoku, ışın tedavisi, sitotoksik ilaçlar, bakteri ve virüs gibi nedenlerle meydana gelen hasarla apoptotik uyarı gerçekleşmektedir (Ashkenazi ve Herbst 2008). Bu uyarım sonucunda, apoptozun kendine has, kromatin kondenzasyonu, nükleer fragmentasyon, hücre membranının kabarcık şeklinde yapı oluşturması, sitoplazmik organellerin yapısal modifikasyonu, membran bütünlüğünün bozulması gibi "morfolojik" ve kaspaz aktivasyonu, DNA ve protein parçalanması, membran değişiklikleri, fagositik hücreler tarafından tanınma gibi "biyokimyasal" etkiler ortaya çıkmaktadır (Duprez vd 2009, Wong vd 2011, Portt vd 2011).

Apoptoz mekanizması, son derece kompleks ve moleküler olayların enerji -bağımlı kaskadını kapsayan karmaşık bir olaydır. Apoptoz birbiri ile ilişkili başlıca, pro-apoptotik

reseptör sinyalleri tarafından aktive edilen “ekstrinsik yolak” ve mitokondriyal sinyaller tarafından aktive edilen “intrinsik yolak” olmak üzere 2 ana yoldan oluşmaktadır (Nagy vd 2015). Ayrıca, bu iki yoldan başka, T-hücre aracılı sitotoksinite ve perforin-granzim-bağımlı hücre ölümünü de kapsayan ek bir yolak daha bulunmaktadır. Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B yolları aynı noktada birleşmektedirler (Elmore 2007).

Apoptoz olayını başlıca, hedef proteinlerini aspartik asitten sonra kesen ve sistein proteaz olarak adlandırılan kaspazlar gerçekleştirmektedir (Rastogi vd 2009). Bu proteazlar inaktif zimojen olarak sentezlenirler ve proteolitik kesilme sonucunda tamamen aktifleşerek bir kaskad birbirlerini kesmektedirler. Kaspazlar, ya “pro-inflamatuar” (kaspaz-1, -4, -5, -12 ve -14) ya da “pro-apoptotik” olarak 2 kategoriye ayrılırlar. Pro-apoptotik grup ise “başlatıcı” (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve “efektör” (kaspaz-3, -6 ve -7) olmak üzere sınıflandırılmaktadırlar (Şekil 2.8). Kaspaz kaskadı bir kez açıldığında, başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları keserek apoptoz olayını gerçekleştirirler (Ashe ve Berry 2003, Ashkenazi ve Herbst 2008, Rastogi vd 2009, McIlwain vd 2013).



**Şekil 2.8** İnsanlarda bulunan kaspazlar ve domainleri (McIlwain vd 2013).

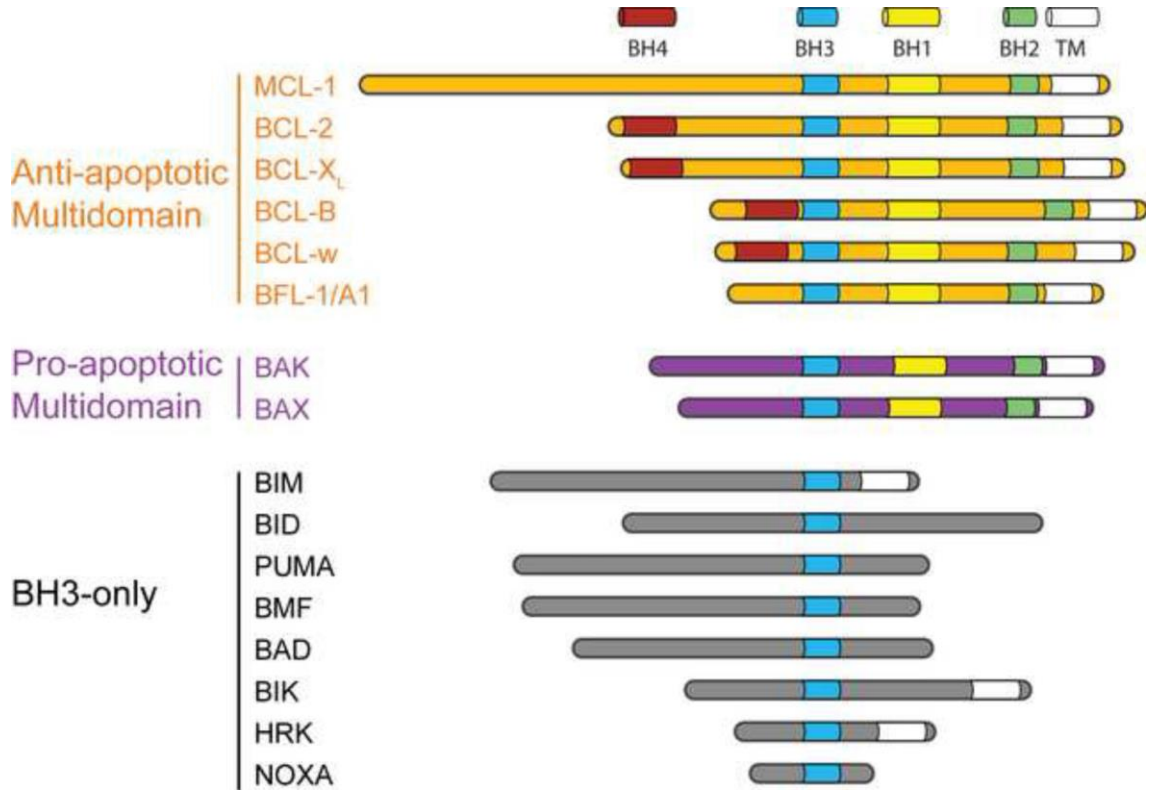
### 2.3.1. Apoptozun İntrensik (İç) Yolağı

Mitokondriyal yolak olarak da adlandırılan intrinsik apoptoz yolağı; radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller gibi uyarımlar sonucu mitokondriyal membran potansiyelinin bozularak, sitozlazmaya sitokrom-c, Smac/DIABLO, serin proteaz HtrA2/Omi, apoptoz indükleyici faktör (AIF), Endonükleaz G (Endo G) ve CAD gibi pro-apoptotik proteinlerin mitokondri membranları arasından sitozole salınımı yoluyla gerçekleşir. Bu salınmayla birlikte sitokrom-c, Apaf-1, ATP ve prokaspaz-9 ile birlikte apoptozom kompleksini oluşturur. Bu kompleksin oluşması sonucu prokaspaz-9 kesilerek aktif kaspaz-9 haline dönüşür. Ardından aktif kaspaz-9'da efektör kaspaz-3, -6 ve -7'yi keserek, onları aktif forma dönüştürür. Aktif hale gelen efektör kaspazlar da hedeflerini keserek apoptoz olayını gerçekleştirirler (Elmore 2007).

Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi proteinleri, XIAP, cIAP1 ve cIAP2 gibi apoptoz inhibitör proteinlerini (IAP) inhibe ederek apoptoz olayını düzenlerler. Bu proteinlerin IAP'lere bağlanması, IAP'lerin kaspaz-9, -3 ve -7'yi inhibe etmesini engelleyerek apoptoz olayını gerçekleştirmektedir (Duprez vd 2009). AIF, Endo G ve CAD apoptoz olayı boyunca mitokondriden sürekli salınmaktadır fakat hücre ölümüne karar verildikten sonraki geç dönemde görev yapmaktadırlar. AIF nükleusa transloke olarak DNA'yı 50-300 kb büyüklüğünde parçalara ayırmada ve nükleer kromatinin kondenzasyonunda rol oynamaktadır. Endo G'de nükleusa transloke olarak nükleer kromatin keser ve oligonükleozomal DNA fragmanlarının oluşumuna neden olur. AIF ve Endo G kaspaz-bağımsız durumda görev yapmaktadırlar. CAD ise prokaspaz-3 kesildikten sonra, nükleusa transloke olarak daha belirgin ve yüksek kromatin kondenzasyonuna neden olmaktadır (Elmore 2007).

İntrensik yolakta düzenleyici rol oynayan önemli bir protein de Bcl-2 ailesi üyeleridir. Bcl-2 ailesi üyeleri sekans homolojileri ve fonksiyonlarına göre: "çoklu domain (BH-1, -2, -3 ve -4) anti-apoptotik üyeler", çoklu domain (BH-1, BH-2, BH-3 ve -4) pro-apoptotik üyeler" ve sadece BH-3 domaini içeren üyeler" olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadırlar (Şekil 2.9). Tüm Bcl-2 ailesi üyeleri en azından bir tane Bcl-2 homoloji domain (BH) yönünden ortaklırlar (Ola vd 2011). Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge, hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirlemektedir (Chipuk vd 2010).





**Şekil 2.9** Bcl-2 ailesi üyelerinin yapısal ve fonksiyonel yönden sınıflandırılması (Gimenez-Cassina ve Danial 2015).

Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, pro-apoptotik üyelerin doğrudan inhibisyonu yoluyla mitokondriyal dış membranını (MOM) sağlam tutarlar (Chipuk vd 2010). Mcl-1 dışındaki anti-apoptotik üyeler 4 BH domaini içermektedir (Şekil 2.9). Bcl-2 ve Bcl-xL karboksi terminal hidrofobik transmembran kuyruğa sahip olmalarından dolayı MOM'a lokalize olmuşlardır. Bununla birlikte Bcl-2 endoplazmik retikulum (ER), nükleus veya sitozolde de bulunabilir ve ölüm sinyalinin gelmesi üzerine MOM'a transloke olmaktadır (Ola vd 2011). Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin, çoğunlukla kanser hücrelerindeki overekspresyonları nedeniyle terapötik hedef olarak kullanılmaktadırlar ve bu proteinler tümöröenez süreci ve kemoterapiye direnç ile ilişkilendirilmektedirler (Dutta vd 2015).

Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri BH domain sayılarına göre efektör proteinler ve sadece BH-3 domaini içerenler olarak 2'ye ayrılırlar. Efektör proteinler Bak, Bax ve Bok 4 adet BH domaini bakımından ortaktırlar. İnaktif halde monomer halinde bulunmaktadırlar. Bak inaktif halde MOM'da lokalize iken, inaktif Bax ise sitozol ya da MOM'da serbest halde bulunmaktadır. Ölüm sinyali geldiğinde, bu proteinler aktif hale geçer ve N-terminal kısımları açığa çıkacak şekilde konformasyonel değişikliğe uğrarlar.

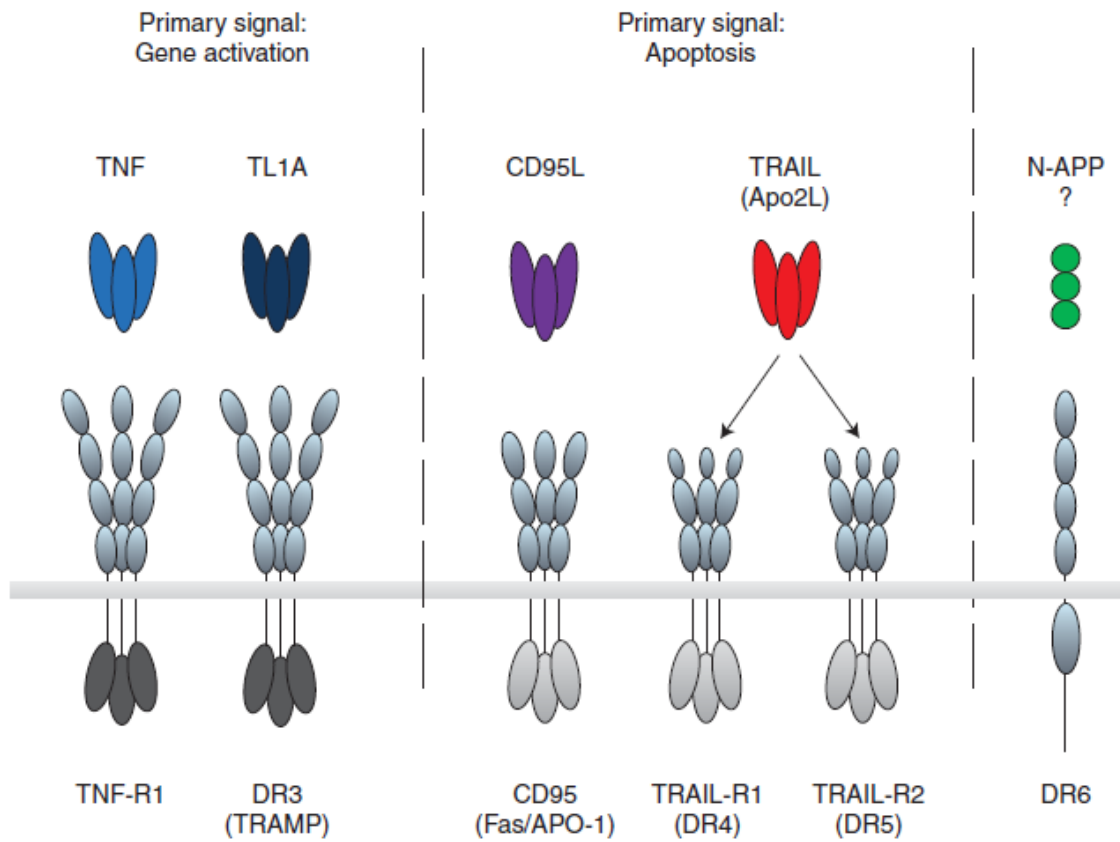
Aktivasyonla birlikte, Bax MOM'a transloke olur ve ardından Bak ve Bax oligomerizasyonu gerçekleşerek mitokondriyal dış membran potansiyelinin (MOMP) indüklenmesi meydana gelir. Bozulan MOMP ile sitokrom c ve diğer pro-apoptotik proteinler salınarak intrinsik apoptoz yolağı gerçekleşir (Chipuk vd 2010, Thanh-Trang ve Letai 2013).

Sadece BH-3 içeren pro-apoptotik üyeler diğer Bcl-2 aileleri ile BH-3 domaini yönünden ortaktırlar ve bu domainde diğer Bcl-2 aileleri ile bağlanmasını sağlayan amfipatik  $\alpha$ -heliks kısım bulundurlar (Gimenez-Cassina ve Danial 2015). BH-3 domaini, pro-apoptotik aktivite için yeterli ve son derece önemlidir (Thanh-Trang ve Letai 2013). Herhangi bir hasar ve ölüm sinyali geldiğinde, bu proteinler protein stabilizasyonu, artan ekspresyon veya post-translasyonel modifikasyonlarla aktive edilmektedirler (Deng vd 2007). Pro-apoptotik yeteneklerini, ya anti-apoptotik Bcl-2 üyelerine bağlanıp onları nötralize ederek, ya da pro-apoptotik efektörler olan Bak ve Bax'ı direk aktive ederek gösterirler (Czabotar vd 2014). Bu nedenle, göstermiş bu fonksiyonlara göre direkt aktivatörler ve baskılayıcılar olarak sınıflandırılabilirler. Bim, Bid ve Puma direkt aktivatörler sınıfındadır ve Bak/Bax oligomerizasyonunu indükleyerek MOMP'a neden olurlar (Gimenez-Cassina ve Danial 2015). Bid'in inaktif formu çoklu BH domain üyelerine benzerdir fakat aktif kaspaz-8 tarafından aktive edildiğinde BH3 domaini açığa çıkar ve tBid (truncated Bid) haline dönüşür. Baskılayıcılar ise Bad, Bmf, HRK ve Noxa'dan oluşmaktadır. Bu grup, doğrudan Bak ve Bax'a bağlanma yeteneğine sahip değildir. Bunun yerine, BH-3 amfipatik  $\alpha$ -heliks ile anti-apoptotik proteinlerin hidrofobik oluşuna bağlanırlar ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin fonksiyonunu etkisiz hale getirirler (Czabotar vd 2014).

### 2.3.2. Apoptozun Ekstrinsik (Dış) Yolağı

Ekstrinsik yolak, özelleşmiş pro-apoptotik membran reseptörleri olan ölüm reseptörleri tarafından başlatılır. Bu nedenle ekstrinsik yolağa ölüm reseptörleri yolağı da denilmektedir. Ölüm reseptörleri, Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Süper Ailesinin üyeleridir (TNFSF). TNFSF geniş bir ailedir ve spesifik ligandlarına bağlanarak homotrimer yapıda organize olan 29 transmembran reseptör proteininden oluşmaktadır. TNF ligand ailesinin 19 üyesi tanımlanmıştır ve bunların reseptörüne bağlanmasıyla, aktive olmuş reseptörle etkileşime giren adaptör proteinlere bağlı olarak proliferasyon, inflamasyon ve apoptoz gibi birtakım hücrel olaylara neden olabilmektedirler (Krakstad ve Chekenya 2010).

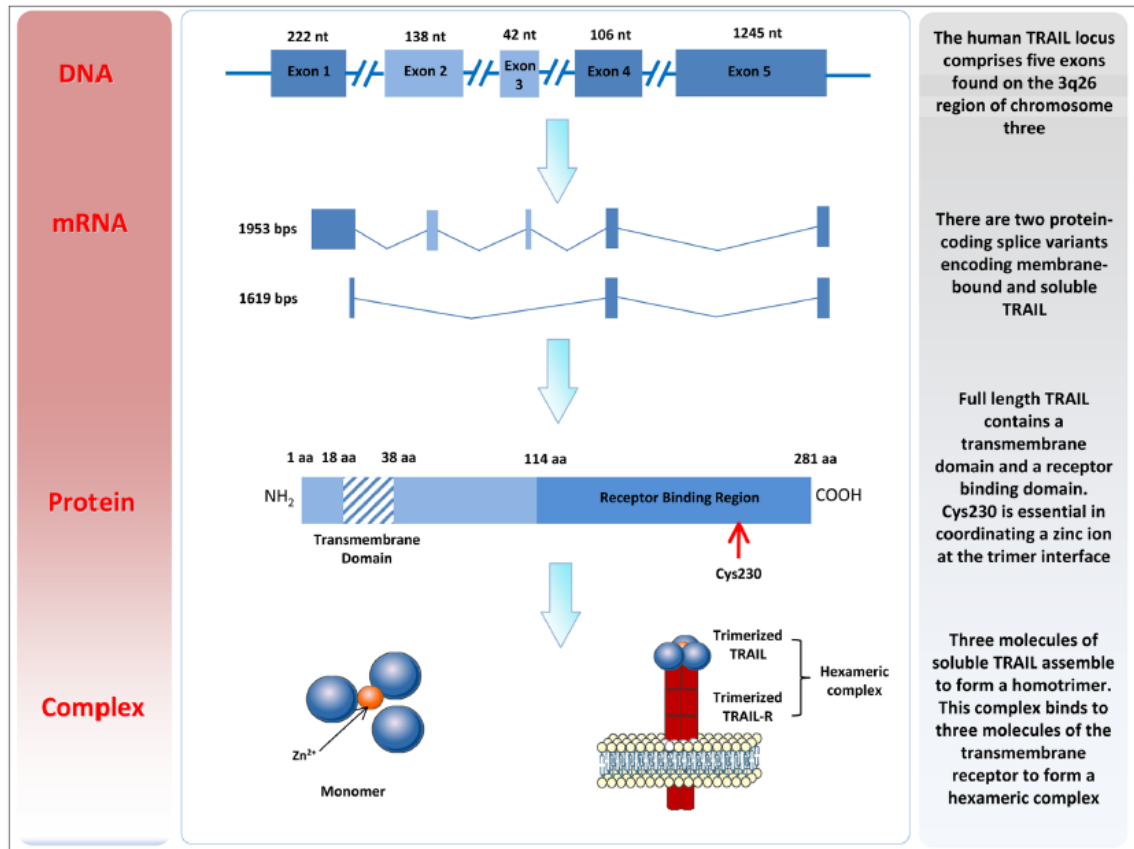
Apoptoz ile ilişkili olan altı adet insan ölüm reseptörü tanımlanmıştır. Bunlar; TNFR1, CD95 (Fas/APO-1), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (APO-2/TRICK/DR5/KILLER), DR3 (TRAMP/APO-3) ve DR6'dır. Bu reseptörler, spesifik ligandları tarafından uyarılırlar. Bu ligandlar sırasıyla; TNF, CD95L (FasL), TRAIL (DR4 ve DR5 için ortak) ve TL1A'dır. DR6 reseptörü için henüz bir ligand tanımlanmamıştır (Şekil 2.10). Ölüm reseptörleri apoptoz mekanizmasını sitoplazmik bölgelerinde bulunan 80 aminoasitlik (aa) "ölüm domainleri" (DD) aracılığıyla gerçekleştirmektedirler (Ashe ve Berry 2003, Walzack 2013). Ekstrinsik yolak, bu tezin konusu olan TRAIL üzerinden bir sonraki başlık altında özetlenecektir.



**Şekil 2.10** Ölüm reseptörleri ve ligandları (Walzack 2013).

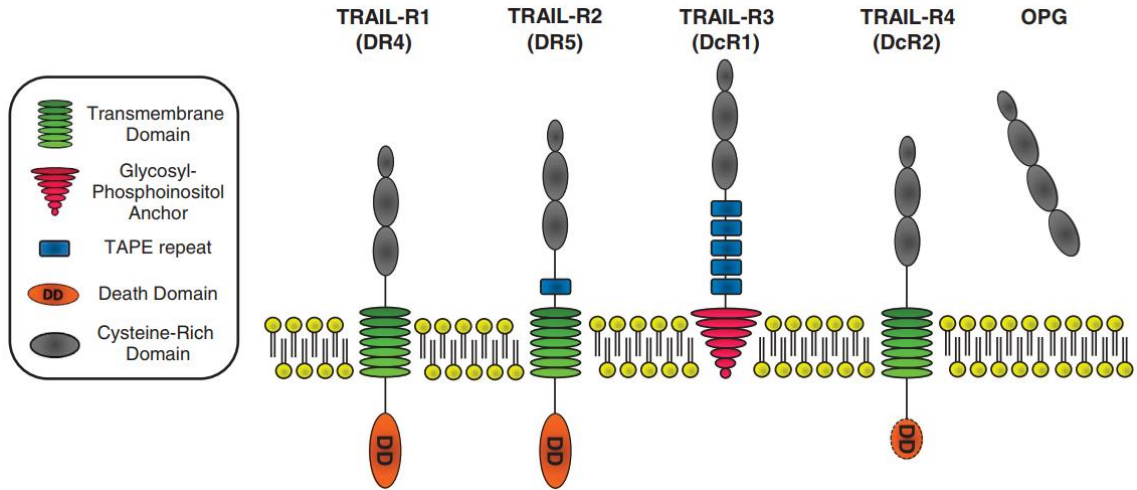
### 2.3.3. TRAIL

TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand (TRAIL veya Apo2L), TNF süperailisinin bir üyesidir. İnsanlarda kromozom 3q26'da lokalize olmuş, yaklaşık 20 kilobaz (kb) uzunluğundaki bir genden kodlanır ve 5 ekzon, 4 intron içermektedir. TRAIL, 281 aa uzunluğunda, membranı 1 kere geçen, tip II transmembran proteindir. Protein yapısı 230. aa'daki çinko iyonu sayesinde stabil edilerek, çözünebilir homotrimer yapıdadır. TRAIL'in 1-17 aa arası topolojik domainini, 18-38 aa arası transmembran heliksi, 114-281 aa arası reseptörlerin bağlandığı bölgeleri kapsamaktadır. TRAIL, diğer TNF süperailisi üyeleriyle homoloji gösteren C-terminal bölgesine ve homoloji göstermeyen N-terminal bölgesine sahiptir (Şekil 2.11). TRAIL, T ve B lenfositleri, Doğal Öldürücü (NK) hücreler, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi immün sistem hücrelerinin yüzeylerinde bulunur ve buralardan spesifik metalloproteinazlarla kesilerek, hücreler arası sıvıya çözünebilir bir formda salınarak biyolojik aktivitesini gösterir (Kısım 2010, De Carvalho vd 2013, Stuckey ve Shah 2013).



Şekil 2.11 İnsanda bulunan TRAIL'in organizasyonu (Stuckey ve Shah 2013).

TRAIL'in beş farklı reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörlerden ikisi TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5)'dir. Her iki reseptör intraselüler ölüm domainine sahip olup, sitoplazmik yüzeyde birtakım adaptör proteinlerle DISC (Death Inducing Silencing Complex) kompleksi oluşturarak, apoptozu indükleme yeteneğindedir. Diğer iki reseptör TRAIL-R3 (Decoy Receptor 1-DcR1) ve TRAIL-R4 (Decoy Receptor 2-DcR2) de hücre yüzeyinde bulunurlar fakat yapılarında sitoplazmik domainleri olmadığından proapoptotik sinyalleri iletemezler. Bu reseptörlerin TRAIL-indüklü apoptozda yarışmalı inhibitörler oldukları önerilmektedir. Beşinci reseptör olan Osteoprotegerin (OPG) tek ekstraselüler, çözünebilir TRAIL reseptörüdür ve diğer dört reseptöre göre TRAIL'e daha düşük afinite göstermektedir (Şekil 2.12) (Voelkel-Johnson 2011, De Carvalho vd 2013, Dimberg vd 2013, De Wilt vd 2013).

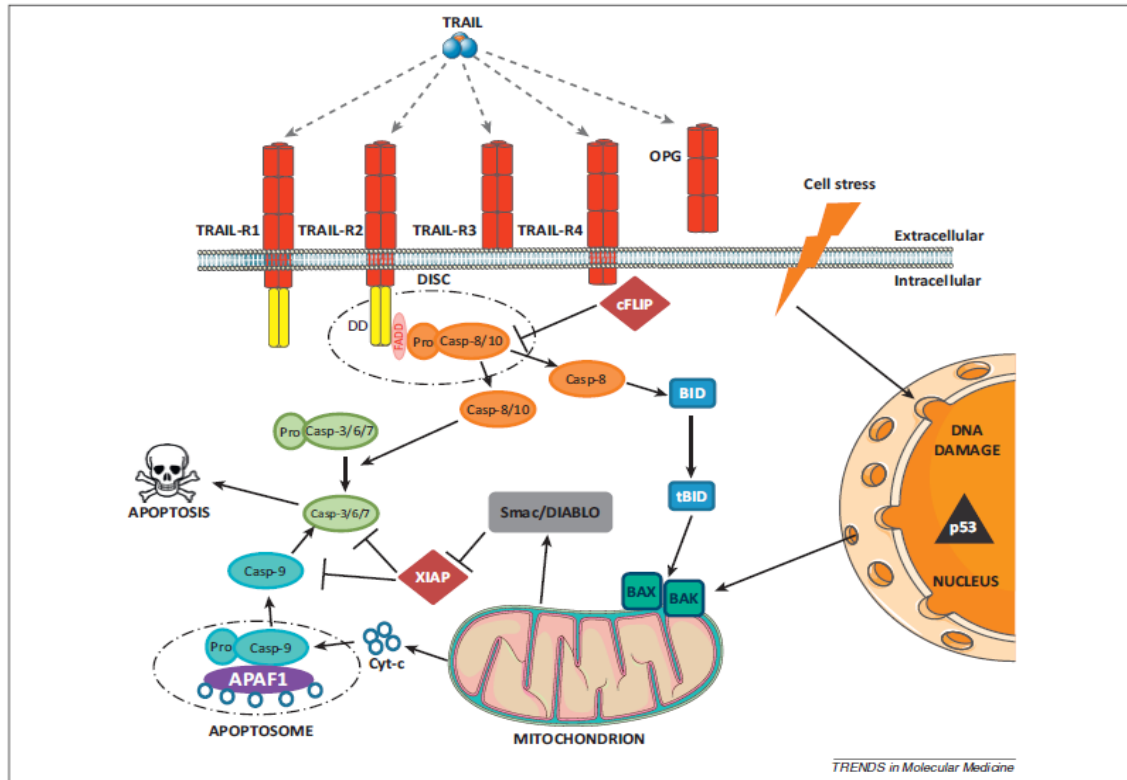


**Şekil 2.12** İnsanlarda bulunan TRAIL reseptörleri (Lemke vd 2014).

TRAIL-indüklü ekstrinsik yolak, homotrimerik TRAIL'in TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörlerine bağlanmasıyla birlikte başlar ve bu bağlanma reseptörlerin konformasyonel modifikasyonuna neden olur. Bu modifikasyon, adaptör protein FADD (Fas-associated death domain)'ın kendi ölüm domaini ile reseptörün ölüm domainine toplanmasını sağlar. FADD adaptör proteininin "death effector domain" (DED) adı verilen diğer domaini ise pro-kaspaz-8 ve -10'un DED domainine bağlanır. Bu bağlanmayla birlikte oluşan yapı "DISC" adını alır. DISC kompleksinde pro-kaspaz-8 ve -10 otokatalitik olarak kesilerek aktif kaspaz haline dönüşürler ve kaspaz-bağımlı sinyal kaskadını başlatırlar. Apoptoz, DISC kompleksinde c-FLIP (cellular FLICE inhibitör protein) proteini tarafından inhibe edilir. c-FLIP enzimatik aktiviteye sahip olmamasına rağmen, yapısındaki DED domaini ile kaspaz-8 ve -10 ile yapısal homoloji gösterir ve onlarla

yarışarak DISC kompleksine bağlanır. Böylelikle, inaktif durumdaki bu kaspazların DISC ile bağlanmasını engellemektedir (De Carvalho vd 2013, Dimberg vd 2013).

Fas-indüklü (CD95/APO-1) apoptoza benzer şekilde, TRAIL-R1/R2-DISC kompleksinde yüksek ya da düşük seviyede kaspaz aktivasyonu oluşumu için 2 hücre tipi tanımlanmaktadır. Tip I hücrelerde, DISC-indüklü kaspaz-8/-10 aktivasyonu doğrudan efektör kaspaz-3, -6 ve -7'nin aktivasyonunu gerçekleştirerek apoptoza neden olur (Allen ve El-Deiry 2012). Tip II hücrelerde ise, kaspaz-8/-10'un aktivasyonunun düşük seviyeleri doğrudan efektör kaspaz aktivasyonu için yeterli değildir. Bu nedenle apoptoz, pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan BID'in kaspaz-8/-10 tarafından kesilerek intrinsik apoptoz yolağının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Kesilmiş Bid (tBid) mitokondriyal membrana transloke olarak Bak ve Bax'ın oligomerizasyonunu stimüle ederek, MOMP'a neden olur. MOMP ile birlikte daha önceki bölümde anlatıldığı gibi sitokrom c, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF ve Endo G gibi pro-apoptotik moleküller sitozole salınır. Böylece apoptozun intrinsik yolağı gerçekleşmiş olur (Şekil 2.13). Birçok tümör, Tip II hücresi gibi davranır böylece anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin up-regülasyonu yoluyla FasL ve TRAIL yoluyla meydana gelen apoptoz mekanizmasından korunabilmektedir (Ashkenazi ve Herbst 2008, Voelkel-Johnson 2011, Allen ve El-Deiry 2012, De Carvalho vd 2013).



Şekil 2.13 Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolağı (Stuckey ve Shah 2013).

Efektif kanser terapötikleri için, normal hücrelerde herhangi bir değişim olmadan, özellikle malign tümör hücrelerinde apoptozu indüklemek çok önemli bir stratejidir. TRAIL birçok tümör hücresinde apoptozu indüklemesi fakat normal hücelere minimal toksisite göstermesi ya da göstermemesi yönüyle önemli bir özelliğe sahiptir (Ashkenazi ve Herbst 2008, Voelkel-Johnson 2011, De Carvalho vd 2013, Dimberg vd 2013). Bu özelliği nedeniyle, TRAIL kanser tedavisi için ilgi çekici bir adaydır.

### 2.3.3.1. Kanserde TRAIL Direnci

Meme, prostat, ovaryum, akciğer, multiple miyelom, lösemi, nöroblastom ve glioblastomayı içeren çeşitli kanser tiplerinin TRAIL tarafından indüklenen apoptoza dirençli olduğu görülmüştür (De Carvalho vd 2013, Tsamis vd 2013, von Karstedt vd 2017). Kanseri hücrelerinin TRAIL-indüklü apoptoza olan direnci apoptoz sinyal yolağının farklı noktalarında meydana gelebilmektedir (Alexiou vd 2015).

TRAIL direncine neden olan mekanizmalardan biri, DcR1 ve DcR2'nin TRAIL ile bağlanmada DR4 ve DR5 reseptörleri ile yarışarak, TRAIL ile daha fazla bağlanmasından dolayıdır. DR4 ve DR5 reseptörleri, daha sıklıkla DR4 reseptörleri bazı tümörlerin hücre yüzeyinde bulunmamaktadır. Her iki reseptör de bulunmadığı zaman, Bcl-2 ailesi ve kaspaz durumuna bakılmaksızın TRAIL-direnci meydana gelmektedir (Alexiou vd 2015, Selvarajoo 2017). Bununla birlikte DR4 ve DR5 reseptörünün hipermetilasyon gibi epigenetik değişikliklerle ya da delesyon, nokta mutasyon gibi genetik değişiklikler tarafından downregülasyonunun TRAIL direnci ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Oikonomou ve Pintzas 2013). DR5 mutasyonları baş-boyun, meme ve akciğer, DR4 delesyonuna ise nazofarengeal kanserinde rastlanmıştır (Lim vd 2015). Bir diğer mekanizma, ölüm reseptörlerinin değişen glikolizasyonu ve bozulmuş endositozları nedeniyle meydana gelmektedir. N-asetilgalaktozaminiltransferaz (GALNT14) ve fukoziltransferaz-3/6'nın değişen ekspresyon seviyeleri TRAIL-direnci ile ilişkilendirilmektedir (Fulda 2014, Trivedi ve Mishra 2015).

Azalmış kaspaz ekspresyonu, kaspaz inhibitörlerinin artan ekspresyonu, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ve intrinsik apoptoz yolağındaki diğer inhibitörlerin overekspresyonu TRAIL'e olan direncin başlıca nedenleridir. Flice-benzeri inhibitör proteinin (FLIP) katalitik domainindeki mutasyonlar, kaspazlarla DISC'e bağlanmak için

yarışarak onların DISC'e bağlanmasını ve aktivasyonunu engeller. Ayrıca FLIP overekspresyonunun TRAIL direnciyle ilişkili olduğu belirtilmektedir (Yang vd 2008, Alexiou vd 2015, Miguel vd 2016). Birçok kanserde kaspaz-8 veya FADD'da meydana gelen defektler ya da downregülasyon TRAIL direncine neden olmaktadır (Alexiou vd 2015). X-ilişkili apoptoz inhibitörünün (XIAP) overekspresyonu kaspaz-3, -7 ve -9'un aktivitesini inhibe ederek TRAIL direncine aracılık etmektedir (Dimberg vd 2013). Bax ve/veya Bak'ın kaybı veya Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin overekspresyonu da TRAIL direnci ile sonuçlanmaktadır (Dimberg vd 2013, Alexiou vd 2015). Bunların dışında, miR-21 ve miR-30b/c gibi mikroRNA (miRNA)'ların kaspaz-3'ün 3'-UTR kısmına bağlanarak kaspaz-3'ü inhibe etmesi de TRAIL direnci ile ilişkili diğer bir mekanizmadır (Quintavalle vd 2012).

TRAIL'in apoptoz yanında hücre sağkalımını indükleyen bir yolağı daha tanımlanmıştır. Bu yolda; TRAIL reseptörüne bağlandığında FADD, kaspaz-8, reseptör ile etkileşen protein (RIP1), tümör nekrozis faktör reseptörü ile ilişkili faktör-2 (TRAF2) ve nükleer faktör kappa-B (NF-kB) esansiyel modülatörü (NEMO) ikincil sitozolik kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks NF-kB, MAPK, p38, ekstraselüler sinyal-regüle eden kinaz (ERK1/2), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT, transkripsiyonun sinyal iletilicileri ve aktivatörlerini (STAT) aktive etmektedir (Azijli vd 2013, Dai vd 2015, Mert ve Şanlıoğlu 2017, von Karstedt vd 2017). PI3K/AKT yolağının aşırı aktivasyonu, TRAIL-indüklü apoptozu dirençte rol oynadığı rapor edilmiştir (Alexiou vd 2015). Malign gliomalarda, PI3K/AKT yolağı, PTEN fonksiyonunun ortadan kalkması nedeniyle genel olarak sürekli aktif haldedir. Bu nedenle, SH-6 gibi AKT inhibitörleri veya PI-103 gibi PI3K inhibitörleri kullanılarak TRAIL-aracılı apoptozun artırıldığı bulunmuştur (Bağcı-Önder vd 2011).

### **2.3.3.2. TRAIL ve GBM**

TRAIL'in kontrol hücrelerinde apoptozu indüklemeyen, seçici olarak kanser hücrelerinin apoptozuna neden olması GBM için aday bir tedavi yöntemi olarak düşünülmektedir. DR4 ve DR5 reseptörlerinin her ikisi de GBM'de eksprese edilmektedir fakat DR5'in DR4'e göre daha yüksek oranda eksprese edildiği belirtilmiştir (Alexiou vd 2015). 62 adet primer GBM tümörü ile yapılan çalışmada DR4 ve DR5 reseptörlerinin sırasıyla %75 ve %95 oranında eksprese edildiği rapor edilmiştir (Kuijlen vd 2006). Bunların yanında, birçok GBM tümörü TRAIL'e direnç göstermektedir ya da zaman içinde direnç kazanmaktadır. Bu durum GBM hücre hatları için de benzerdir. GBM hücrelerin



TRAIL reseptörlerini eksprese etmelerine rağmen, U251MG hücresi TRAIL'e direnç, T98G ve U87MG hücresi TRAIL'e orta derecede direnç göstermektedir (Tsamis vd 2013).

TRAIL-dirençli hücreleri apoptoza duyarlı hale getirmek için proteozom inhibitörleri, histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi), PI3K/AKT inhibitörleri, SMAC taklitçileri, anti-CD20, konvansiyonel kemoterapi ve radyoterapi gibi birtakım terapötik ajanlar geliştirilmiştir. TRAIL duyarlılığını indüklemek, TRAIL ve TRAIL reseptörlerinin endojen ekspresyonunu yeniden sağlamak, gelecekte uygulanacak terapiler için uygun bir strateji olarak gözükmemektedir (De Carvalho vd 2013).

TRAIL-direncini ortadan kaldırmak için güncel yaklaşım TRAIL ile birlikte uygulanacak kombine tedavilerdir. Klinik öncesi çalışmalarda, TRAIL ile birlikte kemoterapi, radyasyon ve yeni terapötik ajanların kombine uygulamaları tümör regresyonu açısından olumlu sonuçlar vermiştir (Kuijlen vd 2010). *In vivoda* nude farelerde yapılan çalışmada, TRAIL ile kemoterapötik bir ajan olan cisplatinin kombine uygulaması insana ait GBM ksenogratların tümör oluşumunu ve büyümesini azalttığı görülmüştür (Nagane vd 2000). Bağcı-Önder ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, bir HDACi olan MS-275'in tek başına GBM hücrelerine uygulanması anlamlı bir etki göstermezken, TRAIL ile birlikte kombine edildiğinde TRAIL-dirençli GBM hücrelerinde hücre ölümünü indüklemiştir. GBM hücrelerinde TRAIL ile birlikte proteozom inhibitörü olan Bortezomib'in kombine uygulaması sonucu TRAIL-dirençli primer GBM hücrelerinin TRAIL-aracılı hücre ölümüne duyarlı hale geldiği belirtilmiştir (Kuijlen vd 2010). Bu umut verici yaklaşımlar, GBM hücrelerinde TRAIL-indüklü hücre ölümünü tetiklemede kombine tedavinin önemini vurgulamaktadır. Bu nedenle, kombine tedaviler için TRAIL ile birlikte uygulanacak HDACi'ler gibi yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

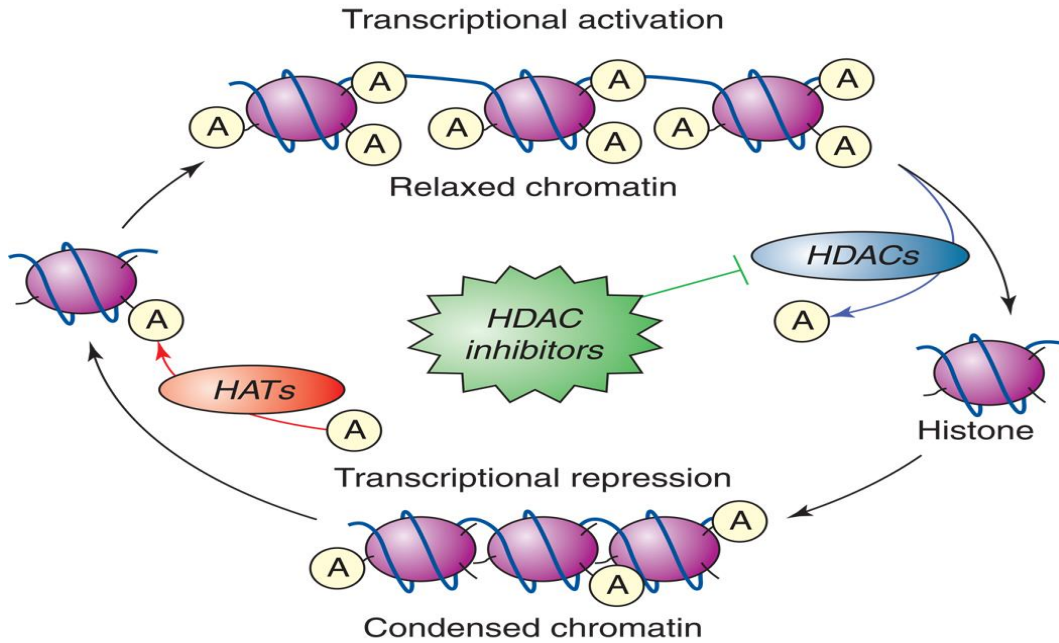
## 2.4. Epigenetik ve Histon Deasetilazlar (HDAC)

Genetik mutasyonlara ek olarak, epigenetik değişiklikler kanserin başlangıcında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Epigenetik değişiklikler, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın, gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik mekanizmaları başlıca, DNA metilasyonu, Histon modifikasyonları, kodlamayan RNA'lar ve kromatin düzeyindeki mekanizmalar olarak sınıflandırabiliriz (Hyman vd 2015). Epigenetik değişikliklerin paternlerindeki bozukluklar kanserde sıklıkla meydana gelmektedir ve epigenetik bozukluklar erken-evre tümörlerde ve benign neoplazmlarda sıklıkla gözlenen ilk değişim durumudur (Slingerland vd 2014).

Genomik DNA, ökaryotik hücrelerin çekirdeklerinde histon proteinleri ile sıkı bir biçimde paketlenmiş olarak bulunmaktadır. Genomik DNA'nın paketlenmesinden H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere 5 adet histon proteini sorumludur. Bu proteinler lizin ve arjinin aa'lerince zengin olduklarından pozitif yüklüdürler. Bu nedenle DNA'nın negatif yüklü olmasından dolayı, DNA'ya güçlü şekilde bağlanabilmektedirler. Histon proteinlerinden H2A-H2B ile H3-H4 ile dimer oluşturarak oktomer yapısı meydana gelir. Genomik DNA bu oktomer etrafında, 1.65 tur olacak şekilde 147 bç olarak sarılır ve nükleozom adı verilen yapı oluşur. H1 histon ise bağlayıcı histon olarak nükleozomun dış bölgesinde bulunur. Nükleozomlar kromatinin tekrarlayan temel birimleridir. Her histon koru, nükleozomdan dışarıya doğru uzanan amino-terminal kuyruğa sahiptir. Histonlar ve kuyrukları birtakım post-translasyonel modifikasyonlara maruz kalmaktadırlar (Spyropoulou vd 2013, Ververis vd 2013, Kreth vd 2014, Manal vd 2016).

DNA'nın ve histonlardaki aminoasitlerin kovalent modifikasyonları epigenetik gen regülasyonunun iki ana mekanizmasıdır. Bunlardan ilki, DNA metiltransferaz adı verilen enzim tarafından kontrol edilen DNA metilasyonudur. İkinci ana epigenetik mekanizma, histon proteinlerinin N-terminal uçlarının asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikütinasyon, sümoilasyon, ADP ribozilasyon, biotinilasyon ve diğer modifikasyonlar (deaminasyon, prolin izomerizasyon) tarafından post-translasyonel modifikasyonudur (Kreth vd 2014, Spyropoulou vd 2013). Gen ekspresyonundaki ve DNA yapısındaki rolleri, ve geriye çevrilebilir yapısından dolayı epigenetik değişiklikler, özellikle histon asetilasyonu, klinik denemelerde terapötik ilaç hedefi olarak kullanılmaktadır (Nagarajan ve Costello 2009).

Histon asetilasyonu, birbiriyle zıt olarak çalışan iki geniş enzim ailesi tarafından gerçekleştirilir: histon asetiltransferazlar (HATs) ve histon deasetilazlar (HDACs). Histon kuyruklarındaki amino uçlarının HAT'ler tarafından hiperasetilasyonu kromatin yapınının açılmasına ve böylece genin transkripsiyonuna ve aktivasyonuna neden olur. Buna karşılık, HDAC'ler tarafından bu asetil gruplarının deasetilasyonu kapalı bir kromatin yapınının oluşmasına ve genin transkripsiyonel olarak baskılanmasına neden olur (Zhang ve Zhong 2014) (Şekil 2.14). HDAC'lerin substratları sadece histonlar değil aynı zamanda hormon reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, DNA tamir enzimleri, inflamasyon mediatörleri, şaperon proteinleri ve hücre iskeleti proteinleri gibi histon-olmayan proteinlerdir (Bezecny 2014).



Page 35 of 35

TRENDS in Neurosciences

**Şekil 2.14** HAT ve HDAC'lerin transkripsiyonel aktivasyondaki rolü (Chuang vd 2009).

Fonksiyonel ve filogenetik kriterlere göre, HDAC'ler 4 sınıfa ayrılmaktadır: "Zn<sup>2+</sup>-bağımlı olanlar (sınıf I, II ve IV)" ve "Zn<sup>2+</sup>-bağımsız, nikotinamid-adenin-dinükleotid-bağımlı (NAD-bağımlı) (sınıf III)" olanlardır. Bu dört grup HDAC birbirinden yapı, enzimatik fonksiyon, hücresel lokalizasyon ve ekspresyon paternleri yönünden farklılık gösterirler. Bugüne dek bu dört ailede 18 HDAC tanımlanmıştır ve bunların 11 tanesi Zn<sup>2+</sup>-bağımlı olanlardır. Bu 11 HDAC kendi aralarında maya proteinlerine homoloji göstermelerine göre gruplandırılmıştır. Sınıf I HDAC'ler, HDAC 1, 2, 3 ve 8 olup, nükleer lokalizasyon gösterirler ve histonlara enzimatik aktiviteye sahiptirler. Sınıf IIa olanlar,

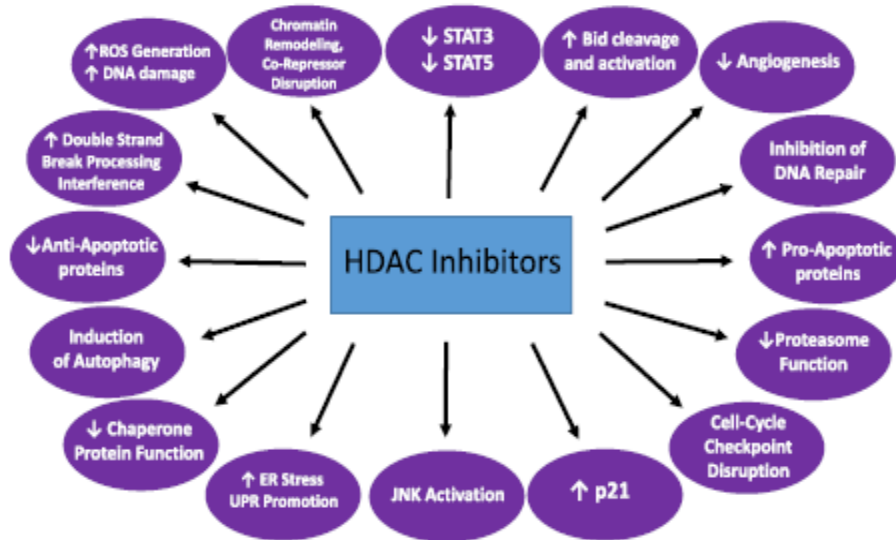
HDAC 4, 5, 7 ve 9'dur ve bu HDAC'ler nükleus ve sitoplazma arasında mekik dokurlar. HDAC 6 ve 10 sınıf IIb HDAC'lardır ve sitoplazmik lokalizasyon gösterirler. Bunların primer hedefleri histon-olmayan proteinlerdir. Sınıf IV HDAC olan HDAC 11, filogenetik olarak HDAC 3 ve 8 ile yakından ilişkilidir aynı zamanda sınıf II HDAC'lerin de bazı özelliklerine sahiptir (Giannini vd 2012, Ververis vd 2013, Zhang ve Zhong 2014, Bezecny 2014). Sınıf III üyeleri sirtüinler olarak adlandırılmaktadır ve SIRT1-7 arasındaki üyelerden oluşmaktadır (Tablo 2.3) (Losson vd 2016, Damaskos vd 2017).

**Tablo 2.3** Histon deasetilaz ailesi (Zhang vd 2017).

HDAC	Uzunluk (aa)	Lokalizasyon	Aktivite
<b>Sınıf I</b>			
HDAC 1	483	Nükleus	Deasetilaz
HDAC 2	488	Nükleus	Deasetilaz
HDAC 3	423	Nükleus	Deasetilaz
HDAC 8	377	Nükleus	Deasetilaz
<b>Sınıf IIa</b>			
HDAC 4	1084	Nükleus/Sitoplazma	Deasetilaz
HDAC 5	1122	Nükleus/Sitoplazma	Deasetilaz
HDAC 7	855	Nükleus/Sitoplazma	Deasetilaz
HDAC 9	1011	Nükleus/Sitoplazma	Deasetilaz
<b>Sınıf IIb</b>			
HDAC 6	1212	Sitoplazma	Deasetilaz
HDAC 10	669	Sitoplazma	Deasetilaz
<b>Sınıf III</b>			
Sirt 1	747	Nükleus/Sitoplazma	Deasetilaz
Sirt 2	389	Nükleus	Deasetilaz
Sirt 3	399	Mitokondri	Deasetilaz
Sirt 4	314	Mitokondri	ADP-riboziltransferaz
Sirt 5	310	Mitokondri	Demalonilaz
Sirt 6	355	Nükleus	Zayıf deasetilaz / ADP-riboziltransferaz
Sirt 7	400	Nükleus	Zayıf deasetilaz
<b>Sınıf V</b>			
HDAC 11	347	Nükleus/Sitoplazma	Deasetilaz

## 2.5. Histon Deasetilaz İnhibitörleri (HDACi)

Asetilasyon ve deasetilasyon arasındaki denge gen ekspresyonunun regülasyonunda önemli bir faktördür ve bu nedenle hücrenin akıbetinin kontrolüyle ilişkilidir. HAT inaktivitesi ve HDAC yüksek aktivitesi tümörögenезle ilişkilidir. Genetik mutasyonların aksine epigenetik değişiklikler geriye çevrilebilir olduğundan tedavi için ilgi çekici bir potansiyel hedefdir. Farmakolojik olarak, bir enzimi aktive etmektense inaktive etmek daha kolaydır. Bu nedenle, HDAC inhibisyonu antikanser stratejisi, klinik olarak büyük ilgi kazanmıştır. Bununla birlikte, HAT ve HDAC arasındaki dengesiz bozukluk tümör gelişimi için tek histon modifikasyonu değildir. HAT'lar ve HDAC'ler gen ekspresyonunda, proliferasyonda, migrasyonda, hücre ölümünde, DNA tamirinde, anjiyogenezde, inflamasyonda ve immün yanıtta görev alan histon-olmayan proteinlerin asetilasyonunu ya da deasetilasyonunu da değiştirirler. Bu histon-olmayan protein hedefleri, tümör ilerlemesi ve tedaviye dirençle muhtemelen ilişkili olabilmektedir. HDAC inhibitörlerinin (HDACi), hücre-döngüsü durdurulması, intrinsik ve ekstrinsik apoptotik mekanizmaları, mitotik hücre ölümünü, otofajik hücre ölümünü, reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu, anjiyogenezin inhibisyonunu, NK hücre-aracılı tümör immünitesinin artışı içerir çoklu mekanizmalar yoluyla efektif antikanser ajanı olabileceği gösterilmiştir (Shabason vd 2011) (Şekil 2.15).



**Şekil 2.15** Histon deasetilaz inhibitörlerinin etki mekanizması (Bose vd 2014).

HDACi'ler kimyasal yapılarına göre 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; "hidroksimatlar", "sislik peptidler", "benzamidler" ve "alifatik asitlerdir" (Bezecny 2014). HDACi'lerinin

temel etki mekanizması, HDAC'ların katalitik fonksiyonu için gerekli olan  $Zn^{2+}$  iyonuna bağlanmaları ve HDAC'ların katalitik etkinliğini baskılamalarıdır (Bezecny 2014). Her HDACi, aynı ölçüde tüm HDAC'ları inhibe edemez, bu nedenle HDACi'ler pan- veya class I-spesifik inhibitörler şeklinde gruplanabilir (Zhang ve Zhong 2014). Her 4 grupta da birçok HDACi bulunmaktadır fakat "Food and Drug Administration (FDA)" tarafından, kütanöz T-hücre lenfomanın tedavisi için bir hidroksimat grubu olan "vorinostat" 2006 yılında onaylanmıştır. Yine aynı hastalığın tedavisi için FDA tarafından 2009 yılında bir sislik peptid HDACi olan ve sınıf I HDAC üzerine etki gösteren "romidepsin" adlı ajan onaylanmıştır (Ververis vd 2013). Tablo 2.4'de HDACi sınıfları ve bu sınıflardaki HDACi'ler özetlenmiştir.

**Tablo 2.4** HDACi sınıfları ve bu sınıflara ait üyeler (Hrabeta vd 2014, Lee vd 2015, Shen vd 2016, Zhang vd 2017'den derlenmiştir).

Sınıf	HDACi	HDAC Hedefi
<b>Hidroksimatlar</b>	Trichostatin A (TSA)	Sınıf I, II ve IV
	SAHA (vorinostat)*	Sınıf I, II ve IV
	PXD-101 (belinostat)	Sınıf I, II ve IV
	4SC-201 (resminostat)	Sınıf I, II ve IV
	LBH589 (panobinostat)	Sınıf I, II ve IV
	Quisinostat	Sınıf I, II ve IV
	PCI24781 (Abexinostat)	Sınıf I, II ve IV
	ITF2357 (Givinostat)	Sınıf I ve II
	CBHA	HDAC 3
<b>Sislik Peptidler</b>	Depsipeptid (Romidepsin-FK228)*	Sınıf I
	Apicidin	Sınıf I
<b>Alifatik Asitler</b>	Valproik asit	Sınıf I ve IIa
	Fenil bütrat	Sınıf I ve IIa
	Bütrat	Sınıf I ve IIa
<b>Benzamidler</b>	MS-275 (Entinostat)	Sınıf I
	MGCD0103 (mocetinostat)	Sınıf I ve IV
	CI-994 (Acetyldinaline)	Sınıf I

\*FDA onaylı HDACi'ler.

HDACi'lere hücre sel cevap transkripsiyonel ve transkripsiyonel olmayan yönden gerçekleştiği için karmaşık bir süreçtir. HDACi'ler histonların ve histon olmayan proteinlerin asetilasyonlarını HDAC'leri baskılayarak arttırlar. Bunun sonucunda, hücrede artan ya da azalan gen ekspresyonu meydana gelmektedir. HDACi'ler transkripsiyon faktörleri ya da ısı-şok proteinleri gibi histon olmayan proteinlere etki ederek, transkripsiyonu indirekt yoldan değiştirebilir ya da apoptoz, hücre-döngüsünün durdurulması, nekroz, otofaji, farklılaşma, migrasyon gibi hücre sel süreçleri düzenleyebilmektedir (Ververis vd 2013).

HDACi'lerin malign hücre hatlarında, siklin-bağımlı kinaz inhibitörü p21'i upregüle ederek ve sonrasında siklin/CDK komplekslerinin oluşumlarını engelleyerek, hücrenin G1 fazında durmasına neden olduğu bulunmuştur. Ek olarak, HDACi'ler siklinlerin downregülasyonu yoluyla, siklin-bağımlı kinaz aktivitesinin azalmasına neden olarak, Rb defosforilasyonuna ve indirekt olarak E2F transkripsiyon aktivitesine etki etmektedir. Birçok *in vitro* çalışmada, HDACi'ler ile DNA'ya hasar verici ajanlar veya iyonize radyasyonun kombine uygulamasının DNA çift-zincir kırıklarına neden olduğu gösterilmiştir (Ververis vd 2013).

HDACi'lerin solid ve hematolojik malignansilerin her ikisinde de apoptozu hem transkripsiyon-bağımlı hem de transkripsiyon-bağımsız mekanizmalarla indüklediği gösterilmiştir. HDAC inhibisyonu hücre ölümünde pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengede rol oynamaktadır. Ekstrinsik apoptoz yolağındaki ölüm reseptörleri ve ligandları HDACi'ler tarafından upregüle edilerek, TRAIL-dirençli malign hücrelerde TRAIL duyarlılığını arttırmaktadır. HDACi'ler, intrinsik apoptoz yolağında Bcl-2 ve Bcl-1 gibi mitokondriyal bütünlüğü sağlayan proteinleri downregüle ve Bim, Bak, Bax gibi pro-apoptotik proteinleri upregüle etmektedir. Malign hücrelerdeki hiperasetilasyon durumu p53 stabilizasyonuna, hücre döngüsünün durmasına ve pro-apoptotik genlerin ekspresyonlarının artmasına neden olduğu belirtilmektedir (Ververis vd 2013).

Yukarıda belirtilen etkileri gerçekleştirme yeteneği olan HDACi'ler malign hücrelerde apoptoza, DNA hasarına ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olduklarından dolayı efektif anti-kanser ilaçlar olarak kullanılabilirler. Dikkate değer bir şekilde, HDACi'lerin normal hücrelerden ziyade tranforme olmuş hücrelere seçicilik gösterdiği rapor edilmiştir. Tümör hücrelerine doğrudan etkilerinin yanında, konağın immün yanıtını

ve tümörün damar oluşumunu regüle ederek tümör büyümesine indirekt olarak etki göstermektedir (Ververis vd 2013). Hücre döngüsünün durdurulması, farklılaşma, senesens, intrinsik ve ekstrinsik apoptoz, mitotik hücre ölümü, otofajik hücre ölümü, reaktif oksijen türlerinin üretiminin indüklenmesi ve anjiyogenez, metastaz, tümör immünitesinin inhibisyonuna neden olmalarından dolayı HDACi'ler efektif terapötik anti-kanser ajanı olarak düşünülmektedir. Kansere hücrelerindeki bu farklı etkiler, HDACi'lerin tek ya da diğer terapilerle kombine olarak uygulanması yönünden çokça ilgi çekmektedir (Lee vd 2017). GBM'in de içinde bulunduğu farklı tümör tiplerinin tedavisi için, HDAC inhibitörlerinin tekli ve diğer ajanlarla kombine uygulaması deneme aşamasındadır.

## 2.6. Hipotez

Glioblastoma multiforme en agresif beyin tümörüdür ve bu tümörün tedavisindeki yaklaşımlar büyük önem taşımaktadır. Tedavi uygulamaları, tümörün yeniden nüksetmesi ve kan-beyin bariyerinin güçlü etkisinden dolayı sıklıkla etkisiz kalmaktadır. Ayrıca uygulanan tedavilere tümörlerin direnç kazanması da önemli bir problemdir. Bu nedenle, GBM'in tedavisi için yeni uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır. GBM'de apoptotik yolağın ciddi şekilde baskılandığı gözlenmektedir. Bu nedenle, apoptotik yolağı tekrar aktive edebilecek pro-apoptotik ligand tedavileri GBM tedavisi için önemli aday yöntem olarak görülmektedir. HDACi'lerin bir bölümü kan-beyin bariyerini aşabilecek karakterde olduğundan GBM tedavisi için güncel ajan olarak düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, HDACi'lerin önemli bir pro-apoptotik ligand olan TRAIL ile birlikte çalışabildiğini ve TRAIL-dirençli hücrelerde TRAIL duyarlılığını arttırdığı göstermiştir. Bununla birlikte, HDACi'lerin apoptoz yolağındaki etkilerinin moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu bağlamda çalışmamızın hipotezi;

- HDACi'lerin GBM hücre hatlarında TRAIL duyarlılığını arttırarak, bu hücrelerde meydana gelecek apoptoz olayını ve bu olayda rol oynayan genlerin ekspresyonlarını etkileyeceğidir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Gereç ve yöntemler kısmı 14 basamak altında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Hücre Hatlarının Temini, Çoğaltılması ve Saklanması

Çalışmamızda insan glioblastom LN18, T98G, U87MG, U373, insan embriyonik böbrek hücresi 293T ve insan fibroblast BJ hücreleri kullanıldı. Glioblastom ve 293T hücre hatları Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin Kanseri Araştırma ve Tedavi Laboratuvarı'nın "Amerikan Tissue Type Culture Collection" (ATCC, ABD)'dan elde ettiği hücre hatları stoğundan temin edildi. BJ hücreleri Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Doç. Dr. Tamer ÖNDER'in Kök Hücre Araştırma Laboratuvarı'nın stoklarından temin edildi. Tüm hücreler %10 fetal sığır serumu (Invitrogen, ABD) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco, ABD) içeren DMEM (Gibco, ABD) besiyerinde, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edildi.

Hücre hatlarının kültür edilmesinde aşağıdaki basamaklar uygulandı:

1. -80°C'de kriyo tüplerde saklanan hücreler, dışarı çıkarıldı.
2. Kriyo tüpler daha önceden 37°C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirildi ve çözülmesi sağlandı.
3. Su banyosunda çözülen hücrelerin kriyo tüpleri, herhangi bir kontaminasyon olmaması açısından %70'lik etil alkolle silindikten sonra, daha önceden ultraviyole ile sterilize edilmiş ve zemini %70'lik etil alkolle silinmiş "Sınıf II hava akımlı çalışma kabinine" (NuAire, ABD) alındı.

4. 15 ml'lik santrifüj tüplerine 5 ml DMEM besiyeri eklendi. Kriyo tüplerin kapakları açılarak 1 ml'lik pipetle, hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
5. Aktarma işleminden sonra, oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj (Hettich, Almanya) edildi.
6. Santrifüj işleminden ardından supernatan kısım steril pastör pipeti yardımıyla çekilerek sadece hücre peleti elde edildi.
7. Peletin yoğunluğuna bağlı olarak üzerine 1-5 ml besiyeri eklendi.
8. Bu sırada, üzerlerine hücrelerin isminin, pasaj numarasının ve ekim tarihinin yer aldığı 100 mm'lik hücre kültür kapları hazırlandı. Bu kapların içerisine 8 ml DMEM besiyeri eklendi.
9. DMEM besiyeri içerisinde bulunan hücreler pipet yardımıyla iyice homojenize edilerek, bir önceki basamakta hazırlanmış olan bir ya da birden fazla hücre kültür kabına ekildi.
10. Hücreler bulunduğu kültür kapları 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li nemli inkübatöre (NuAire, ABD) yerleştirildi.
11. Hücre hatlarının her gün invert mikroskop (Nikon, Japonya) altında takibi yapıldı.
12. Kültür kapları içerisindeki hücrelerin yoğunlukları %80 – 85 civarına ulaştığında pasaj işlemi gerçekleştirildi.
13. Hücrelerin saklanması aşamasında; kriyo tüplerde 1x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde, hücre peletinin miktarına bağlı olarak 1:9 oranında "Dimetil Sülfoksit (DMSO):DMEM" karışımı hazırlanıp, hücre peletinin üzerine uygulandı. Kriyo tüplere aktarılan hücreler, içerisinde izopropanol bulunan saklama kutularına alınarak -80°C'ye kaldırıldı.

### 3.2. Hücre Sayımı

Hücre sayım yöntemi tripan mavisi dışlama yöntemine göre gerçekleştirildi. Bu yöntem, canlı ve ölü hücrelerin ayrımını yapabildiğinden, canlı hücreler tripan mavisi ile boyanmaz ve mikroskop altında parlak olarak görülürler. Ölü hücreler ise boyayı hücre içerisine aldıklarından mikroskop altında koyu olarak görülürler. Hücreler her bir deney için istenilen sayıda aşağıdaki işlem sırası uygulanarak sayıldı:

1. Hücrelerin bulunduğu petriyer CO<sub>2</sub> inkübötüründen alındı ve invert mikroskop altında yoğunluk ve canlılık durumları kontrol edildi.

2. Yoğunluğu uygun olan hücreler kabine alınarak pastör pipeti yardımıyla besiyerleri çekildi.
3. Besiyerleri çekilen petrilere, enzimatik etkinliğin artması ve hücrelerden kaynaklanan debrisin uzaklaştırılması amacıyla 4 ml Fosfat Buffer Salin (PBS) (Gibco, ABD) eklendi.
4. PBS pastör pipeti yardımıyla uzaklaştırıldı. Her bir petriye 1 ml %0,05'lik Tripsin-EDTA (Gibco, ABD) eklendi. Enzimatik aktivitenin gerçekleşmesi için petrilere CO<sub>2</sub> inkübatöre kaldırıldı.
5. 1-4 dk inkübasyondan sonra hücrelerin petri yüzeyinden kalkıp kalkmadıkları kontrol edildi.
6. Tripsin aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla petrilere 4 ml DMEM eklendi.
7. Pipet yardımıyla hücrelerin petri zemininden tamamen kalkması sağlandı ve hücreler 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı.
8. Tüpler oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
9. Santrifüj işleminin ardından kabin içerisine alınan tüplerin supernatan kısımları pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve peletin yoğunluğuna göre 4-10 ml arası DMEM besiyeri eklendi. Pipet ile pipetaj yapılarak hücrelerin homojen hale gelmesi sağlandı.
10. Steril 1.7 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 50 µl tripan mavisini ve 50 µl hücre süspansiyonu eklenerek 1:1 oranında karışım elde edildi.
11. Bu karışımdan 10 µl alınarak, hücre sayımında kullanılan aynalı Neubauer lamı (Marienfeld-Superior, Almanya) üzerine aktarıldı (Şekil 3.1). Aktarılan karışımın üzeri lamel ile kapatılarak invert mikroskopta 10X büyütmede sayım gerçekleştirildi.
12. Neubauer lamının 4 büyük alanı sayıldı (Şekil 3.2). Aşağıda belirtilen formüle göre hücre konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml)} = \frac{\text{Hücre sayısı} \times 10.000}{\text{Alan sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü}}$$



80°C'de saklandı. Çalışma esnasında her bir ana stoktan DMSO ile dilüsyon yapılarak ara stok hazırlandı ve çalışma stoğu elde edildi. Her deney için yeni çalışma stoğu hazırlandı. Tablo 3.1'de her bir HDACi'nin ana stok ve ara stok konsantrasyonları özetlenmiştir.

**Tablo 3.1** HDACi'lerin moleküler ağırlıkları, ana ve çalışma stok konsantrasyonları.

HDACi	MW (g/mol)	Ana Stok	Çalışma Stoğu
<b>Vorinostat</b> (SAHA)	264.32	10 mM	1 mM
<b>MS-275</b> (Entinostat)	376.4085	100 mM	1 mM
<b>Belinostat</b> (PXD-101)	318.348	10 mM	1 mM
<b>CBHA</b>	222.2	10 mM	1 mM
<b>Romidepsin</b> (FK228)	540.7	5 mM	1 mM

### 3.4. 293T Hücre Hattından TRAIL Üretimi

TRAIL üretimi için; 293T hücreleri, hücre dışına salgılanabilir TRAIL'i içeren vektör ile daha önceden tanımlandığı gibi Fugene Transfeksiyon Kiti (Promega, ABD) kullanılarak transfekte edildi (Bağcı-Onder vd 2013).

Transfeksiyon işlemine başlamadan önce 293T hücreleri %80 konfluent duruma getirildi. İlk gün, 293T hücreleri 10 cm'lik hücre kültürü petrilere  $2,5 \times 10^6$  olacak şekilde ekildi. Hücre ekildikten 24 saat sonra, her kültür petrisi için 20 µl Fugene ve 180 µl OptiMEM (Promega, ABD) birleştirilerek karışım hazırlandı. Bu karışıma, 200 µl OptiMEM içerisinde 5000 ng TRAIL vektör DNA'sı içeren karışım eklendi. Hazırlanan bu karışım 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, pipet yardımıyla 293T hücrelerine damlatılarak uygulandı. 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler PBS ile yıkandı ve hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılarak yerine 8 ml serumsuz besiyeri eklendi. Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra, hücrelerin besiyerleri toplandı ve bir sonraki gün ikinci kez toplama işlemi için hücrelere tekrar serumsuz besiyeri eklendi. Ertesi gün, petrilereki besiyeri tekrar toplandı. TRAIL eldesi için, 15 kD'a kadar

olan proteinleri geçirebilen filtreli spin kolon (Millipore, USA) kullanıldı. Filtreli spin kolonlara daha önceden toplanmış besiyerleri aktarıldı ve 4°C'de 3800 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj edildi. Kolonun üzerinde kalan kısım mikropipet yardımı ile toplandı ve TRAIL konsantrasyonu ticari olarak elde edilmiş olan TRAIL Human ELISA Kit (Abcam, Birleşik Krallık) yardımıyla, kitin ilgili protokolüne göre gerçekleştirildi. TRAIL ELİZA, 540 nm'de Synergy H1 Reader (Biotek, ABD) cihazı ile okutularak konsantrasyonu hesaplandı. Elde edilen TRAIL kullanılabilecek -80°C'de saklandı. TRAIL ELİZA yöntemi, Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Kanseri Araştırma ve Tedavi Laboratuvarı'nda doktora öğrencisi Ahmet CİNGÖZ ile birlikte gerçekleştirilerek, TRAIL konsantrasyon sonuçları temin edildi.

### **3.5. HDACi'lerin ve TRAIL'in GBM ve BJ Hücre Hatlarına Uygulanması**

Hücre canlılık analizleri gerçekleştirilmeden önce kullanacağımız HDACi'lerin ve TRAIL'in GBM hücrelerine ve BJ hücrelerine uygulanacak konsantrasyonları belirlendi.

Vorinostat, MS-275, Belinostat, CBHA ve Romidepsin için literatür araştırması yapılarak ve ilgili bilgilendirme kağıtları incelenerek konsantrasyonlar belirlendi. Her bir ilaç için; LN18, T98G, U87MG, U373 ve BJ hücre hatlarına uygulanmak üzere 0.3125, 0,625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 µM'lık konsantrasyonlar 1 mM'lık çalışma stoğundan oluşturuldu.

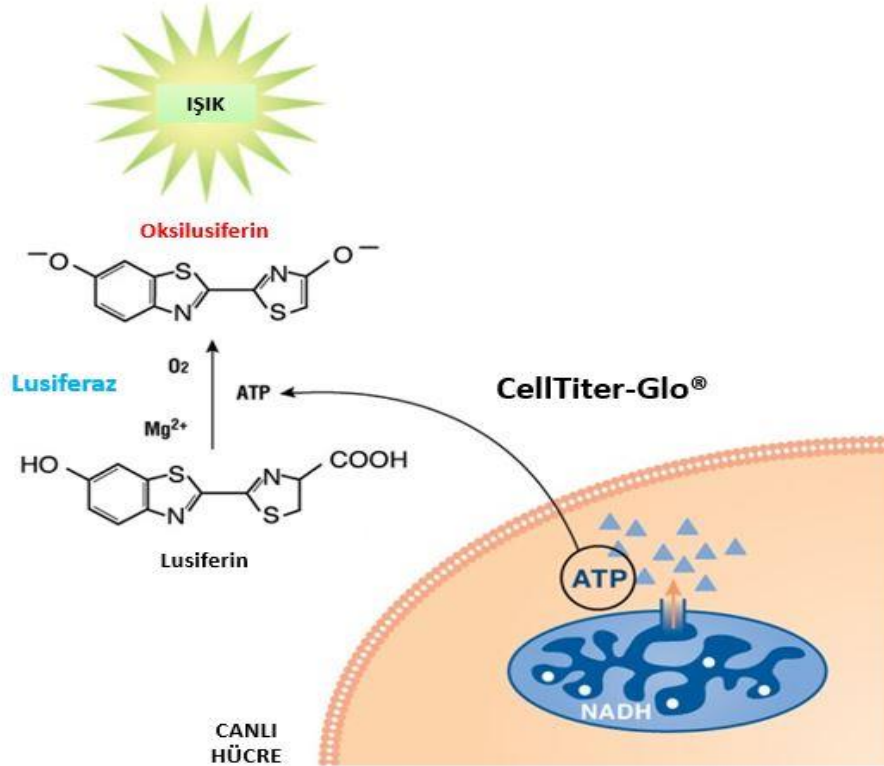
TRAIL için ise, Doç. Dr. Tuğba BAĞCI-ÖNDER'in daha önceki deneyimi ve verilerine dayanarak her bir GBM hücre hattı için ayrı konsantrasyon belirlendi. Doç. Dr. Tuğba BAĞCI-ÖNDER'in henüz yayınlanmamış verilerine göre; LN18 ve T98G hücre hattı TRAIL-duyarlı, U87MG hücre hattı TRAIL-orta derecede dirençli, U373 hücre hattı ise TRAIL-dirençli olarak gözükmektedir. Buna göre, TRAIL konsantrasyonları her bir hücre hattı için Tablo 3.2'de belirtilen konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

**Tablo 3.2** GBM ve BJ hücre hatları için belirlenen TRAIL konsantrasyonları.

Hücre Hattı	TRAIL Konsantrasyonu (ng/ml)
LN18	0, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200
T98G	0, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200
U87MG	0, 50, 75, 100, 200, 250, 500
U373	0, 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000
BJ-1	0, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200

### 3.6. Hücre Canlılık Analizleri

Hücre canlılık analizleri için Cell Titer-Glo (CTG) Luminesan Hücre Canlılık Analiz Kiti (Promega, ABD) kullanıldı. CTG kitinin çalışma prensibi; metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir indikatörü olan Adenozin triFosfat (ATP)'nin miktar olarak lusiferaz reaksiyonu aracılığıyla belirlenmesi, böylelikle canlı hücre sayısının tanımlanmasıdır (Şekil 3.3). CTG kimyasalı, hücrelerden ATP'nin salınması için hücre membranı parçalar ve simultane olarak endojen ATPaz'ları inhibe eder, aynı zamanda biyoluminesan reaksiyonunun gerçekleşmesi için içerisinde lusiferin, lusiferaz ve diğer kimyasallar bulunmaktadır. CTG analizi, kitin içerisindeki kimyasalların ekonomik olarak kullanımı açısından, üretici firmanın protokolü modifiye edilerek aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

**Şekil 3.3** CTG analizi çalışma prensibi (WEB\_6).

1. Glioblastom ve BJ hücreleri, siyah renkli, sadece kuyucuk tabanları şeffaf, steril 96-kuyucuklu hücre kültür kaplarına (Gibco, ABD), kuyucuk başına  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler tutunmaları için 24 saat süresince inkübasyona bırakıldı.
2. İnkübasyon sonrasında, hücrelerin içinde bulunduğu DMEM uzaklaştırılıp yerine kontrol için yeni DMEM, TRAIL ve HDACi'ler için hazırlanmış olan konsantrasyonlar ilgili kuyucuklara uygulandı. TRAIL yarı ömrünün az olmasından dolayı hücre hatlarına 24 saat boyunca, HDACi'ler ise 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandı. Kombine denemeler için ise belirlenen dozlar 24 saat boyunca uygulandı.
3. CTG kiti  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılıp çözdürüldükten sonra, 10 ml CellTiter-Glo Tamponu steril bir enjektör yardımıyla CellTiter-Glo Substrat şişesinin içine aktarıldı. Hazırlanan 10 ml'lik karışım, mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılarak küçük hacimler halinde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı. Deney için gerekli olan miktar oda sıcaklığında bekletildi.
4. İlgili inkübasyonların ardından, 96-kuyucuklu plakalar oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
5. Kuyucuk başına 4  $\mu\text{l}$  CTG kimyasalı + 40  $\mu\text{l}$  DMEM karışımı hazırlandı ve çoklu pipet yardımıyla kuyucuklara uygulandı.
6. 96-kuyucuklu plakalar Synergy H1 Reader (Biotek, ABD) cihazında aktarıldı. Cihaz içerisinde 2 dk çalkalama yapıldı ve 8 dk boyunca karanlıkta bekletildi.
7. İnkübasyonların ardından cihazda okuma işlemi gerçekleştirildi.
8. Hücre canlılık yüzdesi; doz uygulanmış örneklerdeki canlı hücrelerin kontrole göre karşılaştırılması ile Excel (versiyon 2016, Microsoft, ABD) programında analiz edildi.

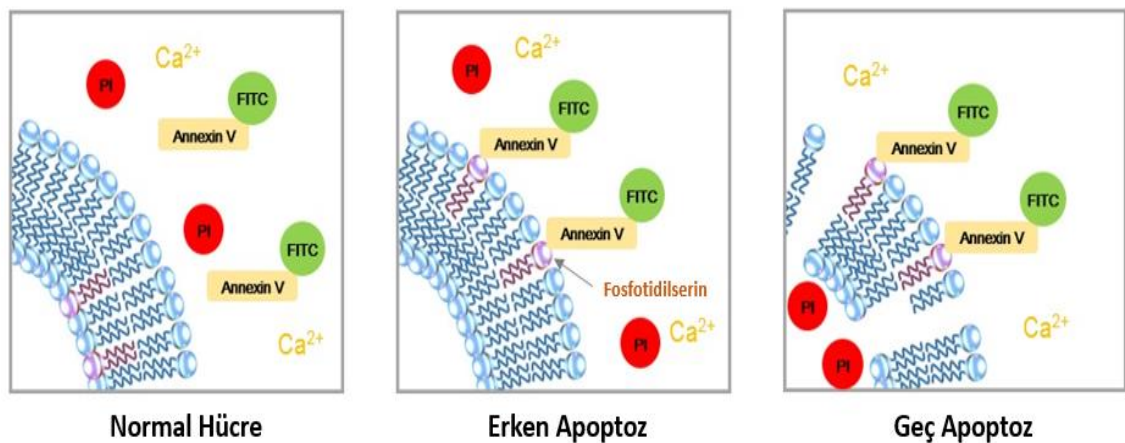
### **3.7. FITC Anneksin V / Propidyum İyodür (PI) Yöntemi ile Apoptozun Gösterilmesi (Akım-sitometri Yöntemi)**

Apoptoz bilindiği üzere doku homeostazının sağlanmasının yanında embriyonik gelişim boyunca meydana gelen normal bir fizyolojik süreçtir. Apoptotik program, plazma membran asimetrisinin ve tutunmasının, sitoplazma ve nükleus kondenzasyonu ve DNA'nın internükleozomal olarak parçalanmasını içeren belirli morfolojik özellikleri içermektedir. Plazma membranının kaybı ilk olarak meydana gelen değişikliklerdendir. Apoptotik hücrelerde, membran fosfolipidi olan fosfatidilserin (PS) plazma membranının



iç yüzeyinden dış yüzeyine transloke olmaktadır. Anneksin V, PS'ye yüksek afinite gösteren, 35-36 kDa büyüklüğünde  $Ca^{2+}$  bağımlı fosfolipide bağlanan bir proteindir ve plazma membranının dış yüzeyinde PS içeren hücelere bağlanır. Anneksin V, FITC içeren florokromlarla konjuge edilebilmektedir. FITC konjuge edilen bu form, PS'ye yüksek afinitesini korumaktadır ve apoptoza uğrayan hücelerin akım sitometri yöntemi ile tayini için hassas bir prob görevi görmektedir. Apoptozun erken dönemlerinde PS'nin membran dışına yönelmesi gerçekleştiğinden, FITC Anneksin V boyaması, DNA fragmentasyonu gibi nükleer değişikliklere dayanan analiz yöntemlerine göre apoptozu erken dönemde saptayabilmektedir.

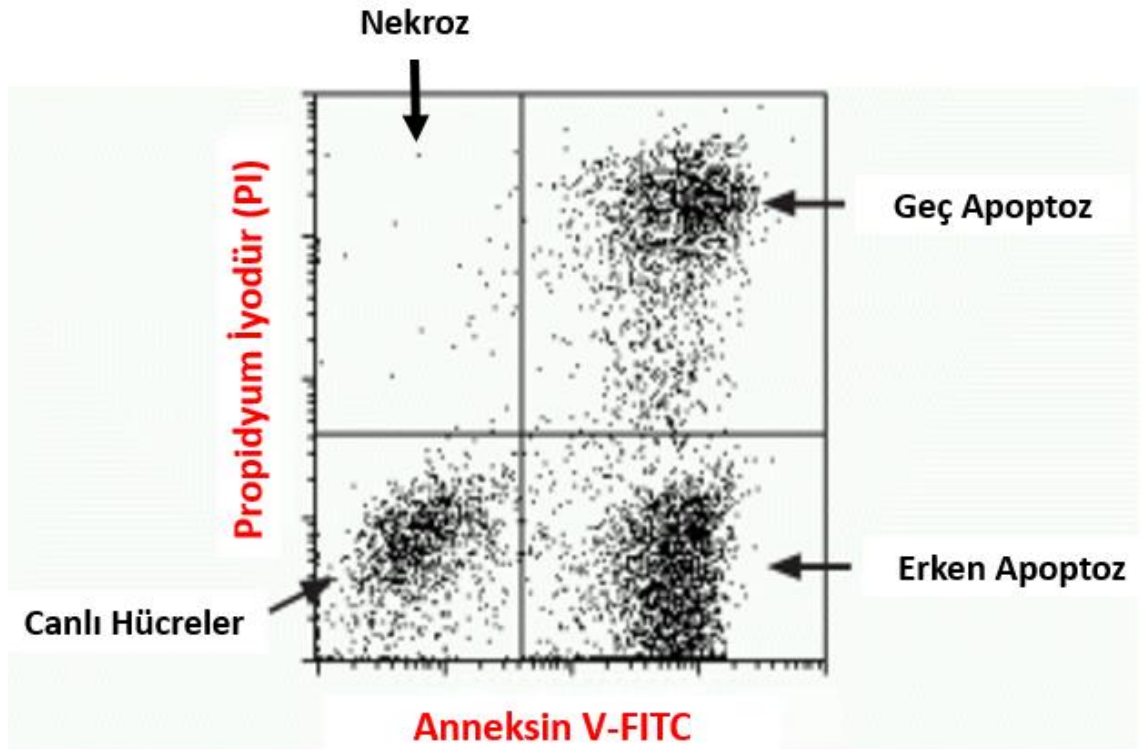
FITC Anneksin V boyaması, erken apoptozda meydana gelen hücre membran bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak çalışsa da, bu süreci geç apoptoz ya da nekroz süreçleri takip etmektedir. Bu nedenle, FITC Anneksin V boyaması, genellikle PI gibi boyalarla birlikte kullanılmaktadır. Canlı hücelere PI boyasını hücre içine almazken, ölü ya da hasar görmüş hücelerin membranları PI boyasına geçirgendir (Şekil 3.4). FITC Anneksin V / PI boyamasına göre; canlı hücelere Anneksin V ve PI negatif, erken apoptozda bulunan hücelere Anneksin V pozitif ve PI negatif, geç apoptozdaki hücelere veya ölü hücelere Anneksin V ve PI pozitif, nekrotik olarak ölen hücelere ise Anneksin V negatif ve PI pozitif olarak düşünülmektedir (Tablo 3.3). Boyama sonrasında hücelere akım sitometri yöntemi ile analiz edilmektedir. Analiz sonucu akım sitometride oluşan görüntü Şekil 3.5'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.4** FITC Anneksin V / PI boyama mekanizması (WEB\_7).

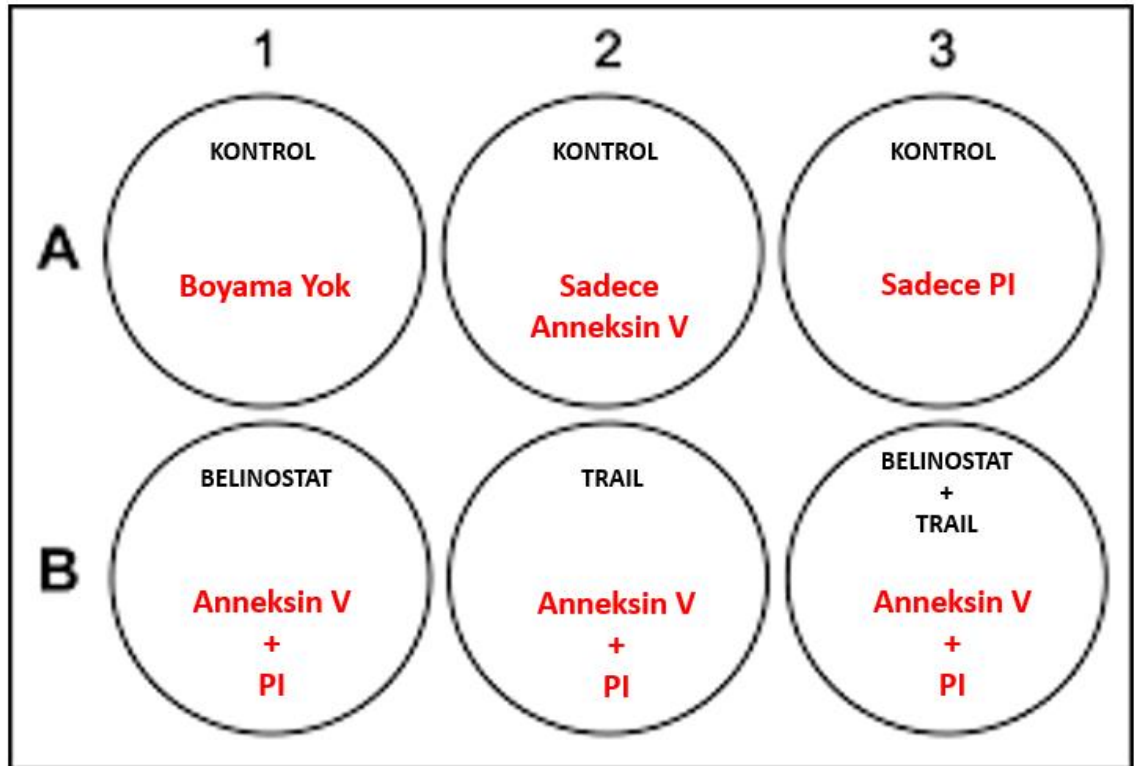
**Tablo 3.3** FITC Anneksin V / PI boyamasına göre hücrelerin analizi.

Hücre Durumu	Anneksin V	PI
Canlı Hücre	-	-
Erken Apoptoz	+	-
Geç Apoptoz	+	+
Nekroz	-	+

**Şekil 3.5** FITC Anneksin V / PI boyaması sonucu akım sitometri cihazında oluşan histogram görüntüsü (WEB\_8).

FITC Anneksin V / PI kiti 3 adet kimyasal içermektedir. Bunlar; "FITC Anneksin V", "Propidyum iyodür" ve "10X Anneksin V Bağlayıcı Tampon"dur. 10X Anneksin V bağlayıcı tampon 0.1 M Hepes/NaOH (pH: 7.4), 1.4 N NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>'den oluşmaktadır. Deney aşamasında distile su ile dilüe edilerek 1X konsantrasyonda çalışılması istenmektedir. FITC Anneksin V / PI kiti aşağıdaki protokole göre uygulandı.

1. FITC Anneksin V / PI deneyi, Belinostat ve Romidepsin HDACi'lerinin TRAIL ile kombine denemeleri için uygulandı.
2. T98G, U87MG ve U373 GBM hücreleri 6-kuyucuklu hücre kültürü kaplarına, kuyucuk başına  $4 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler tutunmaları için 24 saat süresince inkübasyona bırakıldı.
3. Hücreler 6-kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten sonra, kültür kabı şu şekilde dizayn edildi (Şekil 3.6):



**Şekil 3.6** FITC Anneksin V / PI deneyi için 6-kuyucuklu hücre kültür kabı düzeni.

4. 24'lik inkübasyondan sonra hücelere Belinostat ve Romidepsin tek başına, ve de TRAIL ile kombine olarak uygulandı.
5. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyonun ardından hücrelerin besiyerleri çektirilmeden mikropipet yardımıyla 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Ardından kuyucuk başına 500 µl olacak şekilde hücelere %0,05'lik Tripsin-EDTA eklendi. Hücrelerin kalkması sağlandıktan sonra, hücreler mikropipet yardımıyla besiyerleri toplanmış olan 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
7. Tüpler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

8. Santrifüj sonrasında supernatan kısım atıldıktan sonra hücre peletlerinin üzerine 4 ml PBS eklendi ve tekrar 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Bu basamak 2 kez tekrar edildi.
9. Santrifüj işleminden sonra kalan hücre peletleri üzerine 1 ml 1X Anneksin V bağlayıcı tampon eklendi.
10. Bu solüsyondan 100 µl alındı ve steril 1.7 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
11. 100 µl solüsyon üzerine 5 µl Anneksin V ve 5 µl PI eklendi.
12. Tüpler nazikçe vortekslendi ve oda sıcaklığında, karanlık ortamda 15 dk inkübasyona bırakıldı.
13. İnkübasyonun ardından tüplere 400 µl 1X Anneksin V bağlayıcı tampon eklendi.
14. Hazırlanan örneklerden 500 µl alınıp, steril akım sitometri tüplerine aktarıldı.
15. Örneklerin 1 saat içerisinde BD Accuri C6 akım sitometri cihazında (Becton Dickinson, ABD) analiz edilmesi sağlandı.
16. Örnekler akım sitometri cihazında 5 dk boyunca analiz edildi.

### 3.8. GBM Hücrelerinden RNA İzolasyonu

T98, U87MG ve U373 GBM hücrelerinden total RNA izolasyonu "Macherey-Nagel RNA izolasyon kiti" (MN, Almanya) yardımıyla gerçekleştirildi. Hücreler ilk olarak 6-kuyucuklu hücre kültürü kaplarına  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekildi ve tutunmaları için 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, besiyerleri çektirilen hücrelere kontrol grubu için 3 ml DMEM eklendi. Romidepsin HDACi için; T98G, U87MG ve U373 hücre hattı için son hacim 3 ml olacak şekilde 0.3125 µM konsantrasyon hazırlandı ve hücrelere uygulandı. Belinostat için ise son hacim 3 ml olacak şekilde T98G ve U87 hücre hattı için 1.25 µM, U373 hücre hattı için ise 5 µM'lık konsantrasyon uygulandı ve hücreler 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından besiyerleri çekilen ve 3 ml PBS ile yıkanan hücreler 500 µl Tripsin uygulanarak kaldırıldı. Tripsinin etkisini yok etmek amacıyla kuyucuklara 2 ml DMEM eklendi. Kaldırılan hücreler, 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında supernatan kısım çektirildi. Kalan pelet kısmına aşağıda belirtilen kit protokolü uygulanarak RNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi.

1. Tüplerin içerisindeki kalan peletin üzerine kitle birlikte sağlanan 350 µl RA1 Tamponu ve 3.5 µl β-merkaptoetanol eklendi. Kuvvetlice vorteksenerek peletle birlikte karışması sağlandı.
2. Oluşan lizat, kitle birlikte sağlanan ve 2 ml toplama tüpü içerisinde bulunan mor renkli Nucleospin filtrele aktarıldı.
3. Nucleospin filtreler 11.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüj edildi.
4. Santrifüj işleminden sonra Nucleospin filtreler atıldı ve toplama tüpü içerisindeki lizata 350 µl %70 etanol ilave edildi. Mikropipet yardımıyla pipetleme yapılarak karışımın homojen hale gelmesi sağlandı.
5. Oluşan lizat, kitle birlikte sağlanan ve 2 ml toplama tüpü içerisinde bulunan açık mavi renkli Nucleospin RNA kolonlara aktarıldı.
6. Nucleospin RNA kolonlar 30 sn boyunca 11.000 x g'de santrifüj edildi.
7. Santrifüj işleminden sonra toplama tüpleri atılarak kolonlar 2 ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
8. Kolonlara kitle birlikte sağlanan 350 µl MDB kimyasalı eklendi.
9. Kolonlar 1 dk boyunca 11.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra toplama tüpleri atıldı ve kolonlar temiz 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi.
10. Temiz, steril 1.7 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde DNaz reaksiyon karışımı hazırlandı. Her bir örnek için 10 µl rDNaz ve 90 µl Reaksiyon Tamponu karışımı hazırlandı. Kolonların tam ortasına bu karışımdan 90 µl uygulandı ve kolonlar 15 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. İnkübasyonun ardından kolonlara 200 µl RAW2 Tamponu ilave edildi.
12. Kolonlar 30 sn boyunca 11.000 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra toplama tüpleri atıldı ve kolonlar temiz 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi.
13. Santrifüj işleminden sonra kolonlara 600 µl RA3 Tamponu eklendi.
14. Kolonlar 2 dk boyunca 11.000 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra toplama tüpleri atıldı ve kolonlar temiz 1.7 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi.
15. Kolonların tam ortasına 60 µl RNaz içermeyen su ilave edildi.
16. Kolonlar 1 dk boyunca 11.000 x g'de santrifüj edildi.
17. Santrifüj işleminden sonra kolonlar atıldı ve mikrosantrifüj tüpleri içerisinde total RNA izole edilmiş oldu. Tüplerin üzerine gerekli notlar alınarak etiketleme işlemi yapıldı.
18. RNA konsantrasyonu Nanodrop (Thermo, ABD) cihazında ölçülerek konsantrasyonu belirlendi.
19. RNA'lar bir sonraki işlem için kullanılabilecek şekilde -80°C'de saklandı.

### 3.9. Total RNA Örneklerinden Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Kontrol ve doz grubu uygulanmış hücrelerden elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi için; "Random Hexamer" (Invitrogen, ABD), "dNTP" (Invitrogen, ABD), "MMLV Revers Transkriptaz Enzimi" (Invitrogen, ABD), "RNAsin" (Promega, ABD), "DTT" (Invitrogen, ABD), "5X First Strand Tamponu" (Invitrogen, ABD) kimyasalları ve "DNaz/RNaz içermeyen su" (H<sub>2</sub>O, Roche, Almanya) kullanıldı. Protokol aşağıda belirtilen sırayla gerçekleştirildi.

1. İzole edilen RNA örnekleri -80°C'den çıkartıldı ve buzun üzerine alındı.
2. Daha önce Nanodrop cihazında konsantrasyonları ölçülen RNA'lardan, cDNA sentezi için elimizde 1000 ng konsantrasyon olacak şekilde hesaplama yapıldı.
3. Steril 0.25 ml'lik PCR tüpüne Tablo 3.4'de belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

**Tablo 3.4** cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

MATERYAL	GEREKLİ HACİM
dNTP (2 mM)	2.5 µl
Random Hexamer	1 µl
RNA	Değişken (1000/RNA konsantrasyonu)
dH <sub>2</sub> O	13 – RNA miktarı
<b>SON HACİM</b>	<b>16.5 µL</b>

4. Hazırlanan reaksiyon karışımı konvansiyonel PCR cihazına yerleştirildi ve 65°C'de 5 dk boyunca inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda PCR tüpleri hemen buzun üzerine alındı.
6. Örnekler buzun üzerinde beklerken, revers transkriptaz reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım elimizde olan örnek sayısı kadar hazırlandı (Tablo 3.5).

**Tablo 3.5** cDNA sentezi için revers transkriptaz reaksiyon karışımı.

MATERYAL	GEREKLİ HACİM
5X First Strand Tamponu	5 µl
DTT (0.1 M)	2 µl
RNAsin	0.5 µl
<b>SON HACİM</b>	<b>7.5 µL</b>

7. Buzun üzerinde bulunan PCR tüplerine 7.5 µl revers transkriptaz reaksiyon karışımından eklendi ve tüpler oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrasında her PCR tüplerine 1 µl MMLV revers transkriptaz enzimi eklendi ve kısa bir süre vortekslendi.
9. PCR tüpleri konvansiyonel PCR cihazına yerleştirilerek 37°C'de 1 saat, 70°C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı.
10. Reaksiyon koşulları gerçekleştiğinde, tüpler cihazdan alındı ve her bir tüpe 75 µl DNaz/RNaz içermeyen H<sub>2</sub>O ilave edildi.
11. Örnekler bir sonraki deney basamağına kadar -20°C'de saklandı.

### 3.10. Kantitatif Gerçek-zamanlı PCR Deneyleri (qPCR)

cDNA sentezini takiben, Romidepsin ve Belinostat'ın T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarında apoptoz ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon profilleri üzerine etkisi, "LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix" (Roche, Almanya) kullanılarak, LightCycler 480 cihazında analiz edildi. Gerçek-zamanlı PCR analizleri, 96-kuyucuklu mikrolaka kullanılarak gerçekleştirildi. Kuyucuk başına gerekli olan reaksiyon karışımı Tablo 3.6'da belirtildiği gibi hazırlandı. Çalışmamızda kullandığımız apoptoz yolağındaki genler ve primer dizileri Tablo 3.7'de özetlenmiştir. Reaksiyon karışım hazırlanmadan önce Forward ve Reverse primerlerin ana stoklarından 5'er µl alındı ve 1.7 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. Ardından 10 µl'lik bu karışıma 90 µl DNaz/RNaz içermeyen su eklenerek, primerlerin ara stokları hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı 96-kuyucuklu mikrolakada belirlenen yerlere 20 µl olarak aktarıldı. Mikrolakanın üzerini kitle birlikte sağlanan, yapışkan şeffaf etiketi ile kapatıldı ve kısa bir süre mikrolaka santrifüjde santrifüj edildi. Ardından, 96-kuyucuklu mikrolaka LightCycler 480 gerçek-zamanlı PCR cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.8'de belirtilen reaksiyon koşulları girilerek, reaksiyon başlatıldı.

**Tablo 3.6** Gerçek-zamanlı PCR yöntemi için gerekli reaksiyon karışımı.

MATERYAL	GEREKLİ HACİM (1 Kuyucuk için)
SYBR Green I Master Mix	10 µl
Primer (F + R)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	7 µl
cDNA	2 µl
<b>SON HACİM</b>	<b>20 µL</b>

**Tablo 3.7** Çalışmamızda kullanılan genlere ait primerler ve ilgili sekansları.

<b>GEN</b>		<b>SEKANS</b>
<i>hGAPDH</i>	F	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	R	5'-GCCAATACGACCAAATCC-3'
<i>DR4</i>	F	5'-ACCTTCAAGTTTGTCTCGTCGTC-3'
	R	5'-AACTC TCCCAAAGGGCTATGT-3'
<i>DR5</i>	F	5'-AAGACCCTTGTGCTCGTTGT-3'
	R	5'-AGGTGGACACAATCCCTCTG-3'
<i>HRK</i>	F	5'-AGGTTGGTGAAAACCCTGTG-3'
	R	5'-GCATTGGGGTGTCTGTTTCT-3'
<i>FADD</i>	F	5'-GCTGGCTCGTCAGCTCAA-3'
	R	5'-ACTGTTGCGTTCTCCTTCTCT-3'
<i>MCL-1</i>	F	5'-TGCTTCGGAACTGGACATCA-3'
	R	5'-TAGCCACAAAGGCACCAAAG-3'
<i>PUMA</i>	F	5'-GACCTCAACGCACAGTACGAG-3'
	R	5'-AGGAGTCCCATGATGAGATTGT-3'
<i>NOXA</i>	F	5'-ACCAAGCCGGATTTGCGATT-3'
	R	5'-ACTTGCACTTGTTCCCTCGTGG-3'
<i>XIAP</i>	F	5'-TGCCTGGCGCGAAAAG-3'
	R	5'-TGCCAGTGTTGATGCTGAAAC-3'
<i>BCL-2</i>	F	5'-CAGGGCGATGTTGTCCACC-3'
	R	5'-GGGGAGGATTGTGGCCTTC-3'
<i>BCL-XL</i>	F	5'-GGTCGCATTGTGGCCTTTTTTC-3'
	R	5'-TGCTGCATTGTTCCCATAGAG-3'
<i>BAD</i>	F	5'-CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG-3'
	R	5'-CCCATCCCTTCGTCGCCT-3'
<i>BID</i>	F	5'-CCTACCCTAGAGACATGGAGAAG-3'
	R	5'-TTTCTGGCTAAGCTCCTCACG-3'
<i>BAK</i>	F	5'-GTTTTCCGCAGCTACGTTTTT-3'
	R	5'-GCAGAGGTAAGGTGACCATCTC-3'
<i>BIM</i>	F	5'-TCCCTGCTGTCTGATCCTC-3'
	R	5'-GGTCTTCGGCTGCTTGGTAA-3'
<i>KASPAZ-3</i>	F	5'-CATGGAAGCGAATCAATGGACT-3'
	R	5'-CTGTACCAGACCGAGATGTCA-3'

Devamı arkada



<i>KASPAZ-7</i>	F	5'-CGGTCCTCGTTTGTACCGTC-3'
	R	5'-CGCCCATACCTGTCACTTTATCA-3'
<i>KASPAZ-8</i>	F	5'-ACACCAGGCAGGGCTCAAAT-3'
	R	5'-GCAGGTTTCATGTCATCATCCAGTT-3'
<i>KASPAZ-9</i>	F	5'-CTTCGTTTCTGCGAACTAACAGG-3'
	R	5'-GCACCACTGGGGTAAGGTTT-3'
<i>KASPAZ-10</i>	F	5'-TAGGATTGGTCCCCAACAAGA-3'
	R	5'-GAGAAACCCTTTGTCGGGTGG-3'
<i>BCL-W</i>	F	5'-GCGGAGTTCACAGCTCTATAC-3'
	R	5'-AAAAGGCCCTACAGTTACCA-3'
<i>BMF</i>	F	5'-GAGCCATCTCAGTGTGTGGAG-3'
	R	5'-GCCAGCATTGCCATAAAAGAGTC-3'
<i>BIRC2</i>	F	5'-AGCACGATCTTGTCAGATTGG-3'
	R	5'-GGCGGGGAAAGTTGAATATGTA-3'
<i>BIRC3 (DIABLO)</i>	F	5'-TCCTGGATAGTCTACTAACTGCC-3'
	R	5'-GCTTCTTGCAGAGAGTTTCTGAA-3'
<i>BIRC5</i>	F	5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3'
	R	5'-GACAGAAAGGAAAGCGCAAC-3'
<i>BIRC6</i>	F	5'-TGCACAGTTTCCTTGTACGGA-3'
	R	5'-GAGCTTGGGTCTCCTGATAGAA-3'
<i>BIRC8</i>	F	5'-GCGCTCAGAAAGACACTACAG-3'
	R	5'-CCTCTTGCAGACGCCTTAGC-3'
<i>BLC2L10</i>	F	5'-GCCAGGTTACGGCAGATTCA-3'
	R	5'-GAAGGTCACGAGCGTCACC-3'
<i>BIK</i>	F	5'-AGACCCTCCTGTATGAGCAG-3'
	R	5'-GCATTCAAAGAATCGAAGTCCT-3'
<i>BCLAF</i>	F	5'-ATGAGACGACCTTATGGGTACA-3'
	R	5'-AGAGTGCCTTCTATTCCAGACAG-3'

---

**Tablo 3.8** Gerçek-zamanlı PCR çalışması için reaksiyon koşulları.

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
<b>Pre-inkübasyon</b>					
	1		95 °C	5 dk	-
<b>Amplifikasyon</b>					
		Denatürasyon	95 °C	10 sn	-
Kantifikasyon	45	Annealing	60 °C	30 sn	-
		Ekstensiyon	72 °C	30 sn	Tek
<b>Erime eğrisi</b>					
		Denatürasyon	95 °C	5 sn	-
Melting Curves	1	Annealing	65 °C	1 dk	-
		Melting	97 °C	0 sn	Sürekli
slope=0.11°C/sn					
<b>Soğutma</b>					
	1		40 °C	30 sn	-

### 3.11. GBM Hücrelerinden Protein Lizatı Hazırlanması

T98G, U87MG ve U373 hücrelerinden protein lizatı hazırlamak için; hücreler 100 mm'lik hücre kültür kaplarına  $2 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ekildi ve kültür kabı zeminine tutunmaları için CO<sub>2</sub> inkübatöründe 24 saat inkübasyona bırakıldı. Romidepsin HDACi için; T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarına, her bir hücre için son hacim 8 ml olacak şekilde 0.3125 µM konsantrasyon hazırlandı ve hücrelere uygulandı. Belinostat için ise, her bir hücre için son hacim 8 ml olacak şekilde T98G ve U87 hücre hattı için 1.25 µM, U373 hücre hattı için ise 5 µM'lık konsantrasyon uygulandı ve hücreler 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerden protein izolasyonu, proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren RIPA tamponu (10 mM Tris-HCl pH: 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, sodyum deoksikolat, %10 SDS, NP 40) ile gerçekleştirildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelerin bulunduğu besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 10 ml soğuk 1X PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan

sonra hücrelerin üzerine 500 µl RIPA tamponu eklendi ve hücreler buzun üzerine alınarak 5 dk inkübe edildi. Hücreler buzun üzerinde scraper adı verilen steril hücre kazıyıcı ile lize edildi ve mikropipet yardımı ile 1.7 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler buzun üzerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon esnasında her 10 dakikada bir, mikropipet ile 15-20 kez ya da vorteks yardımı ile lizatlar homojenize edildi. Inkübasyon tamamlandığında, tüpler 4°C'ye ayarlanmış santrifüj cihazına aktarıldı ve santrifüjün son hızında (14.000 rpm) 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında sitozolik ve nükleer proteinleri içeren supernatan kısım 1.7 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Örnekler western-blot deneylerinde kullanılıncaya dek -80°C'deki buzdolabında saklandı.

### 3.12. Protein Konsantrasyonlarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi

Bradford yöntemi için ilk olarak deneyde kullandığımız sığır serum albümini (BSA) konsantrasyonları için stok BSA hazırlandı. Stok BSA (Sigma, ABD) için; 0.025 gr tartılarak 1 ml suda çözüldü ve 2500 µg/ml konsantrasyonda stok BSA hazırlanmış oldu. Stok BSA 1/10 oranında distile su ile sulandırıldıktan sonra 250 µg/ml'lik ara stok hazırlandı. Bu ara stoktan ilk olarak 2 ml alınarak üzerine 8 ml distile su eklendi ve 50 µg/ml'lik ara stok daha elde edildi. 50 µg/ml'lik ara stoktan sırasıyla 10 µg/ml ve 25 µg/ml'lik BSA konsantrasyonları hazırlandı. İlk hazırladığımız 250 µg/ml'lik ara stoktan da 125 µg/ml BSA konsantrasyonu hazırlandı. Sonuç olarak, elimizde sırasıyla 250 µg/ml, 125 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml BSA konsantrasyonları elde edildi.

Bradford yöntemi aşağıda belirtildiği şekilde uygulandı.

1. 1.7 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine, konsantrasyonları hesaplanacak protein lizatlarından 5 µl alındı ve üzerine 495 µl distile su eklenerek 1/100 oranında dilüsyon yapıldı.
2. 1/100 oranında sulandırılan bu lizatlardan steril mikrosantrifüj tüpüne 80 µl alındı ve üzerine 720 µl distile su eklenerek toplamda 1/1000 oranında dilüsyon yapıldı.
3. Daha önceden hazırladığımız BSA konsantrasyonlarından da 80 µl alındı ve üzerine 720 µl distile su ilave edilerek 1/10 oranında sulandırıldı.
4. Tüm örneklerin üzerine 200 µl BioRad protein tayin kiti solüsyonundan (BioRad, ABD) eklendi ve örnekler 1/5 oranında birkez daha sulandırılmış oldu.

5. Örnekler 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. İnkübasyonun ardından örnekler vortekslendi ve 96-kuyucuklu plakalara her bir örnekten 200 µl aktarıldı. Her bir örnekten 3 kuyucuk hazırlandı.
7. 96-kuyucuklu plaka Glomax Multi Detection System (Promega, ABD) cihazında 595 nm'de spektrofotometrik olarak okundu.
8. Elde edilen standart BSA verilerinden kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen formüldeki eğim kullanılarak, örneklerimizin konsantrasyonları hesaplandı. Örnek konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{"Konsantrasyon"} = (\text{Örnek Absorbansı} / \text{Eğim}) \times \text{Sulandırma Katsayısı}"$$

### 3.13. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Yöntemi

Western blot yönteminde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları aşağıda özetlenmiştir.

- Yürütme (Running) Tamponu (1X): 2.28 gr Tris-Base (25 mM), 10.7 gr Glisin (190 mM), 0.75 gr SDS (%0.1) tartıldı ve 750 ml distile su ile çözüldü. Bu tampon için pH ayarı gerekmemektedir.
- Transfer Tamponu (1X): 3.028 gr Tris-Base (25 mM), 14.26 gr Glisin (190 mM), 0.5 gr SDS (%0.1) tartıldı ve 1 lt su ile çözüldü. Karışım tamamen çözüldükten sonra üzerine 250 ml metanol eklenerek 4°C'ye kaldırıldı.
- TBS Tamponu (20X): 48.46 gr Tris-Base (20 mM), 175.32 gr NaCl (150 mM) tartıldı ve 750 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH: 7.5 olarak ayarlandı ve son hacim distile su ile 1 lt'ye tamamlandı.
- TBS-T Tamponu (1X): 20X TBS tamponundan 50 ml alındı ve son hacim 1 lt'ye tamamlandı. Ardından solüsyona 1 ml Tween-20 (%0.1) eklendi.
- Örnek Yükleme Tamponu: 4X Laemmli tamponundan (BioRad, ABD) 900 µl alındı ve üzerine 100 µl 2-merkaptoetanol eklendi.
- %10 Amonyum persülfat (APS): 0.1 gr APS tartıldı ve 1 ml distile su ile çözüldü. Yapılacak her deneyden önce taze olarak hazırlandı ve 4°C'de saklandı.
- Akrilamid/Bisakrilamid (29/1) Solüsyonu: 29 gr Akrilamid ve 1 gr Bisakrilamid tartıldı ve 100 ml distile su ile çözüldü. Hazırlanan bu solüsyon filtreden geçirilerek, ışık görmeyen bir şişeye aktarıldı ve 4°C'de muhafaza edildi.

- 1.5 M Tris: 18.17 gr Tris-Base tartıldı ve 100 ml distile su ile çözüldü. HCl ile pH: 8.8'e ayarlandı.
- 0.5 M Tris: 3.02 gr Tris-Base tartıldı ve 50 ml distile su ile çözüldü. HCl ile pH: 6.8'e ayarlandı.

Western blot deneyi öncesi hazırlanan bu karışımlardan sonra ilk olarak "Stacking jel" ardından "Seperating jel" hazırlandı. Deneylerimizde BioRad firmasının western blot sistemi kullanıldı. Jel hazırlamadan önce jelin döküleceği 1.5 mm'lik camlar temizlendi, aparatına yerleştirildi ve standına yüklendi. Deneylerimiz için hazırladığımız "Stacking" ve "Seperating jel" Tablo 3.9 ve 3.10'da belirtildiği gibi hazırlandı.

**Tablo 3.9** %11'lik Seperating jel hazırlanışı.

<b>Solüsyon (2 Jel için)</b>	<b>Miktar (1.5 mm'lik cam için)</b>
dH2O	5.55 ml
1.5 M Tris-HCl	3.75 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	5.55 ml
%10 SDS	150 µl
%10 APS	75 µl
TEMED	7.5 µl

**Tablo 3.10** Stacking jel (%5) hazırlanışı.

<b>Solüsyon (2 Jel için)</b>	<b>Miktar (1.5 mm'lik cam için)</b>
dH2O	3.05 ml
1.5 M Tris-HCl	1.25 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	750 µl
%10 SDS	50 µl
%10 APS	25 µl
TEMED	5 µl

Seperating jel karışımı hazırlandıktan sonra hızlı bir şekilde 1.5 mm'lik camlar arasından döküldü ve hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. Seperating jelin üst kısmının gerek düz olması gerekse havayla temasını kesip, donmasını sağlamak

amacıyla camların en üst seviyesine kadar 2-propanol (izopropanol) eklendi. Yaklaşık 1 saat içinde, seperating jelin polimerleştiğinden emin olduktan sonra 2-propanol dökülerek uzaklaştırıldı. Tablo 3.10'daki gibi stacking jel hazırlandı ve seperating jelin üzerine döküldü. Camların son çizgisine kadar dökülen stacking jele, hızlı bir şekilde 15 kuyucuklu tarak yerleştirildi ve jel polimerleşmeye bırakıldı (~30 dakika).

SDS-PAGE ile analiz edilecek örneklerin Bradford ile hesaplanan konsantrasyonlarından, mikrolitrede 75 µg protein olacak şekilde hesap yapıldı ve steril 1.7 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Hesaplanan miktarların 1/3'ü kadar 4X Laemmli Tamponu örnekler üzerine eklendi. Protein denatürasyonunu gerçekleştirmek amacıyla, örnekler kuru ısıtma bloğunda 95°C'de 5 dk kaynatıldı. Bu arada, polimerleşen stacking jelden tarak çıkartıldı ve camlar western blot yürütme sistemi rezervuarı aparatına yerleştirildi. Rezervuar içine yerleştirilen aparatın üzerine, sistemin belirttiği seviyeye kadar yürütme tamponu eklendi. Kuyucuklar içerisinde hava kabarcıkları mikropipet yardımı ile pipetaj yaparak ortadan kaldırıldı. Kaynatılan örnekler ve protein ladder mikropipet yardımı ile, örnekler için belirlenen kuyucuklara aktarıldı. Ardından western blot sisteminin kabloları, güç kaynağındaki ilgili yerlerine takıldı ve örnekle 100 Voltta 90 dk boyunca yürütüldü. Boya cam tabanına ulaştığında güç kaynağı kapatıldı ve elektroforez işlemine son verildi. Jeller camlar arasından dikkatlice çıkartıldı ve fazlalık kısımları uzaklaştırıldı. Transfer kasetinin siyah kısmı alta gelecek şekilde, 2 adet sünger transfer tamponu ile ıslatılarak siyah yüzeye konuldu. Ardından uygun büyüklükte kestiğimiz filtre kağıtları transfer tamponu ile ıslatıldı ve süngerin üzerine yerleştirildi. Fazlalığını aldığımız jel filtre kağıtları üzerine kondu ve jelin üzeri uygun büyüklükte kesilmiş PVDF membran (Millipore, ABD) ile kapatıldı. Membranın üstü tekrar filtre kağıdı ve sünger ile kapatıldı. Transfer kasetleri, transfer rezervuarına doğru bir şekilde yerleştirildi. Örnekler transfer tamponu içinde 4°C'de, güç kaynağı 90 mAmp'e ayarlanarak 16 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Transfer işleminden sonra membranlar dikkatlice kasetten çıkartıldı ve %5'lik yağsız süt tozu TBS-T çözeltisi içinde, oda sıcaklığında 2 saat boyunca bloklanma yapıldı. Bloklamanın ardından membranlar üzerine, %5'lik yağsız süt tozu içerisinde GAPDH (fare, 1/1000) (Santa Cruz, ABD), Bcl-2 (fare, 1/1000) (Novus, ABD), Bax (fare, 1/1000) (Novus, ABD), kaspaz-3 (tavşan, 1/1000) (Novus, ABD), kaspaz-8 (fare, 1/1000) (BioVision, ABD) ve kaspaz-9 (tavşan, 1/1000) (BioVision, ABD)'un primer antikoları kullanılarak, gece boyunca işaretlendi. İşaretlemenin ardından membran, TBS-T ile 30 dk boyunca yıkandı. Yıkama işleminden sonra, primer antikoların immüno globulinlerine karşı geliştirilmiş ve HRP-bağlı sekonder antikor, %5 yağsız süt tozu içerisinde membran üzerine aktarıldı. Sekonder antikorda

da 1 saat şaretleme yapıldıktan sonra, membran 30 dk boyunca TBS-T ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra membranın üzerini kaplayacak şekilde ECL kit uygulandı ve kemilüminesan sinyali görüntüleme cihazında (Li-cor, ABD) analiz edildi.

### 3.14. İstatistiksel Analiz

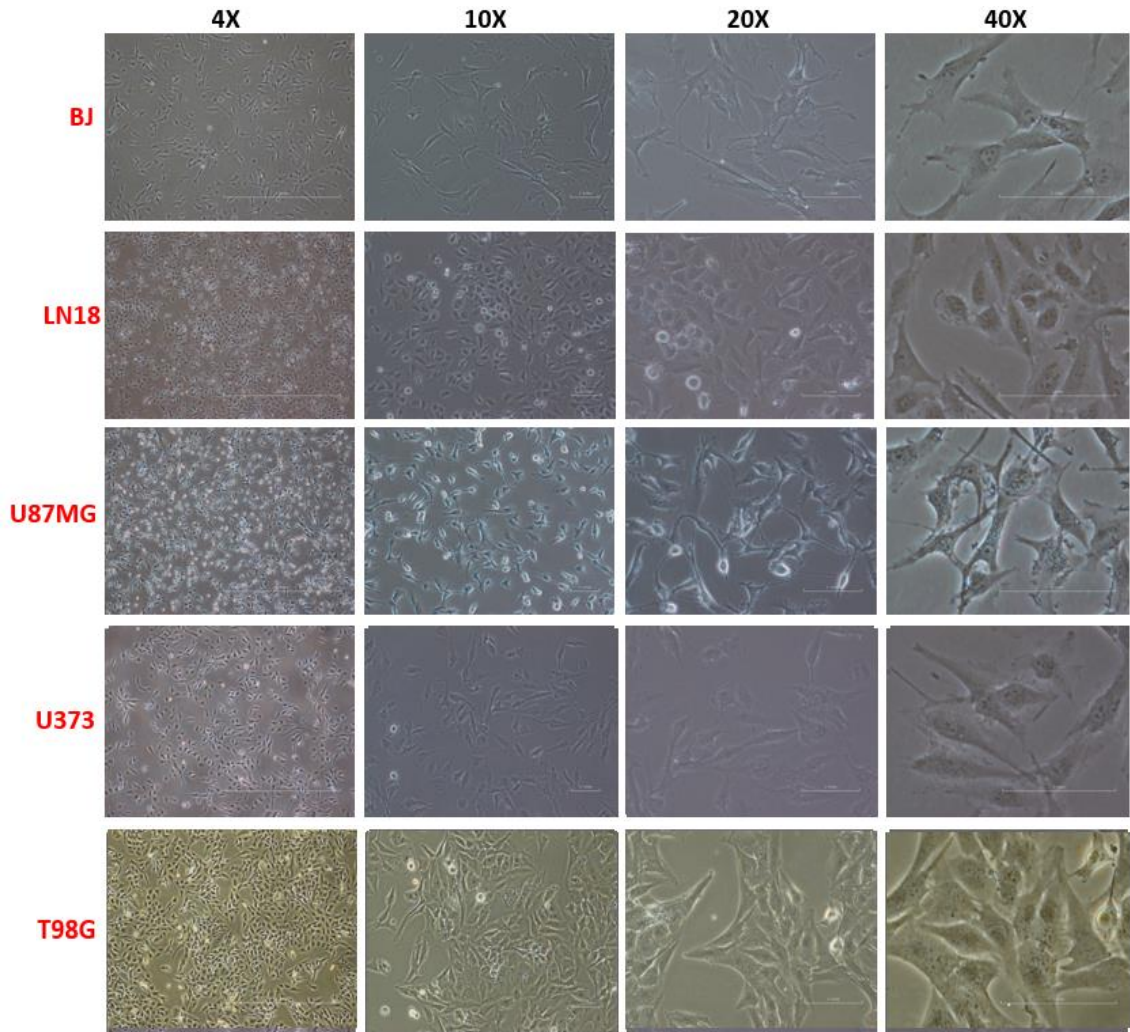
Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Microsoft Excel 2016 (Microsoft, ABD) ve GraphPad Prism, versiyon 5.0 (GraphPad, ABD) programlarından yararlanıldı. HDACi'lerin tekli ve TRAIL ile kombine denemeleri, gerçek-zamanlı PCR uygulamaları üç kez tekrarlandı ve standart hataları hesaplanarak grafiklerde belirtildi. HDACi'lerin IC<sub>50</sub> değerleri GraphPad Prism 5.0 programı kullanılarak belirlendi. Gerçek-zamanlı PCR deneylerinde kontrol ve doz gruplarının karşılaştırılmasında  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu kullanıldı ve sonuçlar Microsoft Excel 2016'da analiz edildi. Akım sitomteri verilerinin analizi "BD Accuri C6 Plus Analysis" programı kullanılarak, western-blot deneylerinde ise sonuçlar "Image Studio™ Lite" (Li-Cor, ABD) programı ile analiz edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışmada Kullanılan Hücelere Ait Invert Mikroskop Görüntüleri

Araştırmamızda, kontrol grubu olarak BJ insan fibroblast hücreleri, TRAIL'e duyarlı olan LN18, T98G, TRAIL'a orta derecede dirençli olan U87MG ve TRAIL'a dirençli olan U373 GBM hücre hatları kullanıldı (Senbabaoglu vd 2016). Bu hücreler DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde çoğaltıldıktan sonra invert-mikroskop altında fotoğraflandı. Şekil 4.1'de hücrelerin "4X, 10X, 20X ve 40X" büyütmelelerdeki görüntüleri gösterilmiştir.





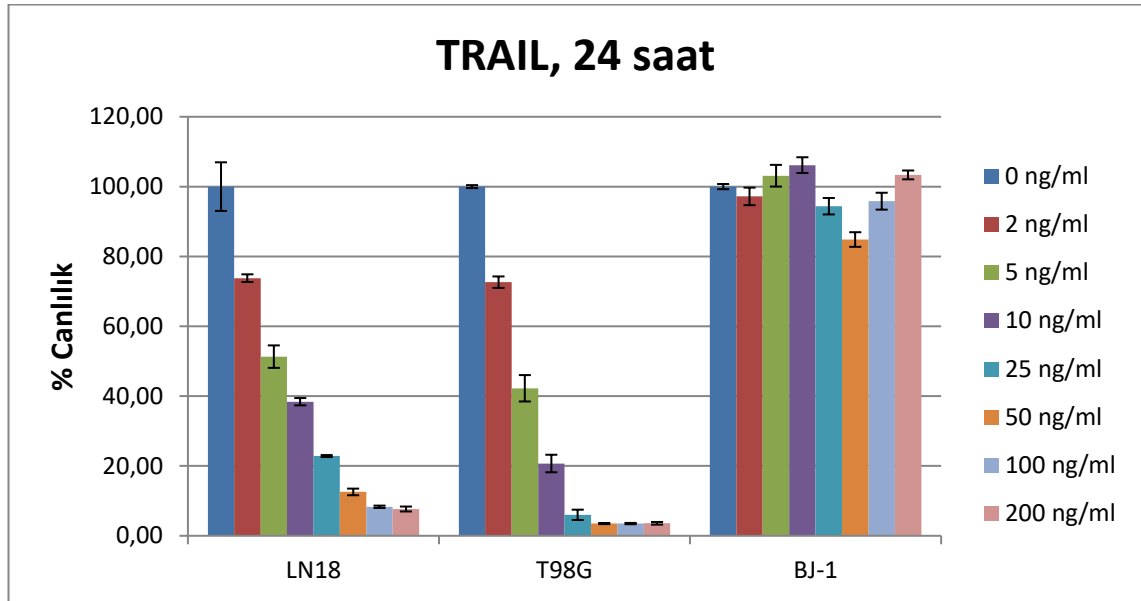
**Şekil 4.1** Çalışmamızda kullanılan hücelere ait invert-mikroskop görüntüleri.

#### 4.2. TRAIL'in GBM ve BJ Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

BJ ve LN18, T98G, U87MG, U373 GBM hücre hatlarına Tablo 3.2'de belirlenmiş dozlar uygulanmıştır. TRAIL'in yarı ömrünün kısa olması dolayısı ile, TRAIL hücelere 24 saat boyunca uygulanmıştır. CTG yöntemi ile 24. saatin sonunda TRAIL'in sitotoksik etkisi hesaplanmıştır.

LN18 ve T98G hücre hatlarında, TRAIL'in düşük dozlarda (2, 5 ve 10 ng/ml) bile hücre canlılığını azalttığı, 25-200 ng/ml konsantrasyon aralığında ise hücre canlılığını ciddi şekilde azalttığı görülmektedir (Şekil 4.2). Bu sonuç, LN18 ve T98G hücre hatları

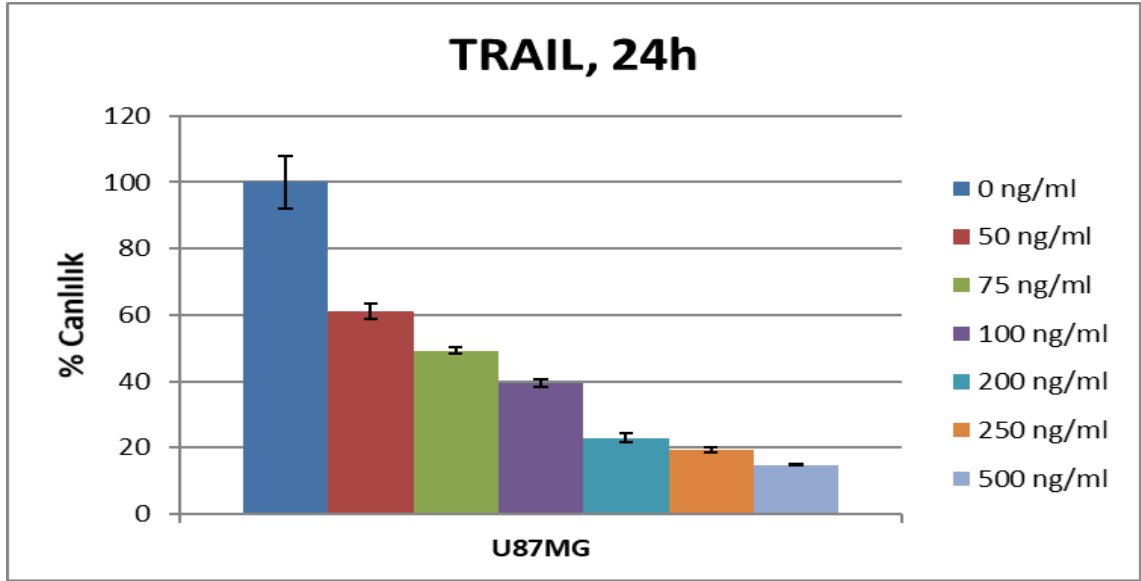
için “TRAIL-duyarlı” kavramını doğrulamaktadır. BJ hücre hattına baktığımızda, şekil 4.2’de görüldüğü gibi 200 ng/ml’lik TRAIL uygulaması sonrasında bile hücre canlılığında herhangi bir değişim olmamıştır. 50 ng/ml’lik TRAIL konsantrasyonunda az da olsa hücre canlılığında meydana azalma, büyük olasılıkla deney aşamasındaki el hatasından kaynaklanmaktadır.



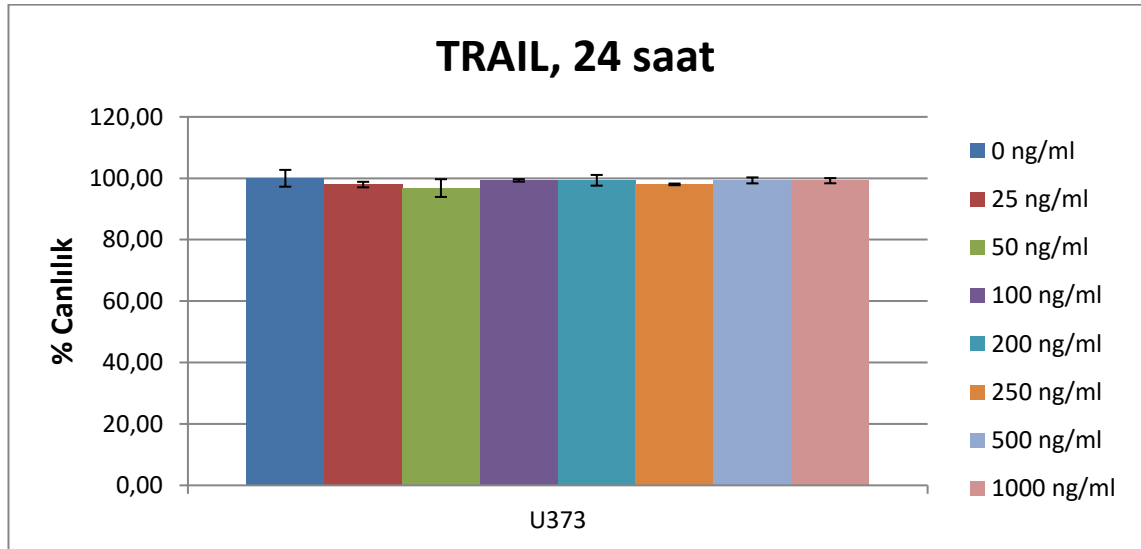
**Şekil 4.2** TRAIL’in LN18, T98G ve BJ hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi.

U87MG hücre hattı için uygulanan TRAIL’in konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığında ciddi bir azalma görülmektedir. LN18 ve T98G hücre hatlarında TRAIL 50 ng/ml ve üzerindeki dozları hücre canlılığını ciddi şekilde azaltmışken, U87MG hücre hattında 50, 75 ve 100 ng/ml’lik konsantrasyonlarda bile hücre canlılığının ancak %60 ve altına düştüğü görülmektedir (Şekil 4.3). Bu sonuç daha önce belirttiğimiz U87MG hücre hattının TRAIL’e orta derecede duyarlılığı olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Şekil 4.4’de gösterildiği gibi, TRAIL’in U373 hücre hattında 24 saatlik uygulaması sonucu 1000 ng/ml konsantrasyonda bile hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını, bu nedenle U373 hücre hattının TRAIL’e ciddi şekilde dirence sahip olduğu görülmektedir.



**Şekil 4.3** TRAIL'in U87MG hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi.



**Şekil 4.4** TRAIL'in U373 hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar ışığında, TRAIL ve HDACi'ler için gerçekleştirilecek olan kombine denemelerde kullanılmak üzere TRAIL'in 3 dozunu belirledik. Kombine denemeler için; LN18 ve T98G hücre hatlarında TRAIL'in hücre canlılığını daha az etkilediği dozlar olan 2, 5 ve 10 ng/ml'lik dozları seçtik. U87MG için 25, 50 ve 100 ng/ml, U373 hücre hattı için ise 50, 100 ve 200 ng/ml'lik TRAIL konsantrasyonlarını belirledik.

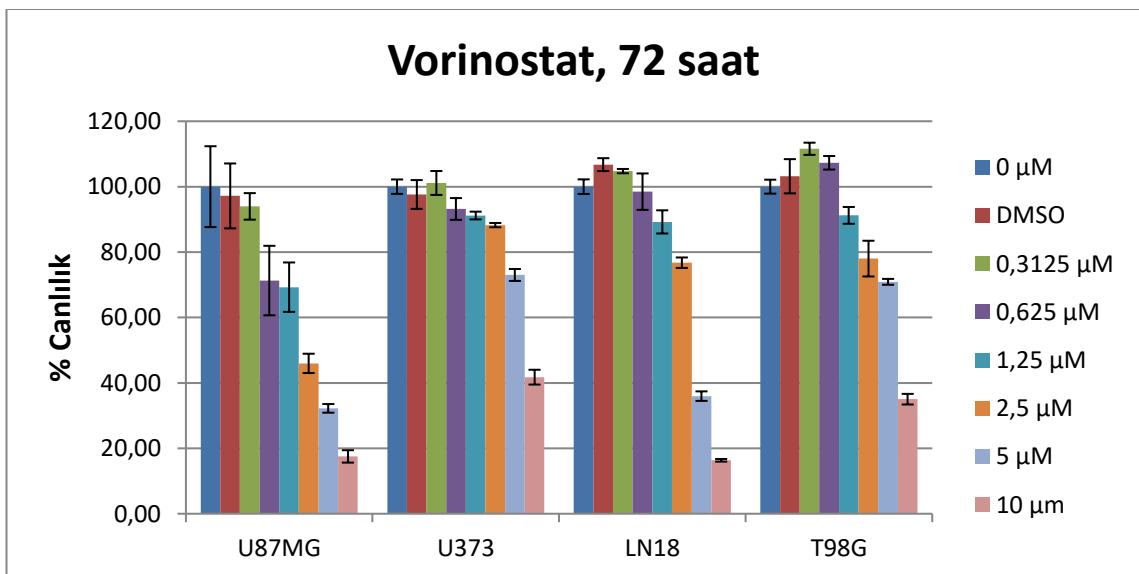
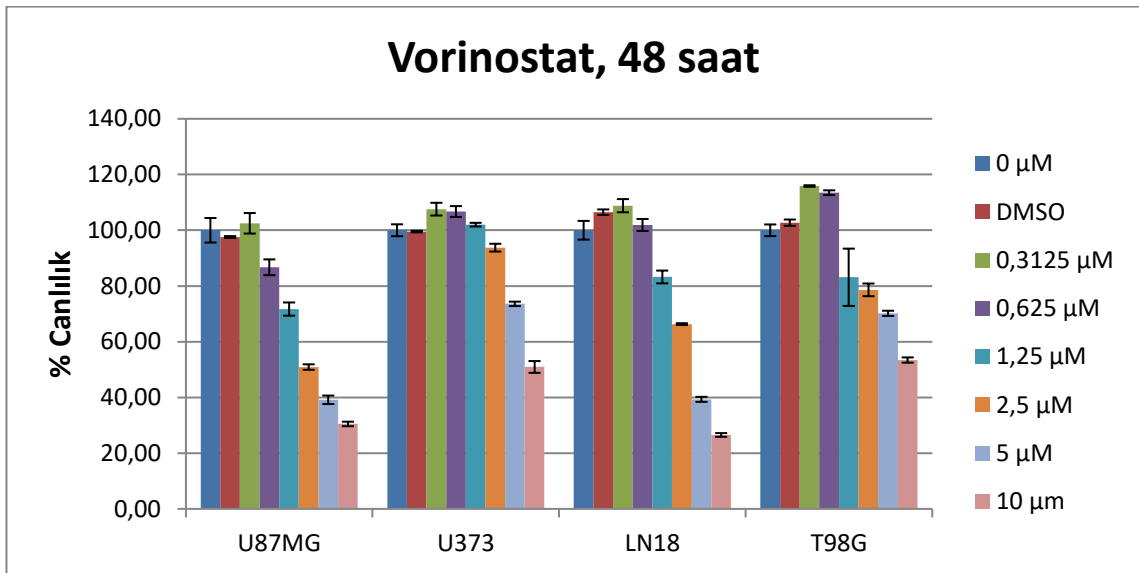
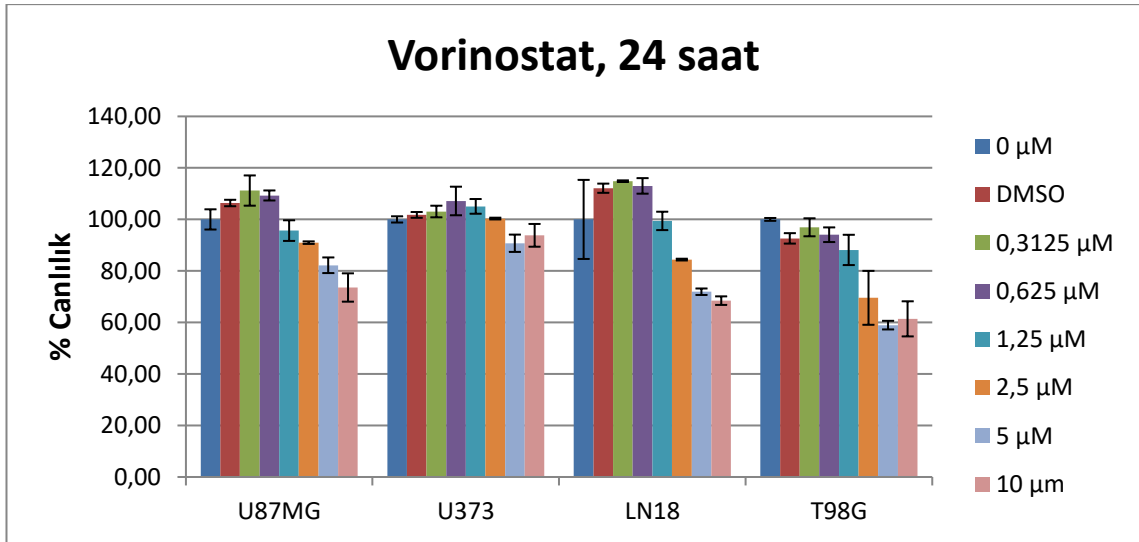
Özetle; çalışmamızda kullandığımız 4 farklı GBM hücre hattından LN18 ve T98G TRAIL-duyarlı, U87MG hücre hattı TRAIL-orta derecede duyarlı ve U373 hücre hattı ise TRAIL'e dirençlidir. Bu hücre hatlarının TRAIL'e farklı hassasiyet göstermesinin nedeni; TRAIL'in reseptörleri olan DR4, DR5, DcR1 ve DcR2'in bu hücre hatlarının hücre yüzeylerinde farklı miktarlarda bulunmasından dolayı olabilir.

### **4.3. HDACi'lerin GBM Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkileri**

#### **4.3.1. Vorinostat'ın GBM Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkisi**

Vorinostat için Doç. Dr. Tuğba BAĞCI-ÖNDER'in ve literatür bilgileri baz alınarak 1 mM'lık ara stoktan 0.3125, 0.625, 1.25, 5 ve 10  $\mu$ M'lık çalışma stokları hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar hücrelere 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanarak, Vorinostat'ın hücre canlılığı üzerine etkisi analiz edilmiştir. Vorinostat'ın ara stoğu DMSO ile hazırlandığından, kontrol grubu dışında hücreler DMSO'da uygulanarak DMSO kaynaklı bir etkinin olup olmadığı da ayrıca değerlendirilmiştir. Uygulanan DMSO dozu, seçilen en yüksek çalışma konsantrasyonu olan 10  $\mu$ M'daki DMSO yüzdesi ile aynı olacak şekilde uygulanmıştır.

Vorinostat'ın 24 saatlik uygulaması sonucu; LN18, T98G ve LN18 hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin olduğu fakat U373 hücre hattında ise hücre canlılığına belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Vorinostat'ın 48. saatte artan konsantrasyon ile birlikte LN18 ve U87MG hücre hatlarında hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığı, T98G ve U373 hücre hatlarında ise diğer konsantrasyonlara oranla 5 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Üçüncü günün sonunda, LN18 ve U87MG hücre hatlarında hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak ciddi şekilde azaldığı hatta 10  $\mu$ M'lık konsantrasyonda hücre canlılığının %20'lerin altına düştüğü görülmüştür. T98G ve U373 hücre hattı için 10  $\mu$ M'lık konsantrasyonda hücre canlılığı belirgin şekilde azalmıştır (Şekil 4.5). TRAIL ile uygulanacak kombine denemelerde kullanılmak üzere Vorinostat için TRAIL'de olduğu gibi 3 farklı doz seçilmiştir. Vorinostat için 0.3125, 1.25 ve 5  $\mu$ M'lık dozlar seçilerek TRAIL ile yapılacak kombine denemelere geçilmiştir.

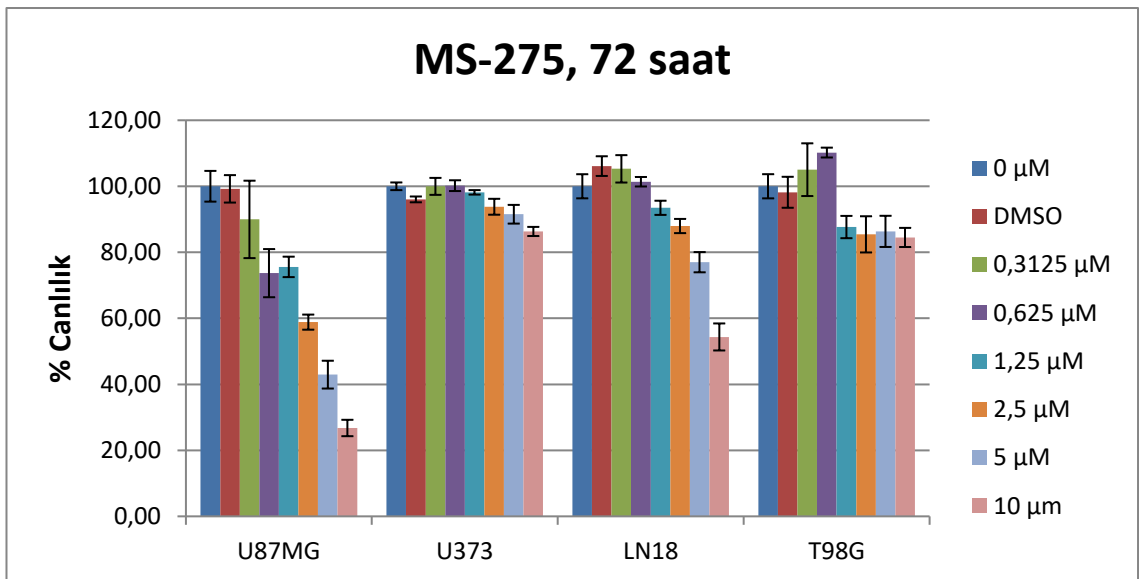
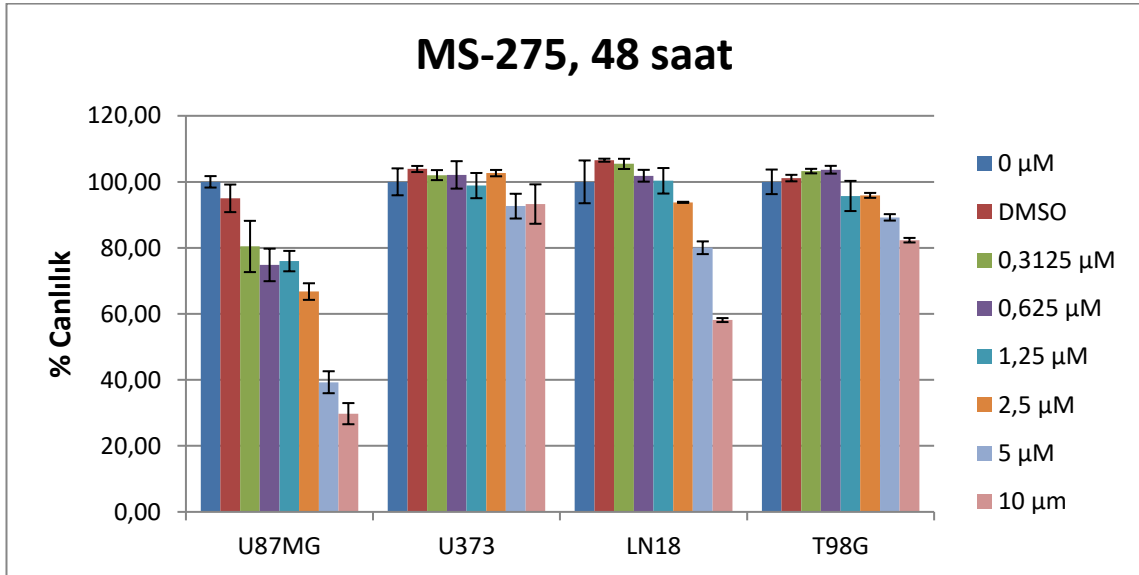
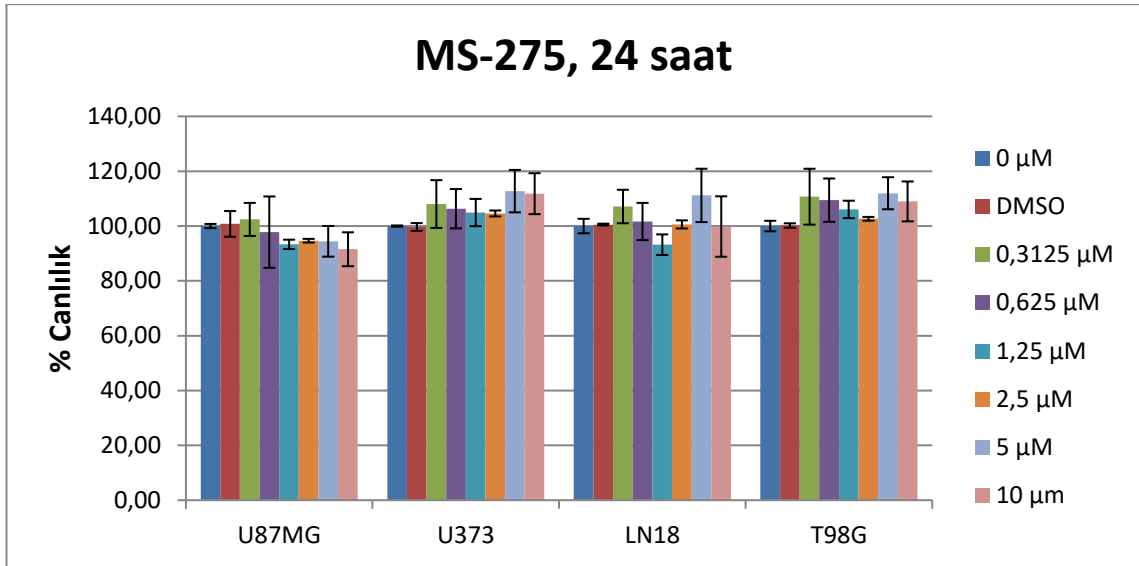


**Şekil 4.5** Vorinostat'ın LN18, T98, U87MG ve U373 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi.

#### 4.3.2. MS-275'in GBM Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkisi

MS-275 için de Vorinostat'da olduğu gibi, 1 mM'lık ara stoktan 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10  $\mu$ M'lık ara stoklar hazırlanmış ve GBM hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Kontrol grubu dışında DMSO etkisinin görmek amacıyla en yüksek konsantrasyon olan 10  $\mu$ M'daki oran ile aynı olacak şekilde hücrelere DMSO uygulanmıştır. Hem Vorinostat hem de MS-275 için hücre hatlarına uygulanan DMSO hücre canlılığında herhangi bir değişime neden olmamıştır. Bu sayede, DMSO'nun bu hücre hatları için herhangi bir sitotoksik etkiye neden olmadığını ve hücre canlılığında meydana gelecek bir değişimin sadece HDACi kaynaklı olabileceğini göstermiş olduk.

MS-275'in 24 saatlik uygulaması sonucu tüm hücre hatlarında hücre canlılığına herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. MS-275, 48. saatte LN18 hücre hattı için 10  $\mu$ M'lık konsantrasyonda, U87MG hücre hattında 5 ve 10  $\mu$ M'lık konsantrasyonlarda hücre canlılığında belirgin bir azalışa neden olmuştur. T98G ve U373 hücre hattında ise MS-275'in hücre canlılığına belirgin bir etkisi görülmemiştir. Üçüncü günün sonunda, MS-275'in 72. Saatteki etkisinin, 48. saatteki sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, belirgin bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.6). MS-275 için de 0.3125, 1.25 ve %  $\mu$ M'lık dozları seçilmiş ve kombine denemelere geçilmiştir. Vorinostat ve MS-275 deneylerinin kurulma aşamasında, BJ fibroblast hücre hattı kültür aşamasında olduğundan ve elimizde deneyleri gerçekleştirmek için yeterli sayıda olmadığından dolayı, bu hücre hattında HDACi'lerin etkisi çalışılmamıştır. Fakat bu deneyler sonucu seçilmiş olan 3 farklı HDACi dozu da TRAIL ile kombine denemelerde, BJ hücre hattı için denenmiştir.



**Şekil 4.6** MS-275'in LN18, T98G, U87MG ve U373 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi.

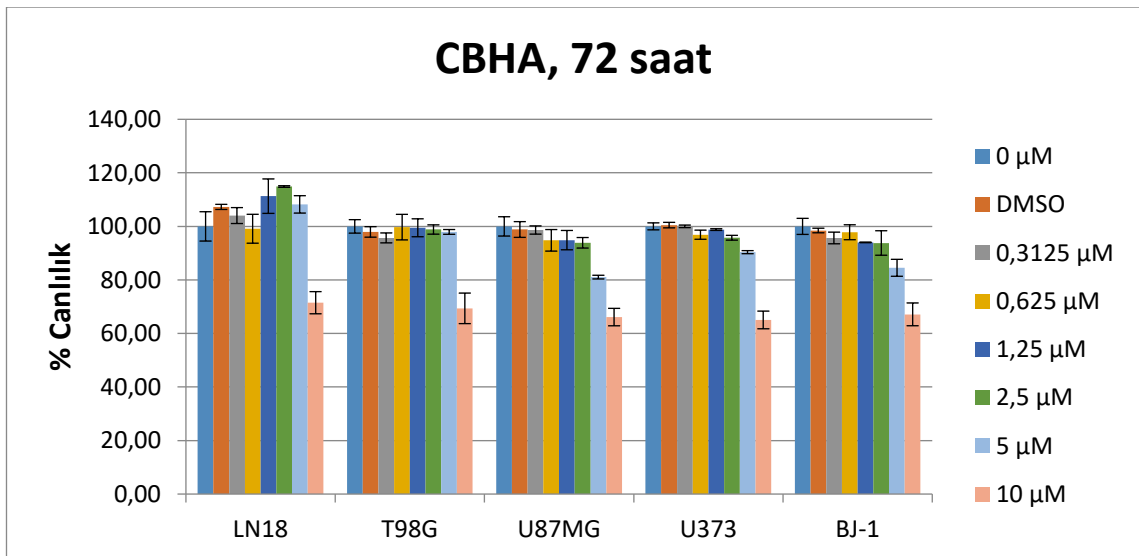
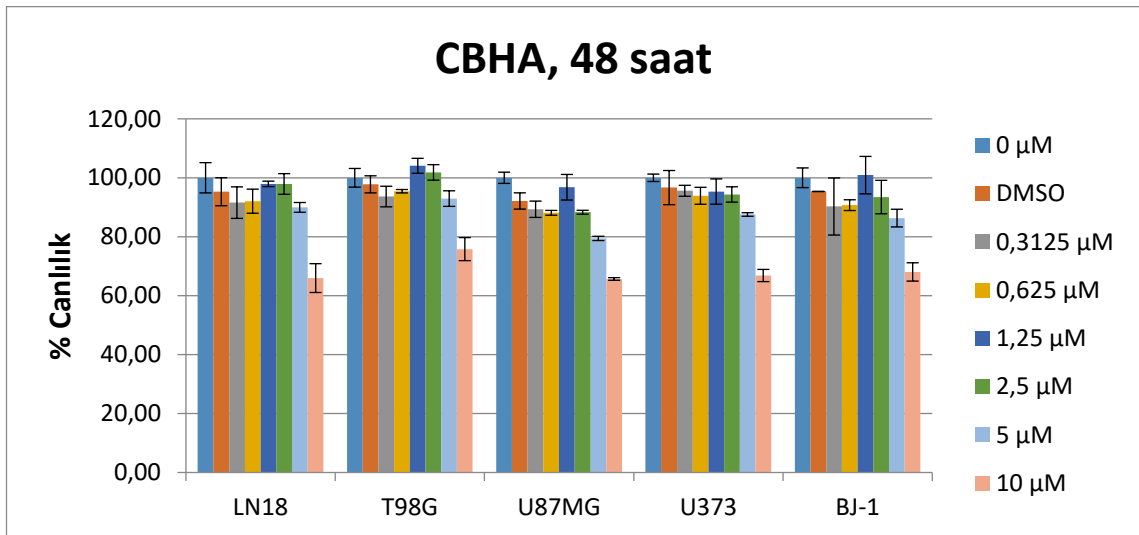
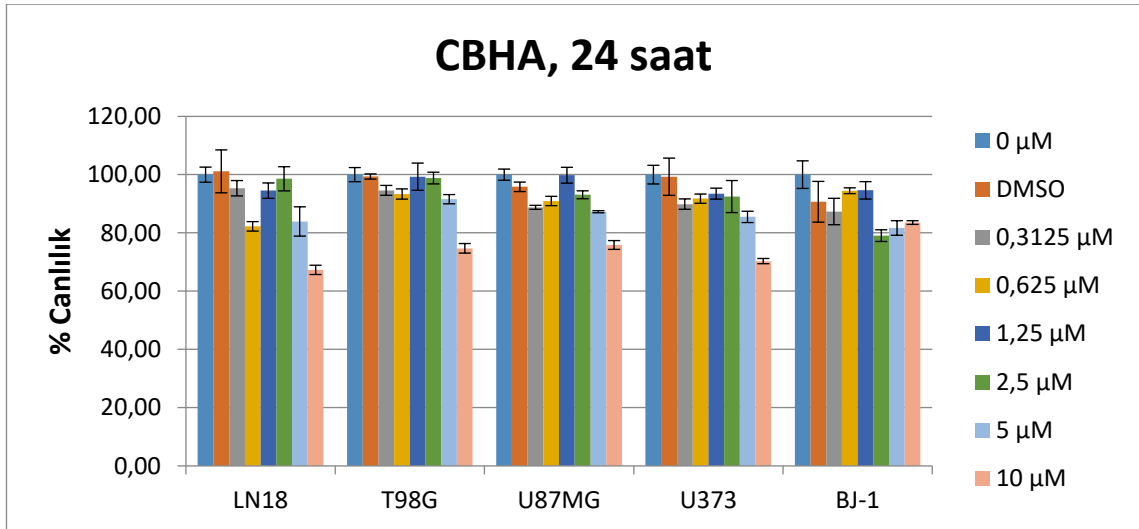
#### 4.3.3. CBHA'nın GBM Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

CBHA'nın 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 ve 10  $\mu$ M'lık dozları GBM hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Vorinostat ve MS-275'de olduğu gibi DMSO 24. 48. ve 72. saatlerde hücre canlılığında bir değişikliğe neden olmamıştır. CBHA'nın 24. Saat sonunda tüm hücre hatlarında en yüksek doz olan 10  $\mu$ M'da hücre canlılığına etkisinin olduğu, diğer konsantrasyonlarda ise sınırlı derecede etkisinin olduğu gözlenmiştir. CBHA'nın 48. saatte de tüm hücre hatlarına en yüksek konsantrasyonda etki ettiği görülmüştür. 48. saatteki sonuçlarla karşılaştırıldığında, 72. saatte de hücre canlılığı üzerine belirgin bir değişim gözlenmemiştir. BJ hücre hatlarında ise 48. ve 72. saatlerde en yüksek konsantrasyonda etki gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.7).

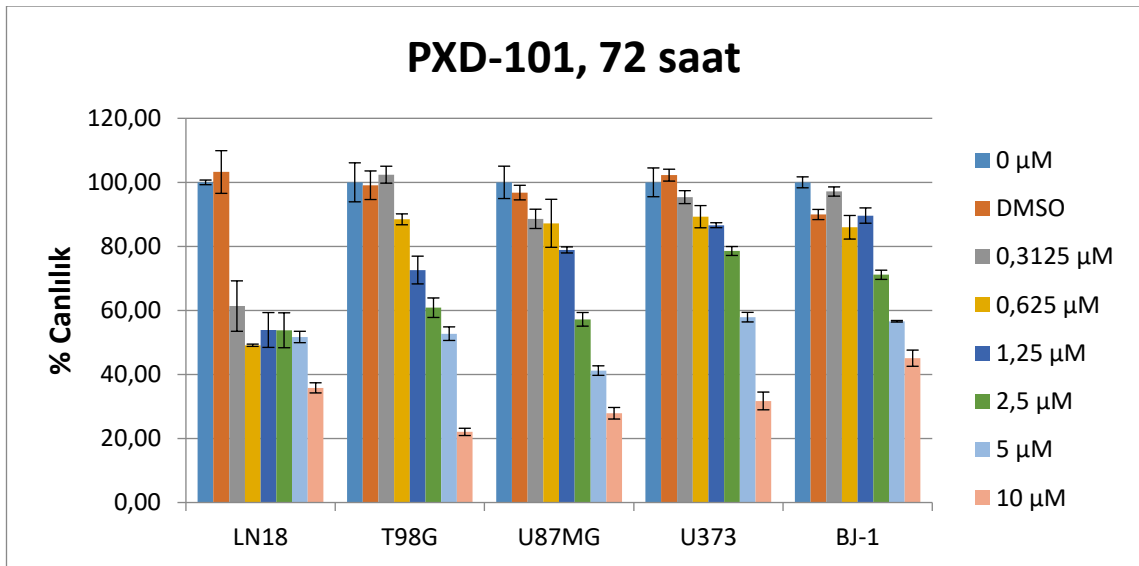
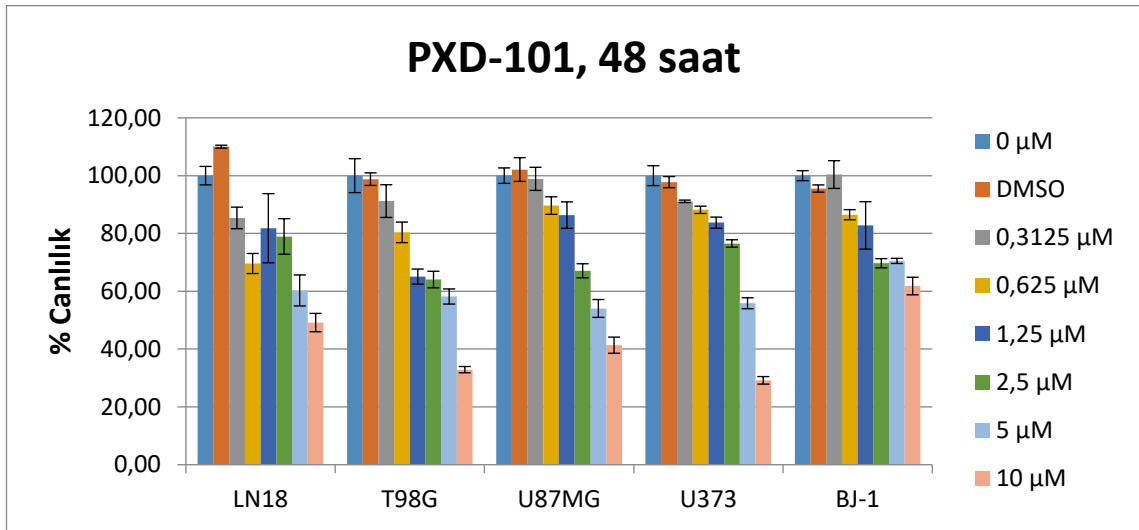
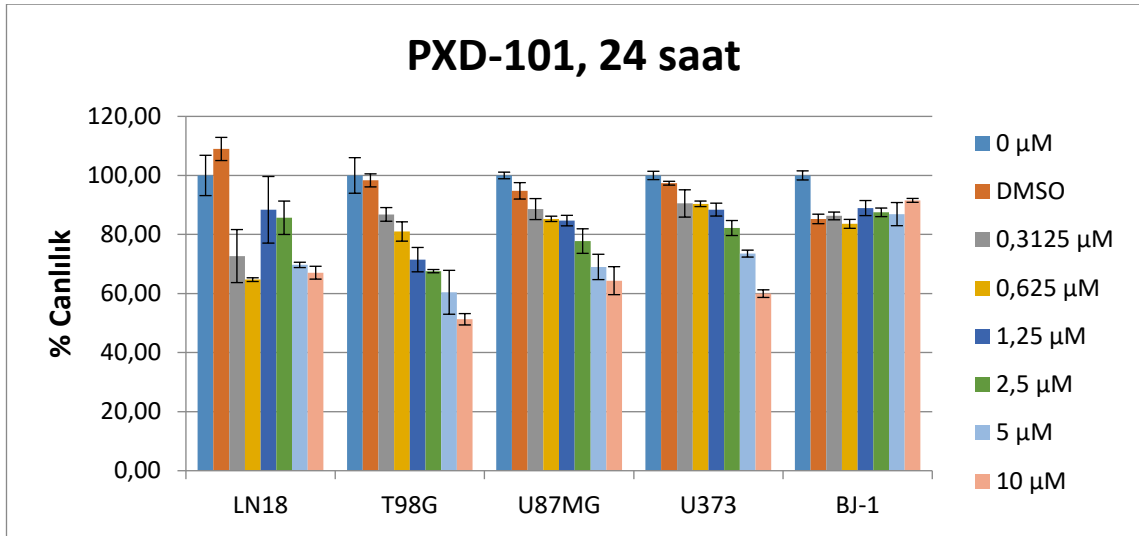
#### 4.3.4. Belinostat (PXD-101)'in GBM Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

Belinostat'ın GBM hücrelerinde 24. saatin sonunda konsantrasyonun artmasıyla birlikte LN18, T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin olduğu, BJ hücrelerine ise belirgin bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Belinostat'ın artan konsantrasyonla birlikte 48. Saatte tüm GBM hücre hatlarında hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığı, BJ hücrelerinde ise 2.5, 5 ve 10  $\mu$ M'lık konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. 72 saatlik uygulama sonucunda ise tüm GBM hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını ciddi şekilde azalttığı, 10  $\mu$ M'lık konsantrasyonda hücre canlılığını %35 ve altına düşürdüğü görülmüştür. BJ hücre hattında da en yüksek üç konsantrasyonda hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.8). Kontrol grubu dışında DMSO uygulanan hücrelerde de DMSO'nun hücre canlılığına herhangi bir etkisine rastlanmamıştır. Bu nedenle meydana gelen sitotoksik etki, sadece Belinostat aracılığıylaadır.





**Şekil 4.7** CBHA'nın GBM ve BJ hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi.

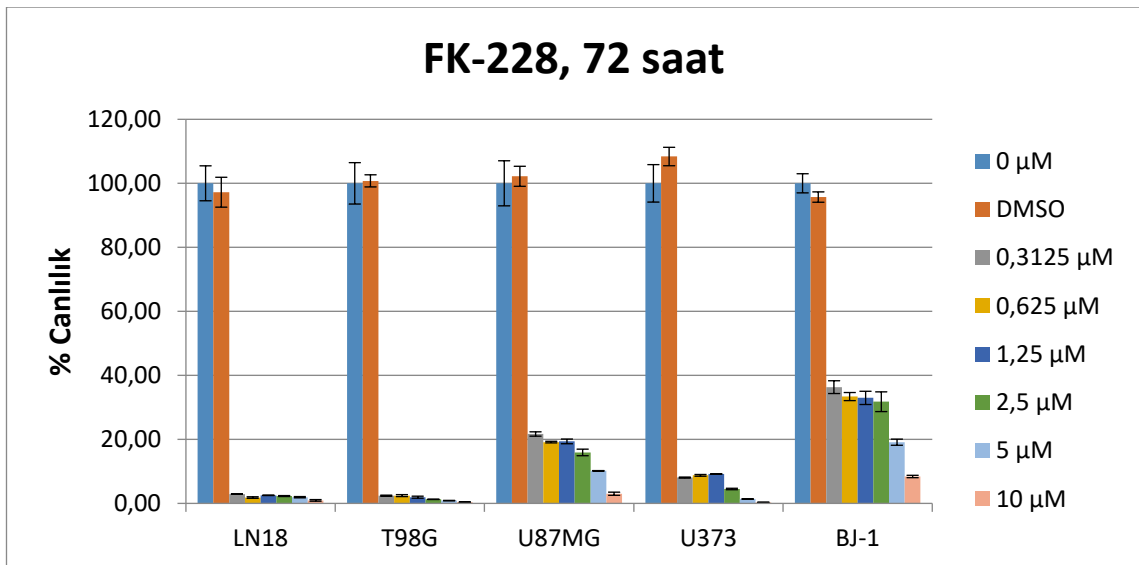
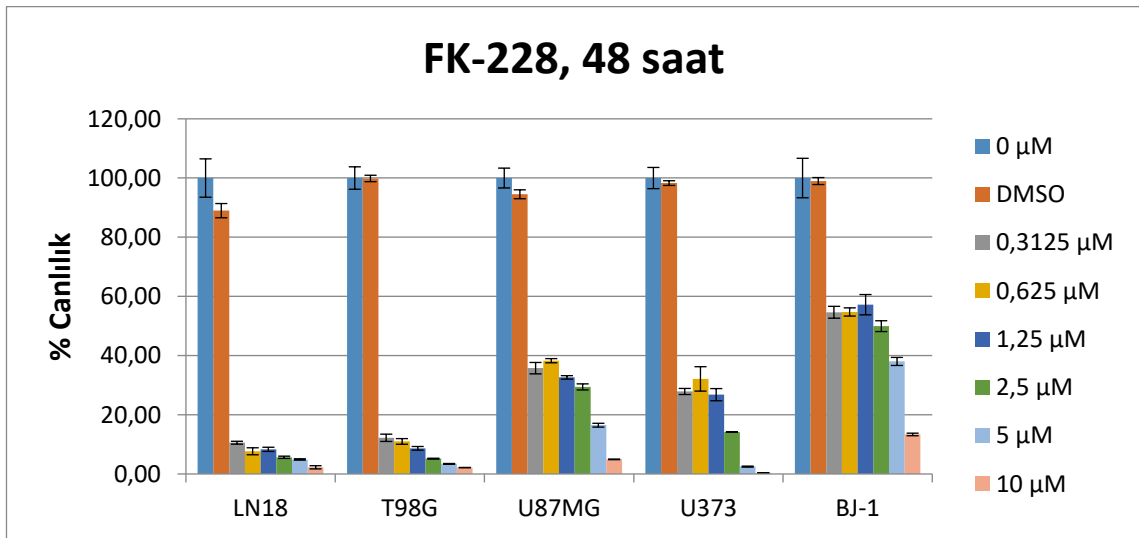
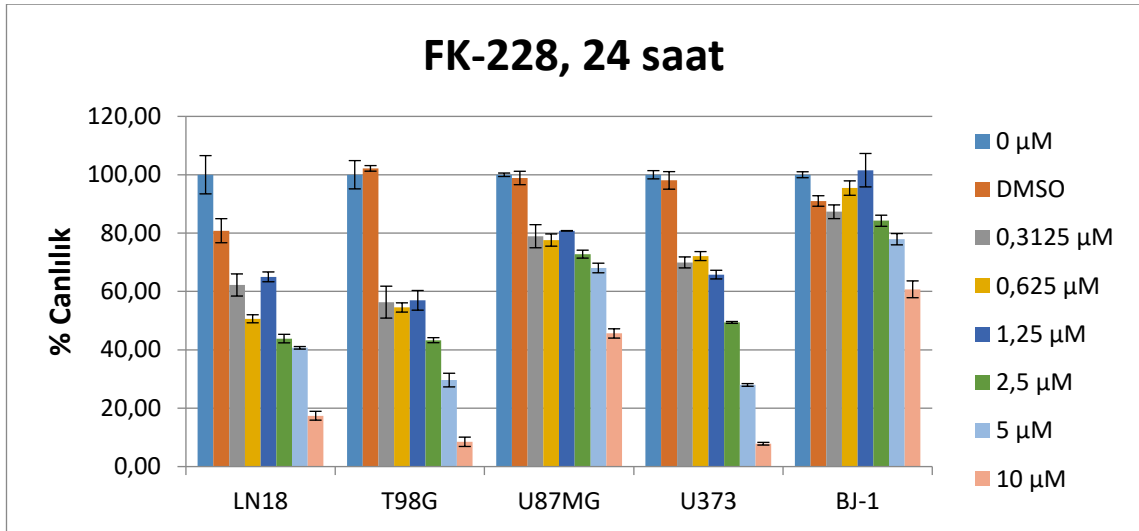


**Şekil 4.8** Belinostat (PXD-101)'in GBM ve BJ hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi.

#### 4.3.5. Romidepsin (FK-228)'in GBM Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

Romidepsin için de diğer HDACi'ler gibi 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlar 1 mM'lık ara stoktan seyreltilerek GBM ve BJ hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Diğer HDACi'lerle karşılaştırıldığında 24. saatin sonunda en belirgin sitotoksik etki Romidepsin tarafından gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak LN18, T98G ve U373 hücre hatlarında U87MG'ye göre daha belirgin bir sitotoksik etki gözlenmiştir. Romidepsin'in en yüksek dozunda BJ hücre hattında hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Tüm HDACi'ler arasında 48. saatin sonunda da en belirgin sitotoksik etkiye Romidepsin neden olmuştur. LN18, T98G ve U373 hücre hatlarında U87MG'ye göre hücre canlılığı daha fazla azalmıştır. Romidepsin, 72. saatin sonunda artan konsantrasyon ile birlikte LN18 ve T98G hücre hatlarının canlılığını %5'lerin altına düşürürken, U87MG ve U373 hücre hatlarında en düşük konsantrasyonlarda %20-40 arasında gözlenmiştir. En yüksek konsantrasyona doğru ise hücre canlılığı %5'lerin altına düşmüştür. Romidepsin'in BJ hücre hattının canlılığını da ciddi şekilde etkilediği gözlenmektedir. 24, 48 ve 72. saatlerde DMSO uygulanan hücrelerde, hücre canlılığında bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.9).

GBM hücrelerine uyguladığımız 5 farklı HDACi'yi değerlendirdiğimizde; 24, 48 ve 72 saatlik uygulamada en etkili HDACi'lerin Vorinostat, Belinostat ve Romidepsin olduğunu gördük. Bununla birlikte kendi başlarına en iyi sitotoksik etki gösteren HDACi Belinostat ve Romidepsin'dir. BJ hücre hattına uyguladığımız HDACi'lerin, hücre canlılığına etki etmesinin nedeni; BJ hücrelerinin yaşlanmasına veya strese girmiş olabilmesine bağlı olabilir.



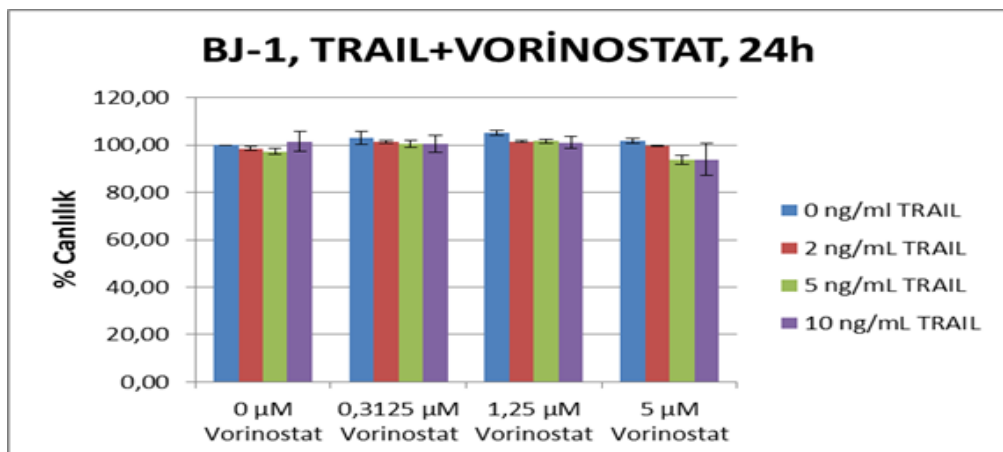
**Şekil 4.9** Romidepsin (FK-228)'in GBM ve BJ hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi.

#### 4.4. TRAIL ve HDACi'lerin GBM Hücreleri Üzerine Kombine Denemeleri

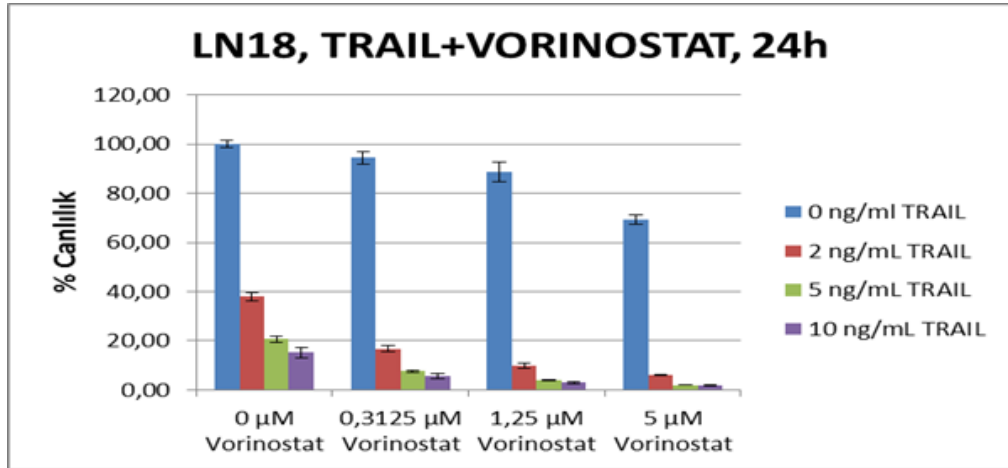
##### 4.4.1. TRAIL ve Vorinostat'ın Kombine Uygulamasının GBM Hücreleri Üzerine Etkisi

TRAIL ve Vorinostat'ın kombine uygulaması için 2, 5 ve 10 ng/ml TRAIL dozu, 0.3125, 1.25 ve 5  $\mu$ M Vorinostat dozu kendi aralarında kombine edilerek 24 saat boyunca uygulanmıştır. Kombine uygulamanın 24 saat olarak yapılmasının nedeni: hem TRAIL'in yarı ömrünün az olmasından dolayı, hem de amacımızın Vorinostat'ın GBM hücre hatlarında TRAIL'in duyarlılığını artırıp artırmadığını saptamaktır.

Kontrol hücresi olarak kullandığımız BJ hücre hattında TRAIL ve Vorinostat'ın kombine uygulaması hücre canlılığında herhangi bir değişime neden olmamıştır (Şekil 4.10). Sadece TRAIL uygulanmış LN18 hücre hatlarında, hücre canlılığı en yüksek TRAIL dozunda %100'den %15'lere düşmüştür. Vorinostat'ın tekli uygulamasında en yüksek düşüş 5  $\mu$ M'lık Vorinostat dozunda %69'dur. TRAIL ve Vorinostat kombine uygulandığında, Vorinostatın ve TRAIL'in tüm kombine dozlarında hücre canlılığı kontrol grubuna göre belirgin şekilde azalmıştır. En yüksek Vorinostat ve TRAIL kombine uygulamasında (5  $\mu$ M Vorinostat + 10 ng/ml TRAIL) hücre canlılığı %1'e düşmüştür (Şekil 4.11). Sonuç olarak; Vorinostat LN18 hücre hatlarının TRAIL'e olan duyarlılığını daha da arttırmış ve TRAIL-indüklü ölümü tetiklemiştir.

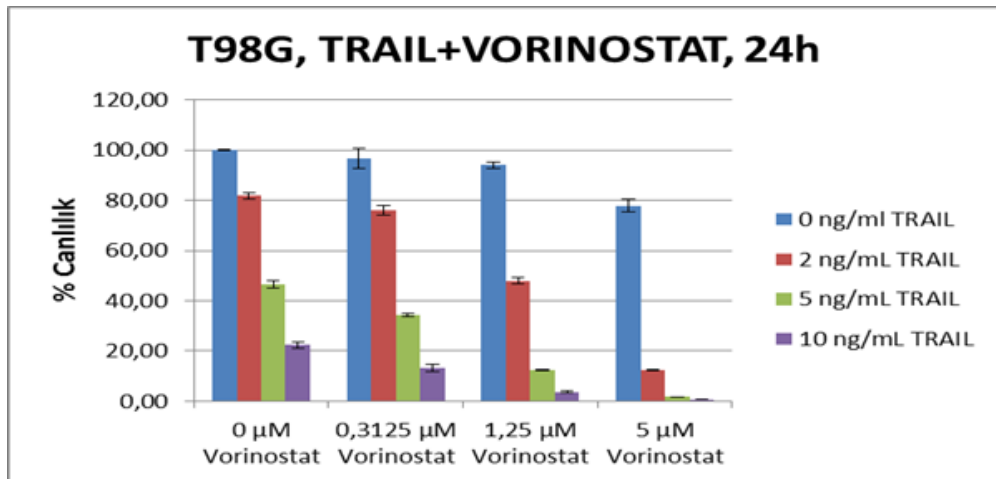


Şekil 4.10 TRAIL ve Vorinostat'ın kombine uygulamasının BJ hücreleri üzerine etkisi.



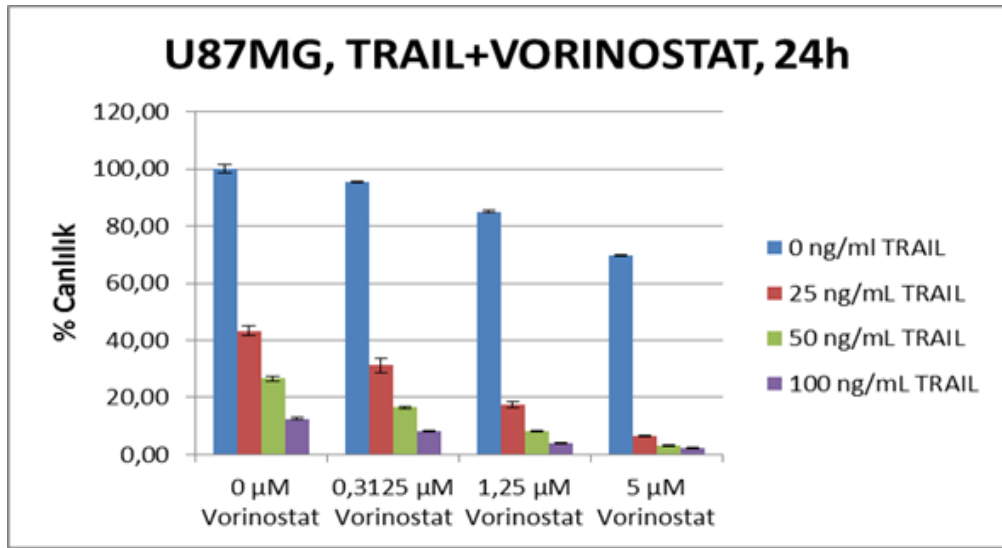
**Şekil 4.11** TRAIL ve Vorinostat'ın kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.

T98G hücre hattında, TRAIL en yüksek dozda tek başına hücre canlılığını %36, Vorinostat en yüksek dozda hücre canlılığını %90'a düşürmüştür. Birlikte kombine denediklerinde, hücre canlılığının %2 seviyesine düştüğü görülmektedir. İkinci denemede, TRAIL en yüksek dozda tek başına hücre canlılığını %22, Vorinostat en yüksek dozda hücre canlılığını %78'e düşürmüştür. Kombine uygulama sonucu, en yüksek dozlarda hücre canlılığının %1'e düştüğü görülmüştür (Şekil 4.12). Sonuç olarak; Vorinostat T98G hücrelerinin TRAIL'e olan duyarlılığını sağlayarak, T98G hücrelerinin TRAIL-aracılı ölümünü arttırmıştır.



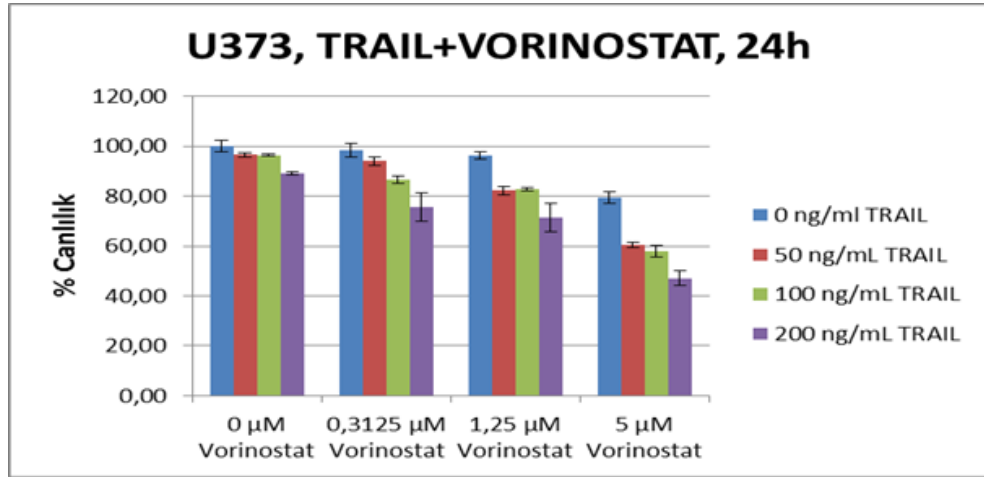
**Şekil 4.12** TRAIL ve Vorinostat'ın kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.

U87MG hücre hattında, TRAIL 25, 50 ve 100 ng/ml dozlarında hücre canlılığını %100'den sırasıyla %43, 27 ve 13'e azaltmıştır. Vorinostat ise 0.3125, 1.25 ve 5  $\mu$ M'lık dozlarda sırasıyla %100'den %95, 85 ve 70'e indirmiştir. Birlikte kombine uygulandıklarında örneğin; 25 ng/ml TRAIL + 5  $\mu$ M Vorinostat konsantrasyonunda hücre canlılığı %6'lara, hem TRAIL hem de Vorinostat'ın en yüksek doz kombinasyonunda ise hücre canlılığı %2'lere düşmüştür (Şekil 4.13). Sonuç olarak; Vorinostat U87MG hücre hattında TRAIL'in tek başına yaptığı etkiyi arttırmış ve bu hücreleri TRAIL'e daha duyarlı hale getirerek, TRAIL-indüklü hücre ölümünü arttırmıştır.



**Şekil 4.13** TRAIL ve Vorinostat'ın tekli ve kombine dozlarının U87MG hücreleri üzerine etkisi.

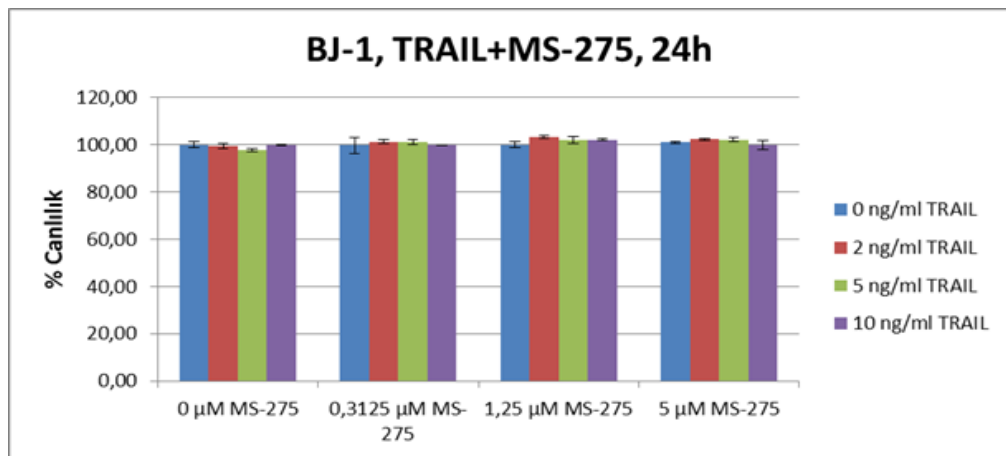
U373 hücre hattı ile yapılan kombine denemede, 200 ng/ml'lik TRAIL konsantrasyonu hücre canlılığını kontrol grubuna göre %100'den 89'a indirmiştir. Vorinostat'ın 0.3125, 1.25 ve 5  $\mu$ M'lık konsantrasyonlarının 200 ng/ml'lik TRAIL ile kombinasyonu hücre canlılığını sırasıyla %60, 58 ve 47'ye düşürmüştür (Şekil 4.14). İkinci denemede ilk denemeye göre Vorinostat ve TRAIL'in kombine uygulaması, diğer hücre hatları kadar olmasa da hücre canlılığını azaltmıştır. Vorinostat'ın U373 hücre hattını TRAIL'e duyarlı hale getirdiğini söyleyebiliriz.



Şekil 4.14 Vorinostat ve TRAIL'in kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi.

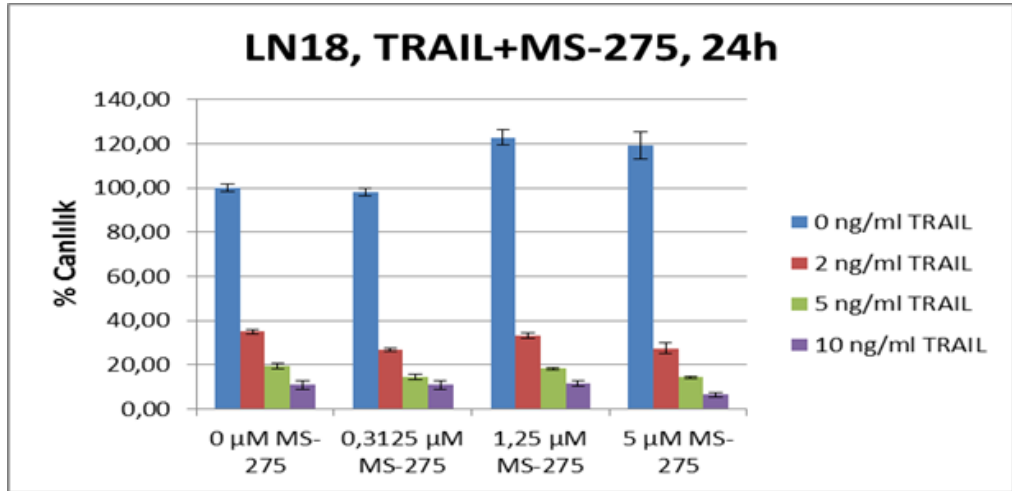
#### 4.4.2. TRAIL ve MS-275'in Kombine Uygulamasının GBM Hücreleri Üzerine Etkisi

TRAIL ve MS-275'in kombine uygulaması sonucu BJ hücrelerinde kontrol grubuna göre herhangi bir değişim meydana gelmemiştir (Şekil 4.15). LN18 hücrelerinde, TRAIL'in 2, 5 ve 10 ng/ml'lik dozları tek başına hücre canlılığını %100'den sırasıyla %35, 19 ve 11'e düşürmüştür. MS-275 ile kombine denendiğinde, örneğin 5 µM MS-275 ve TRAIL'in 2, 5 ve 10 ng/ml konsantrasyonlarıyla yapılan kombine denemelerde hücre canlılığının sırasıyla %27, 14 ve 6'ya düştüğü görülmüştür (Şekil 4.16). MS-275, az da olsa LN18 hücrelerini TRAIL'e duyarlı hale getirmiştir fakat Vorinostat ile karşılaştırıldığında, Vorinostat'ın MS-275'e göre LN18 hücre hattı için TRAIL duyarlılığını arttırmada daha etkili bir HDACi olduğu görülmektedir.



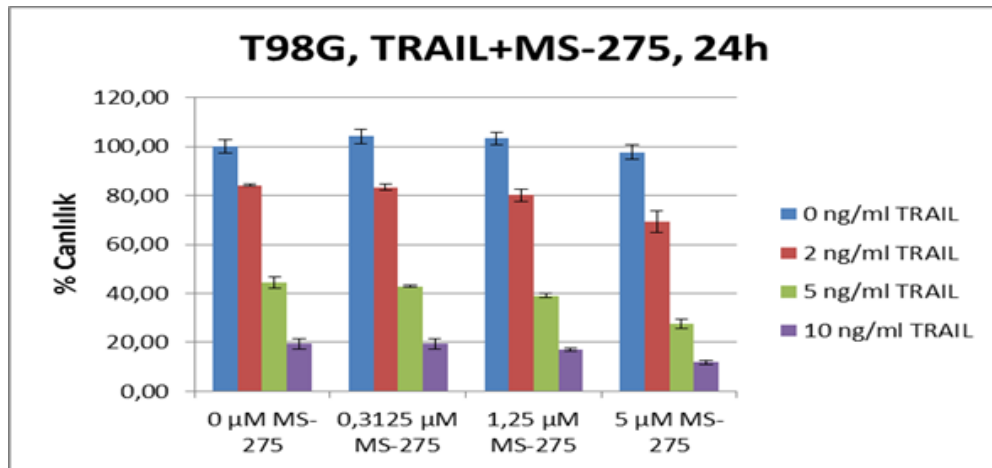
Şekil 4.15 TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının BJ hücreleri üzerine etkisi.





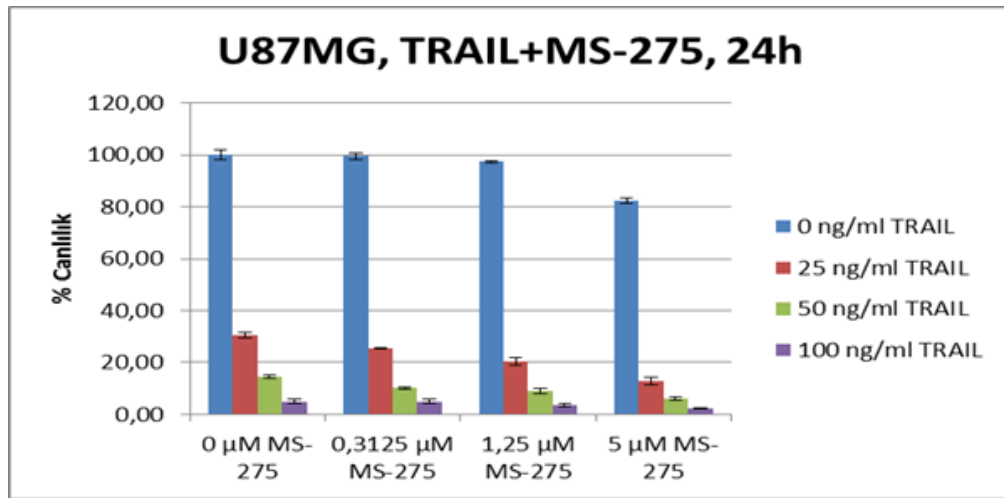
**Şekil 4.16** TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.

T98G hücrelerinde, TRAIL hücre canlılığını ilgili dozlarında sırasıyla %84, 44 ve 20'ye düşürmüştür. En belirgin düşüş yine 5 µM MS-275, 10 ng/ml TRAIL kombinasyonunda gözlenmiştir ve hücre canlılığı %12 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.17). LN18 hücre hattındaki sonuca benzer şekilde, MS-275 T98G hücre hatlarının TRAIL'a olan duyarlılığını az da olsa etkilemiştir fakat Vorinostat kadar belirgin bir etkiye neden olmamıştır. Bulgularımıza göre, Vorinostat'ın T98G hücre hattında TRAIL duyarlılığını arttırmada daha etkili bir HDACi olduğu düşünülebilir.



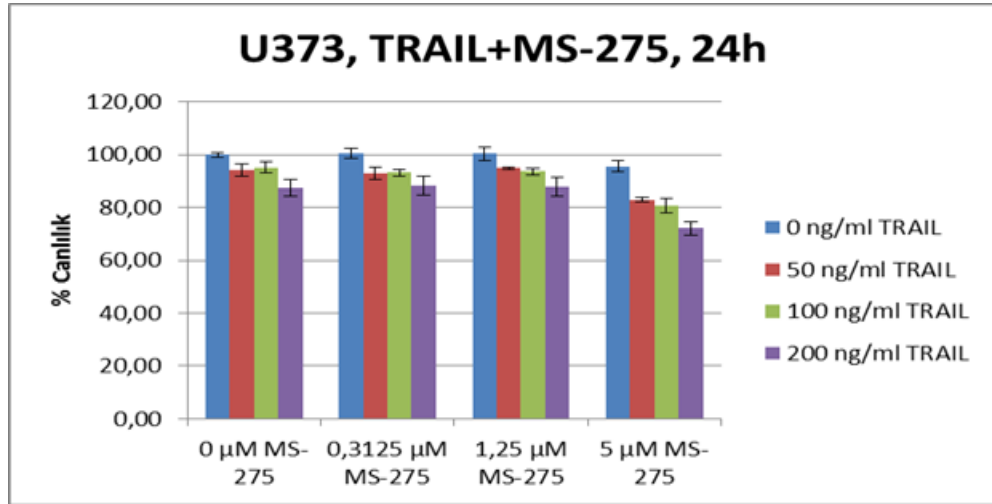
**Şekil 4.17** TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.

TRAIL, U87MG hücrelerinde, hücre canlılığını tek başına sırasıyla %30, 15 ve 5'e düşürmüştür. Kombine uygulamalarda en belirgin azalış yine 5  $\mu$ M MS-275 ve TRAIL dozlarıyla yapılan kombine denemelerde gözlenmiştir. 5  $\mu$ M MS-275 ve 25, 50 ve 100 ng/ml TRAIL kombinasyonu sırasıyla hücre canlılığını %13, 6 ve 2'e düşürmüştür (Şekil 4.18). MS-275, U87MG hücrelerini kısmen TRAIL'a duyarlı hale getirmiştir ama Vorinostat ile karşılaştırıldığında MS-275'in bu hücre hattı için TRAIL'a duyarlılığı artırma potansiyeli daha azdır.



**Şekil 4.18** TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının U87MG hücreleri üzerine etkisi.

U373 hücre hattı için yapılan TRAIL ve MS-275 kombine denemelerinde, MS-275'in 0.3125 ve 1.25  $\mu$ M'lık dozu ve TRAIL'in üç dozu ile yapılan kombine çalışmada, hücre canlılığında belirgin bir şekilde azalma gözlenmemiştir. Hücre canlılığındaki en belirgin düşüş, 5  $\mu$ M MS-275 ve 200 ng/ml TRAIL kombine denemesinde belirlenmiştir ve hücre canlılığı %72'lere düşmüştür (Şekil 4.19). MS-275'in kısmen de olsa U373 hücrelerinin TRAIL'e olan duyarlılığını arttırdığı görülmüştür.

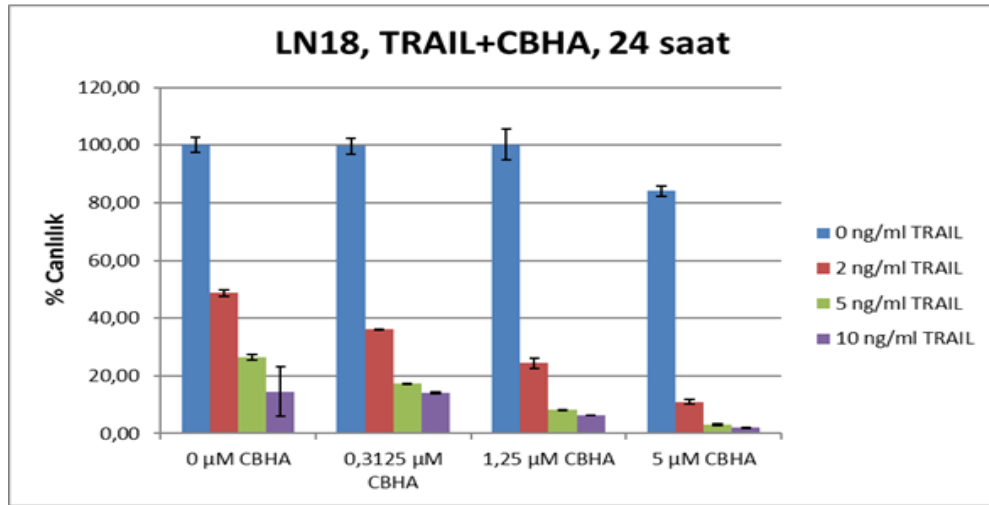


**Şekil 4.19** TRAIL ve MS-275'in kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi.

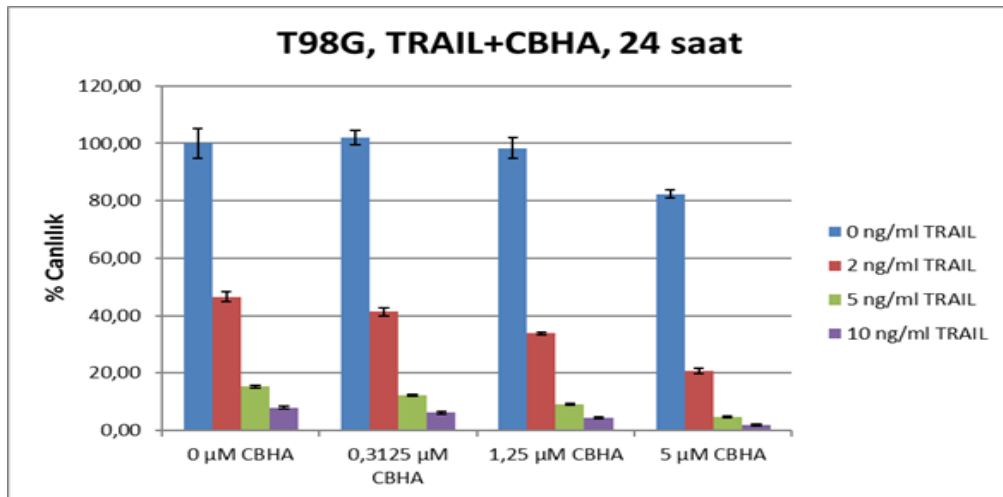
#### 4.4.3. TRAIL ve CBHA'nın Kombine Uygulamasının GBM Hücreleri Üzerine Olan Etkisi

TRAIL ve CBHA kombine uygulamasında; TRAIL'in 2, 5 ve 10 ng/ml'lik konsantrasyonları, CBHA için 0,3125 – 1,25 ve 5 µM'lık konsantrasyonları seçilmiştir. Kombine uygulama sonrasında; TRAIL tek başına ve artan konsantrasyonlarda LN18 hücre canlılığı azaltmıştır. CBHA HDACi'nin tek başına uygulaması, en yüksek konsantrasyonda hücre canlılığını %84'lere düşürmüştür. Kombine uygulama sonrası açıkça görülmektedir ki; CBHA'nın tüm seçilmiş dozları TRAIL ile kombine uygulandığında, artan konsantrasyon ile birlikte hücre canlılığı belirgin şekilde azalmaktadır. CBHA, LN18 hücrelerinin TRAIL-aracılı hücre ölümünü arttırmış, en belirgin etkinin 5 µM dozla olan kombine denemede olduğu görülmüştür (Şekil 4.20).

T98G için yapılan kombine denemelerde, TRAIL tek başına ve artan konsantrasyonlarda T98G hücre canlılığını azaltmıştır. CBHA'nın tek başına uygulaması hücre canlılığını %82'lere düşürmüştür. Kombine uygulama sonuçları bize, CBHA'nın T98G hücrelerinin TRAIL'e olan duyarlılığını kısmi derecede arttırdığını göstermektedir (Şekil 4.21).

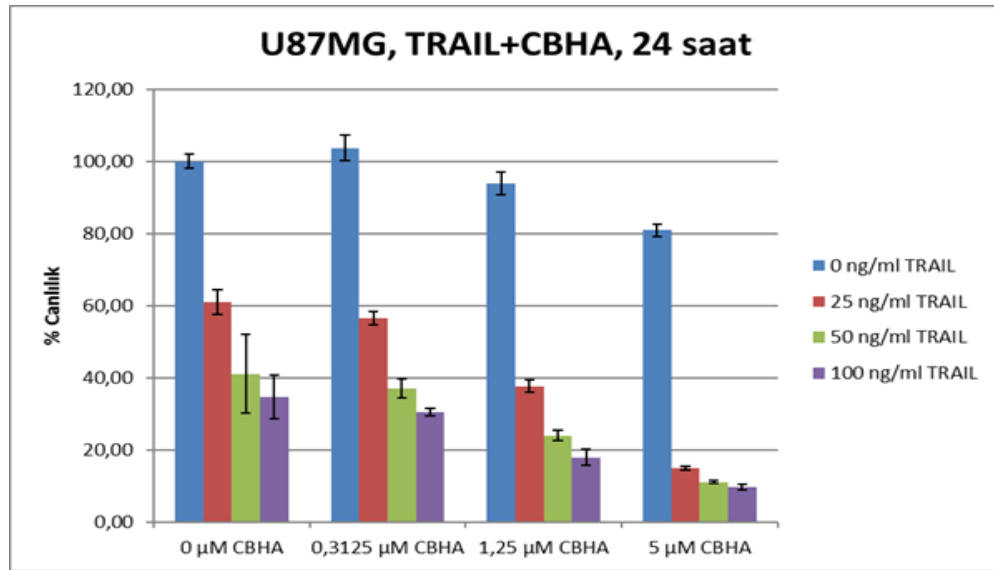


**Şekil 4.20** TRAIL ve CBHA'nın kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.



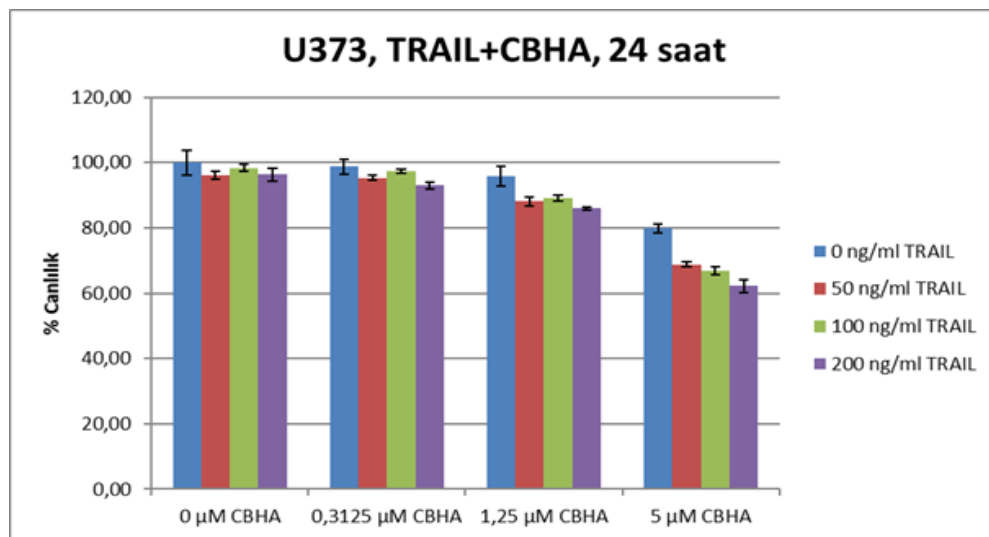
**Şekil 4.21** TRAIL ve CBHA'nın kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.

U87MG hücre hattında için; TRAIL 25, 50 ve 100 ng/ml dozlarında hücre canlılığını %100'den sırasıyla %61, 41 ve 35'e azaltmıştır. CBHA ise 0.3125, 1.25 ve 5 µM'lık dozlarda hücre canlılığını sırasıyla %100'den %103, 94 ve 81'e indirmiştir. Birlikte kombine uygulandıklarında örneğin; 25 ng/ml TRAIL + 5 µM CBHA konsantrasyonunda hücre canlılığı %15'lere, hem TRAIL hem de CBHA'nın en yüksek doz kombinasyonunda ise hücre canlılığı %9'lara düşmüştür (Şekil 4.22). Sonuç olarak; CBHA U87MG hücre hattında TRAIL'in tek başına yaptığı etkiye arttırmış ve bu hücreleri TRAIL'e daha duyarlı hale getirerek, TRAIL-indüklü hücre ölümünü arttırmıştır.



**Şekil 4.22** TRAIL ve CBHA'nın kombine uygulamasının U87MG hücreleri üzerine etkisi.

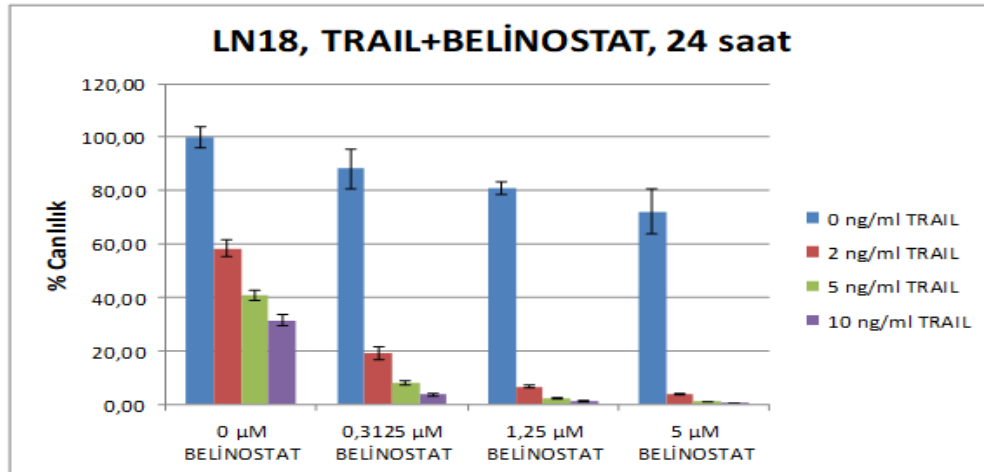
TRAIL-dirençli U373 hücre hattında; TRAIL 50, 100 ve 200 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde uygulanmış ve hücre canlılığı sırasıyla %96, 98 ve 96 olarak belirlenmiştir. CBHA'nın 0,3125 – 1.25 ve 5 µM'lık konsantrasyonları ise hücre canlılığını sırasıyla %98, 96 ve 80'lere düşürmüştür. Kombine uygulamada ise; CBHA ilk iki konsantrasyonda TRAIL duyarlılığını etkin şekilde arttırmamıştır, en yüksek konsantrasyondaki kombine uygulaması ise U373 hücrelerinde TRAIL'e olan duyarlılığı kısmi derecede arttırmıştır (Şekil 4.23).



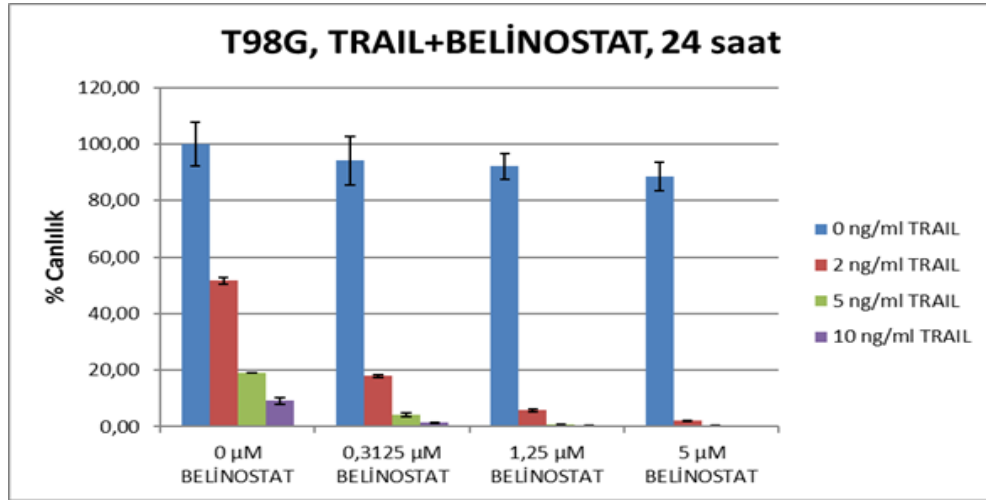
**Şekil 4.23** TRAIL ve CBHA'nın kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi.

#### 4.4.4. TRAIL ve Belinostat (PXD-101)'in kombine uygulamasının GBM hücreleri üzerine etkisi

LN18 ve T98G hücre hattı için; TRAIL (2, 5 ve 10 ng/ml) ve Belinostat'ın (0.3125, 1.25 ve 5  $\mu$ M) belirlenen dozları kombine olarak denenmiştir. Kombine uygulama sonrasında, TRAIL tek başına ve artan konsantrasyonlarda LN18 hücrelerinin canlılığını azaltmıştır. Belinostat'ın en yüksek dozu hücre canlılığını %72'lere düşürmüştür. Kombine uygulama sonrası açıkça görülmektedir ki; Belinostat'ın üç dozu da TRAIL ile kombine uygulandığında, artan doz ile birlikte hücre canlılığı belirgin şekilde azalmaktadır (Şekil 4.24). Kombine uygulama sonrasında; TRAIL tek başına ve artan konsantrasyonlarda T98G hücre canlılığı azaltmıştır. Belinostat'ın tek başına uygulaması, en yüksek konsantrasyonda hücre canlılığını %88'lere düşürmüştür. Kombine uygulama sonrası açıkça görülmektedir ki; Belinostat ve TRAIL'in en düşük konsantrasyonlarının kombine uygulaması bile T98G hücre canlılığını belirgin şekilde azaltmıştır (Şekil 4.25). Sonuç olarak; Belinostat hem LN18 hem de T98G hücre hatlarının TRAIL'e olan duyarlılığını arttırmıştır.

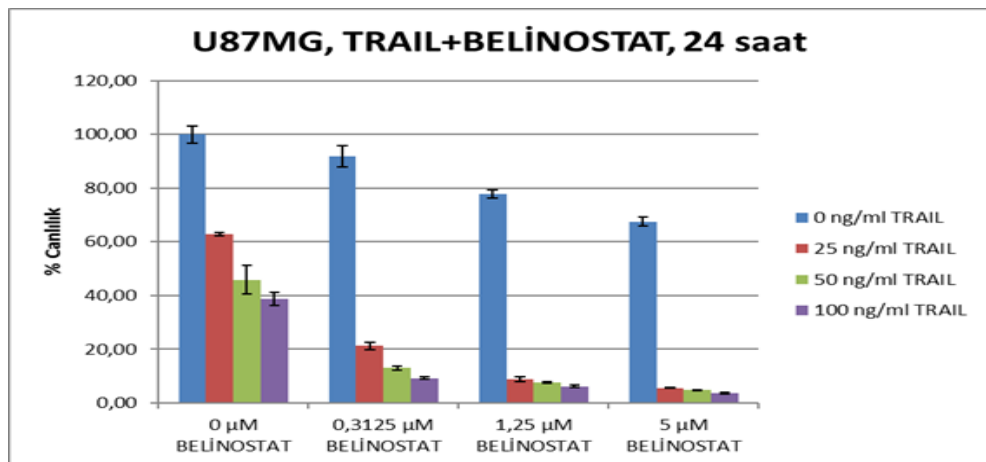


Şekil 4.24 TRAIL ve Belinostat'ın kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.



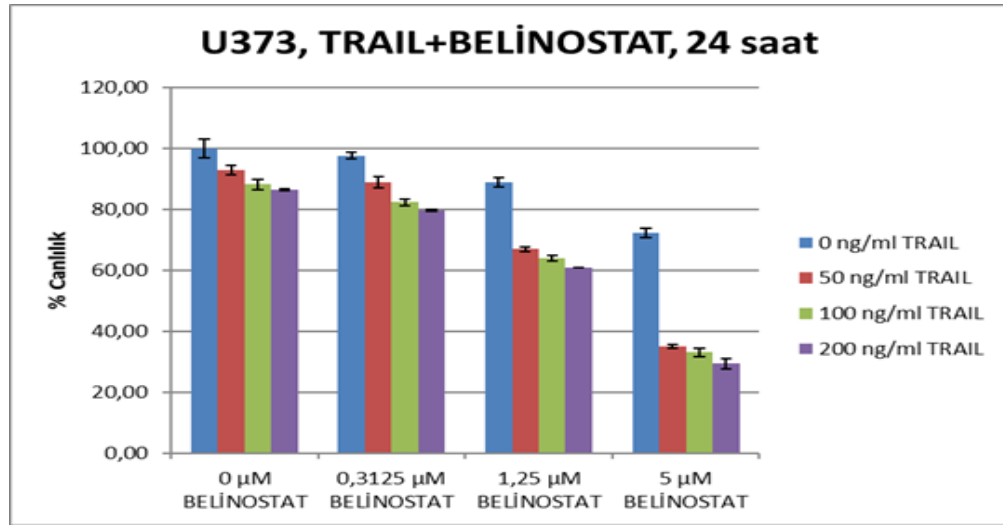
**Şekil 4.25** TRAIL ve Belinostat'ın kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.

U87MG hücre hattında için; TRAIL 25, 50 ve 100 ng/ml dozlarında hücre canlılığını %100'den sırasıyla %63, 46 ve 38'e azaltmıştır. Belinostat ise 0.3125, 1.25 ve 5 µM'lık dozlarda hücre canlılığını sırasıyla %100'den %92, 78 ve 68'e indirmiştir. Birlikte kombine uygulandıklarında örneğin; 25 ng/ml TRAIL + 0,3125 µM Belinostat konsantrasyonunda hücre canlılığı %20'lere, hem TRAIL hem de Belinostat'ın en yüksek doz kombinasyonunda ise hücre canlılığı %3'lere düşmüştür (Şekil 4.26). Sonuç olarak; Belinostat U87MG hücre hattında TRAIL'in tek başına yaptığı etkiye arttırmış ve bu hücreleri TRAIL'e daha duyarlı hale getirerek, TRAIL-indüklü hücre ölümünü arttırmıştır.



**Şekil 4.26** TRAIL ve Belinostat'ın kombine uygulamasının U87MG hücreleri üzerine etkisi.

U373 hücre hattında için; TRAIL 50, 100 ve 200 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde uygulanmış ve hücre canlılığı sırasıyla %93, 88 ve 86 olarak belirlenmiştir. Belinostat'ın 0.3125, 1.25 ve 5  $\mu$ M'lık konsantrasyonları ise hücre canlılığını sırasıyla %97, 89 ve 72'lere düşürmüştür. Kombine uygulamada ise; hücre canlılığında en belirgin azalışın, Belinostat'ın en yüksek konsantrasyonuyla TRAIL dozlarının kombine edilmesinde gözlenmiştir (Şekil 4.27). Bu sonuçlara bakarak, Belinostat'ın 5  $\mu$ M'lık dozu, U373 GBM hücre hattını TRAIL aracılı hücre ölümüne duyarlı hale getirmiştir.

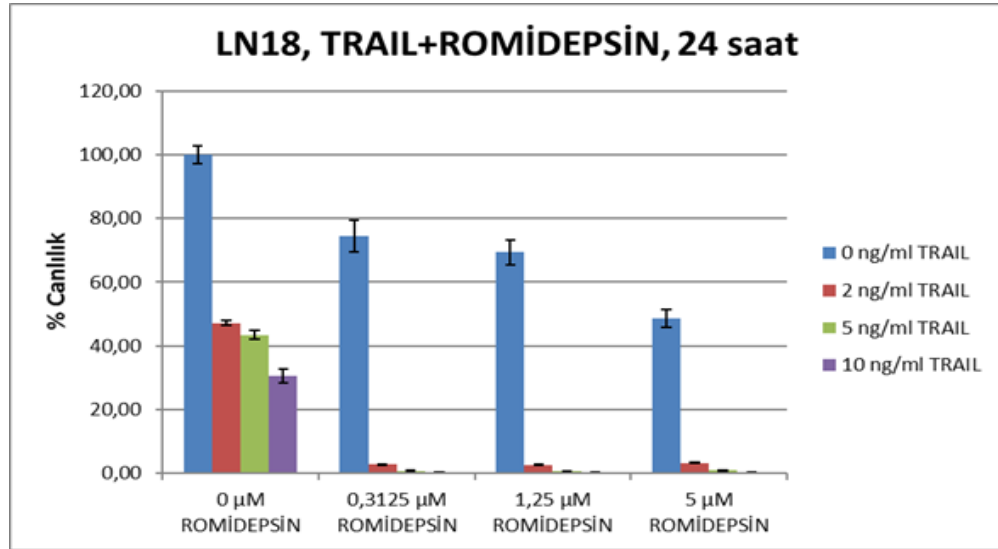


**Şekil 4.27** TRAIL ve Belinostat'ın kombine uygulamasının U373 hücre hattı üzerine etkisi.

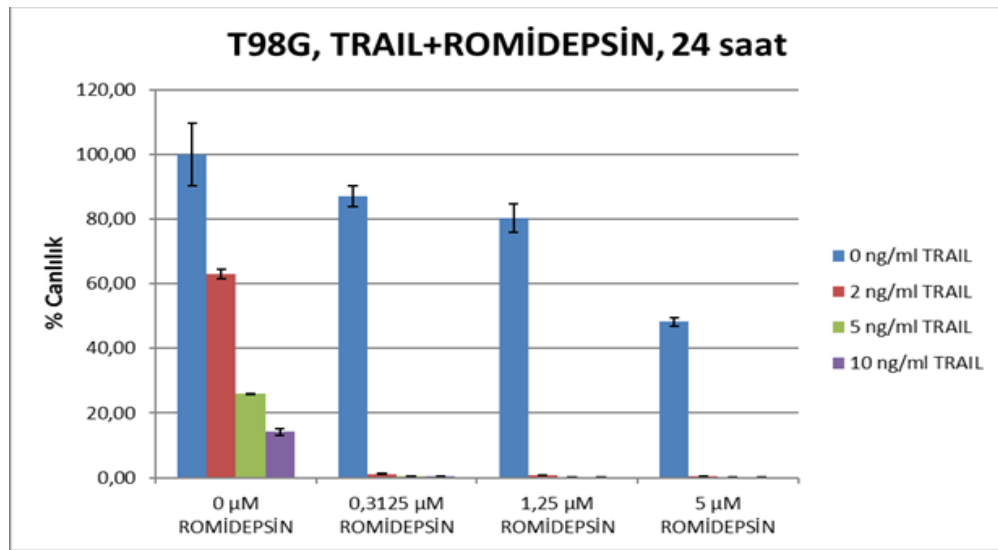
#### 4.4.5. TRAIL ve Romidepsin (FK-228)'in kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi

LN18 ve T98G hücre hattı için; TRAIL'in 2, 5 ve 10 ng/ml'lik konsantrasyonları, Romidepsin için 0.3125, 1.25 ve 5  $\mu$ M'lık konsantrasyonları seçilerek kombine denemeler yapılmıştır. TRAIL tek başına her iki hücre hattında da artan konsantrasyonlarda hücre canlılığını azaltmıştır. Romidepsin'in tek başına uygulanması, en yüksek konsantrasyonda LN18 ve T98G hücre hatlarının canlılığını sırasıyla %49 ve %48'e düşürmüştür. Kombine uygulaması sonrası açıkça görülmektedir ki; Belinostat ve TRAIL'in en düşük konsantrasyonlarının kombine edilmesi bile her iki hücre hattının ölümünü ciddi şekilde arttırmıştır (Şekil 4.28 ve 4.29). Bu nedenle, Romidepsin LN18 ve T98G hücre hatlarını TRAIL-aracılı ölüme duyarlı hale getirmiştir.





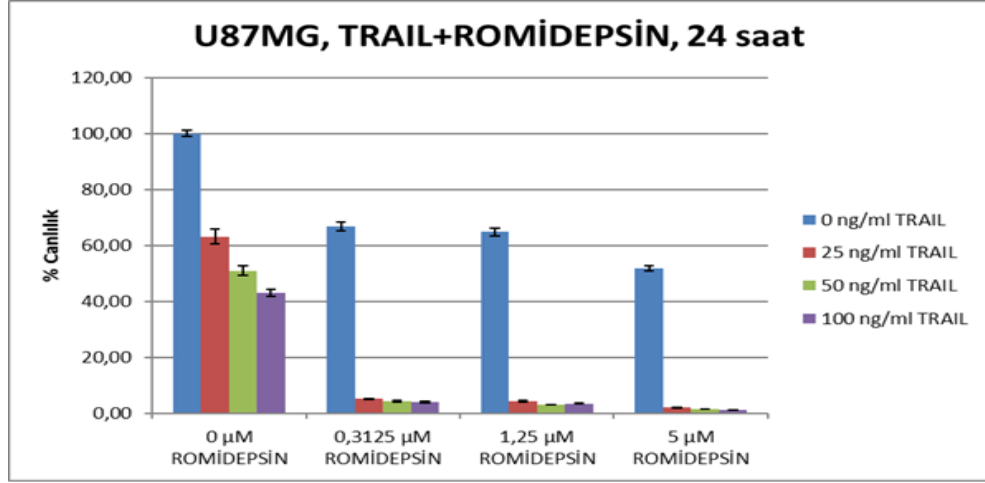
**Şekil 4.28** TRAIL ve Romidepsin'in kombine uygulamasının LN18 hücreleri üzerine etkisi.



**Şekil 4.29** TRAIL ve Romidepsin'in kombine uygulamasının T98G hücreleri üzerine etkisi.

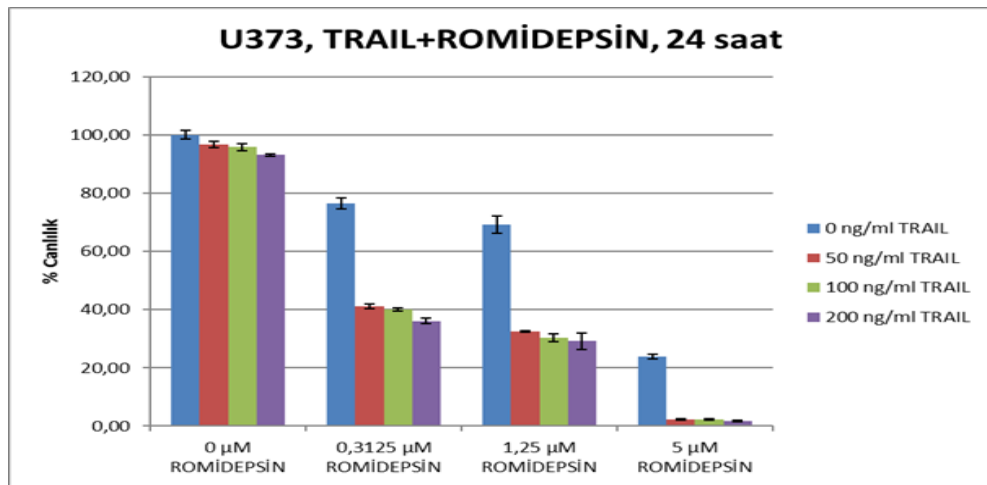
U87MG hücre hattında için; TRAIL 25, 50 ve 100 ng/ml dozlarında hücre canlılığını %100'den sırasıyla %63, 51 ve 43'e azaltmıştır. Romidepsin ise 0.3125, 1.25 ve 5 µM'lık dozlarda hücre canlılığını sırasıyla %100'den %67, 65 ve 52'e indirmiştir. Birlikte kombine uygulandıklarında örneğin; 25 ng/ml TRAIL + 0,3125 µM Romidepsin konsantrasyonunda hücre canlılığı %5'lere, hem TRAIL hem de Romidepsin'in en yüksek doz kombinasyonunda ise hücre canlılığı %1'lere düşmüştür (Şekil 4.30). Sonuç

olarak; Romidepsin, TRAIL ile birlikte sinerjistik etki göstererek, U87MG hücre hattını TRAIL'e daha duyarlı hale getirerek, TRAIL-indüklü hücre ölümünü arttırmıştır.



**Şekil 4.30** TRAIL ve Romidepsin'in kombine uygulamasının U87MG hücreleri üzerine etkisi.

U373 hücre hattı için; TRAIL 50, 100 ve 200 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde uygulanmış ve hücre canlılığı sırasıyla %97, 96 ve 93 olarak belirlenmiştir. Romidepsin'in 0.3125, 1.25 ve 5 µM'lık konsantrasyonları ise hücre canlılığını sırasıyla %76, 69 ve 24'lere düşürmüştür. Kombine uygulamada ise; Romidepsin'in U373 hücrelerinin ölümünü daha da arttırarak, TRAIL-aracılı hücre ölümünü indüklediği görülmektedir (Şekil 4.31). Bundan dolayı, Romidepsin, U373 hücrelerinin TRAIL'a olan duyarlılığını ciddi şekilde arttırmaktadır.



**Şekil 4.31** TRAIL ve Romidepsin'in kombine uygulamasının U373 hücreleri üzerine etkisi.

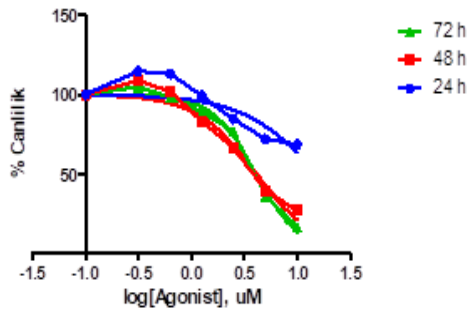
#### 4.5. GBM Hücre Hatlarında HDACi'lerin IC<sub>50</sub> Değerlerinin GraphPad Prism, 5.0 ile Analizi

GraphPad Prism programı, sitotoksik etkinin değerlendirildiği ve IC<sub>50</sub> değerinin logaritmik taban baz alınarak hesaplandığı bilgisayar temelli bir programdır. Bu programı kullanarak, Vorinostat, MS-275, Belinostat, CBHA ve Romidpesin HDACi'lerin doza ve zamana bağlı sitotoksik etkilerini değerlendirdik. Sonuçlar şekil 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36 ve 4.37'da ve tablo 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, ve 4.5'de özetlenmiştir.

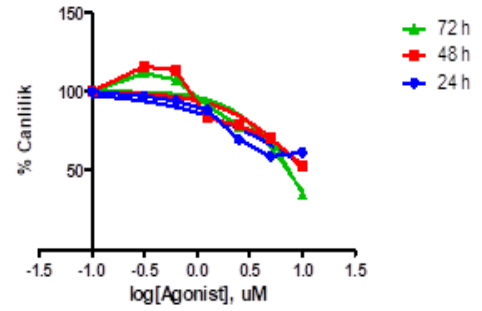
Yapılan analiz sonucu, IC<sub>50</sub> grafiklerinden de anlaşılacağı üzere, GBM hücreleri üzerine en iyi etki gösteren HDACi'nin Romidepsin ve Belinostat olduğunu gördük. Bu nedenle bundan sonra gerçekleştirilecek olan deneylere bu iki HDACi ile devam etme kararı aldık. Ayrıca, hücre hatlarını da kendi arasında karşılaştırdığımızda, deneylerimiz boyunca gerek kültür aşamalarında gerekse sonuç alma yönünden T98G, U87MG ve U373 hücreleri ile daha etkili çalışılmıştır. Bu nedenle, LN18 hücrelerinin kültür aşamalarındaki problemlerden dolayı, bundan sonraki çalışmalardan çıkarılmıştır. Bundan sonraki çalışmalara T98G, U87MG ve U373 GBM hücre hatları ile devam edilmiştir.

Belinostat ve Romidepsin için GrapPad Prism IC<sub>50</sub> sonuçları ve TRAIL ile gerçekleştirilen kombine denemelerindeki dozlar baz alınarak, bundan sonraki deneyler için IC<sub>50</sub> dozunun altında bulunan, diğer bir ifadeyle toksik etkinin altında bulunan doz seçilmiştir. Belinostat için T98G ve U87MG hücre hatlarında 1.25 µM'lık konsantrasyon, U373 hücre hattı için 5 µM'lık doz uygun görülmüştür. Romidepsin için her üç hücre hattında 0.3125 µM'lık konsantrasyon uygun doz olarak belirlenmiştir.

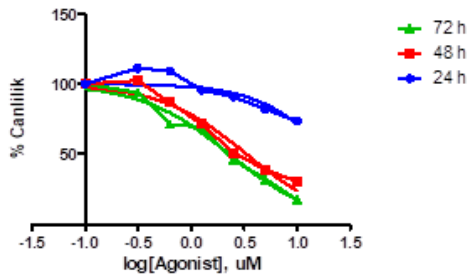
Normalize of Row Stats of LN18 Vorinostat



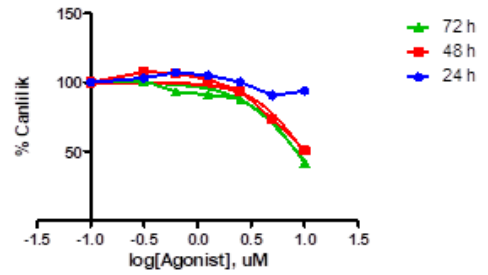
Normalize of Row Stats of T98G Vorinostat



Normalize of Row Stats of U87MG Vorinostat



Normalize of Row Stats of U373 Vorinostat



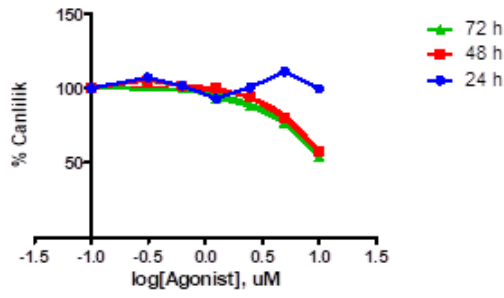
**Şekil 4.32** Vorinostat'ın GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.

**Tablo 4.1** Vorinostat'ın GBM hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> (µM) değerleri.

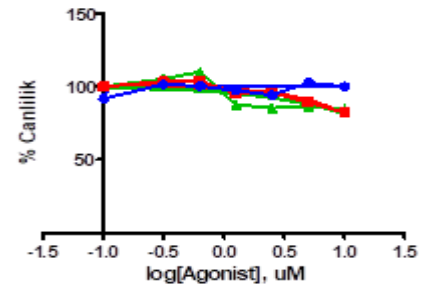
<b>VORINOSTAT – IC<sub>50</sub></b>			
	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>LN18</b>	15.66	4.123	4.068
<b>T98G</b>	12.43	10.30	7.230
<b>U87MG</b>	20.99	3.341	2.298
<b>U373</b>	-*	9.807	8.525

\*GraphPad Prism programı tarafından belirlenememiştir (Hücre canlılığı değişimine bağlı olarak).

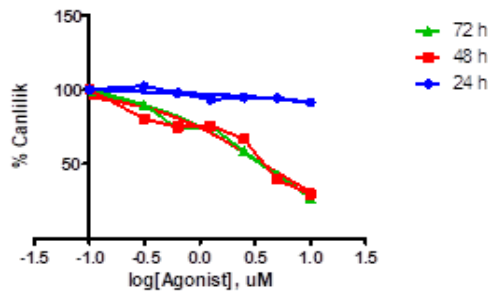
Normalize of Row Stats of LN18 MS-275



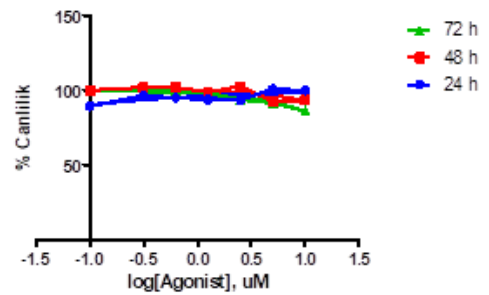
Normalize of Row Stats of T98G MS-275



Normalize of Row Stats of U87MG MS-275



Normalize of Row Stats of U373 MS-275

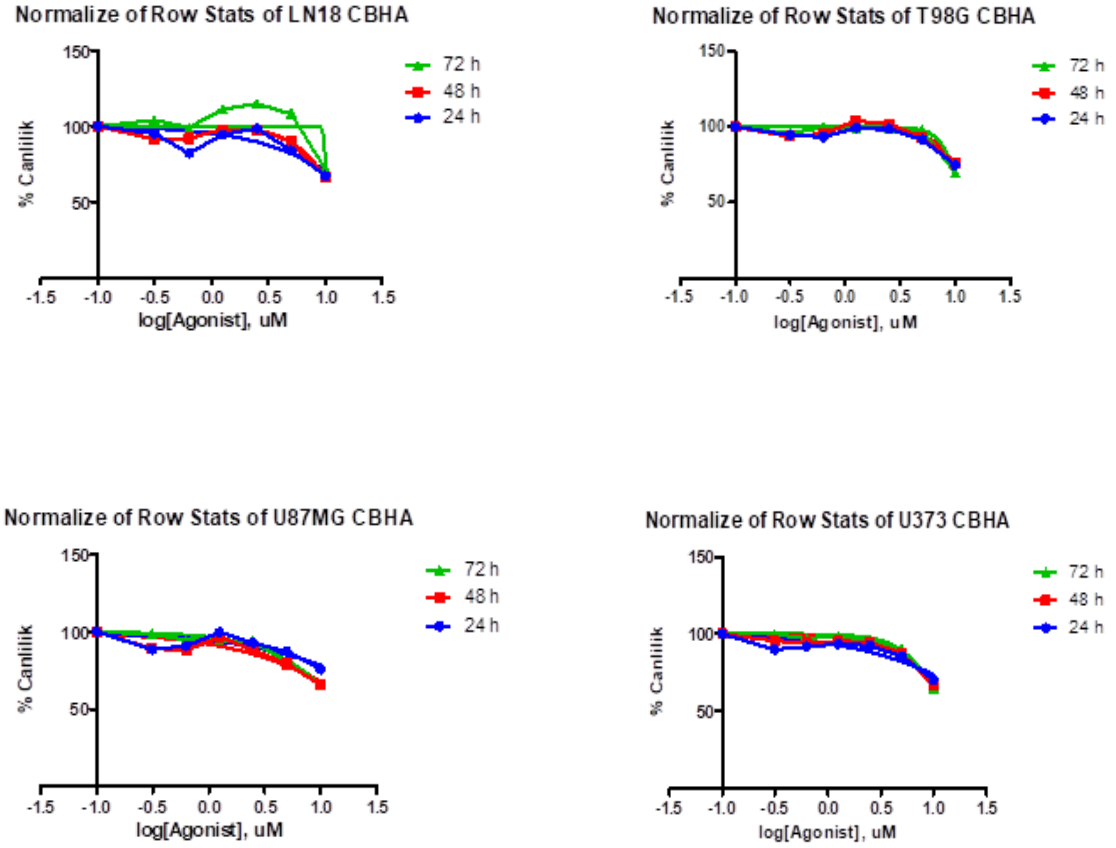


Şekil 4.33 MS-275'in GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.

Tablo 4.2 MS-275'in GBM hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> (µM) değerleri.

	MS-275 – IC <sub>50</sub>		
	24 saat	48 saat	72 saat
LN18	-*	11.87	11.35
T98G	-*	36.40	75.25
U87MG	849.3	3.789	3.520
U373	0,0004677	67.42	76.05

\*GraphPad Prism programı tarafından belirlenememiştir (Hücre canlılığı değişimine bağlı olarak).

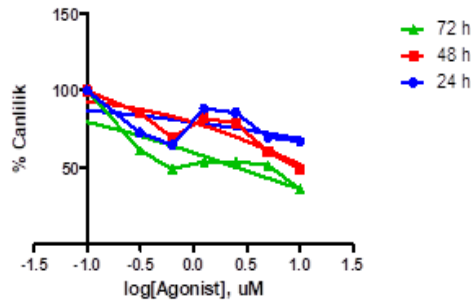


**Şekil 4.34** CBHA'nın GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.

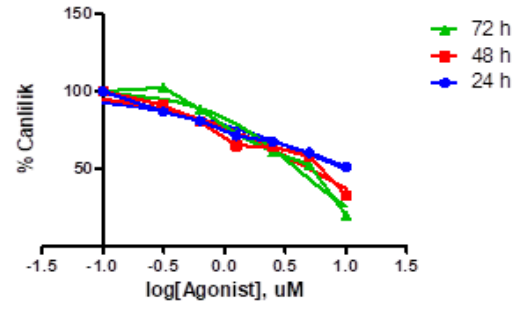
**Tablo 4.3** CBHA'nın GBM hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> (µM) değerleri.

	CBHA – IC <sub>50</sub>		
	24 saat	48 saat	72 saat
LN18	25.23	13.77	10.22
T98G	17.91	15.86	12.10
U87MG	64.34	27.66	17.73
U373	41.56	17.25	13.45

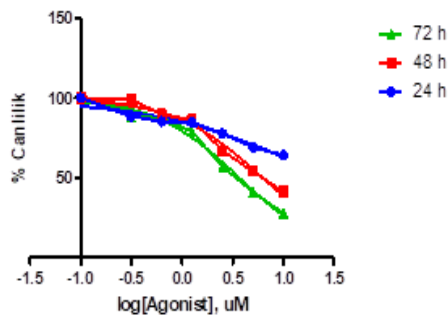
Normalize of Row Stats of LN18 BELINOSTAT



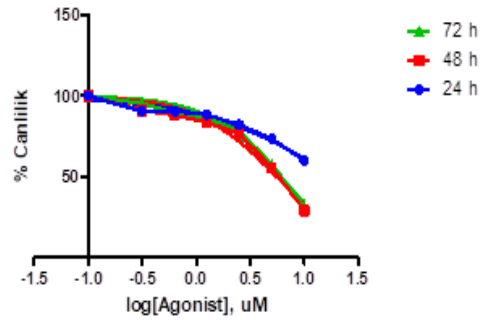
Normalize of Row Stats of T98G BELINOSTAT



Normalize of Row Stats of U87MG BELINOSTAT



Normalize of Row Stats of U373 BELINOSTAT

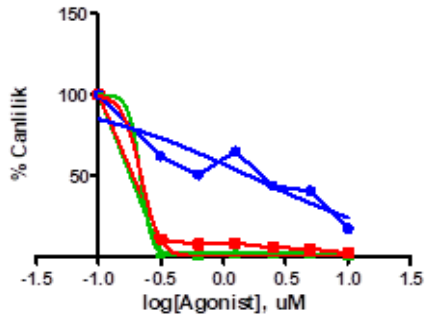


**Şekil 4.35** Belinostat'ın GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.

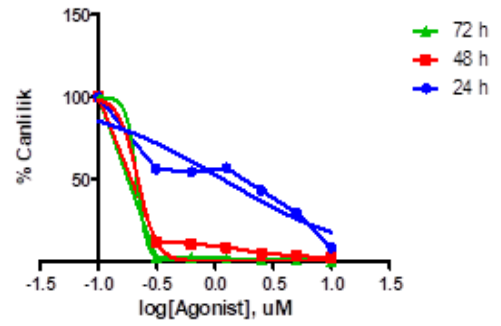
**Tablo 4.4** Belinostat'ın GBM hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> (µM) değerleri.

<b>Belinostat – IC<sub>50</sub></b>			
	24 saat	48 saat	72 saat
<b>LN18</b>	251.0	11.65	2.561
<b>T98G</b>	9.850	4.990	3.964
<b>U87MG</b>	27.86	6.257	3.686
<b>U373</b>	19.46	5.571	6.036

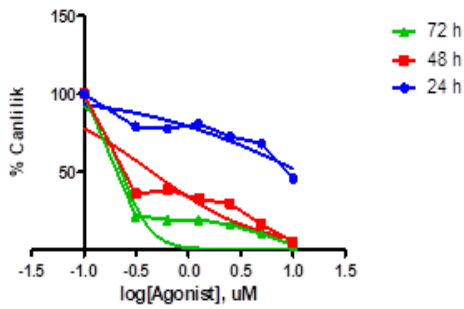
Normalize of Row Stats of LN18 Romidepsin



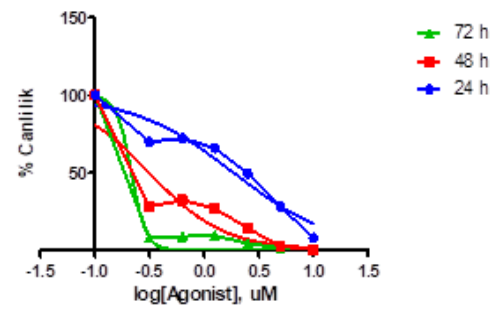
Normalize of Row Stats of T98G Romidepsin



Normalize of Row Stats of U87MG ROMIDEPSIN



Normalize of Row Stats of U373 ROMIDEPSIN



**Şekil 4.36** Romidepsin'in GBM hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etkisi.

**Tablo 4.5** Romidepsin'in GBM hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> (µM) değerleri.

<b>Romidepsin – IC<sub>50</sub></b>			
	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>LN18</b>	1.608	0.2189	0.2163
<b>T98G</b>	1.174	0.2180	0.2134
<b>U87MG</b>	11.65	0.4469	0.2288
<b>U373</b>	1.854	0.3128	0.2147



#### 4.6. Akım-sitometri Deneyleri

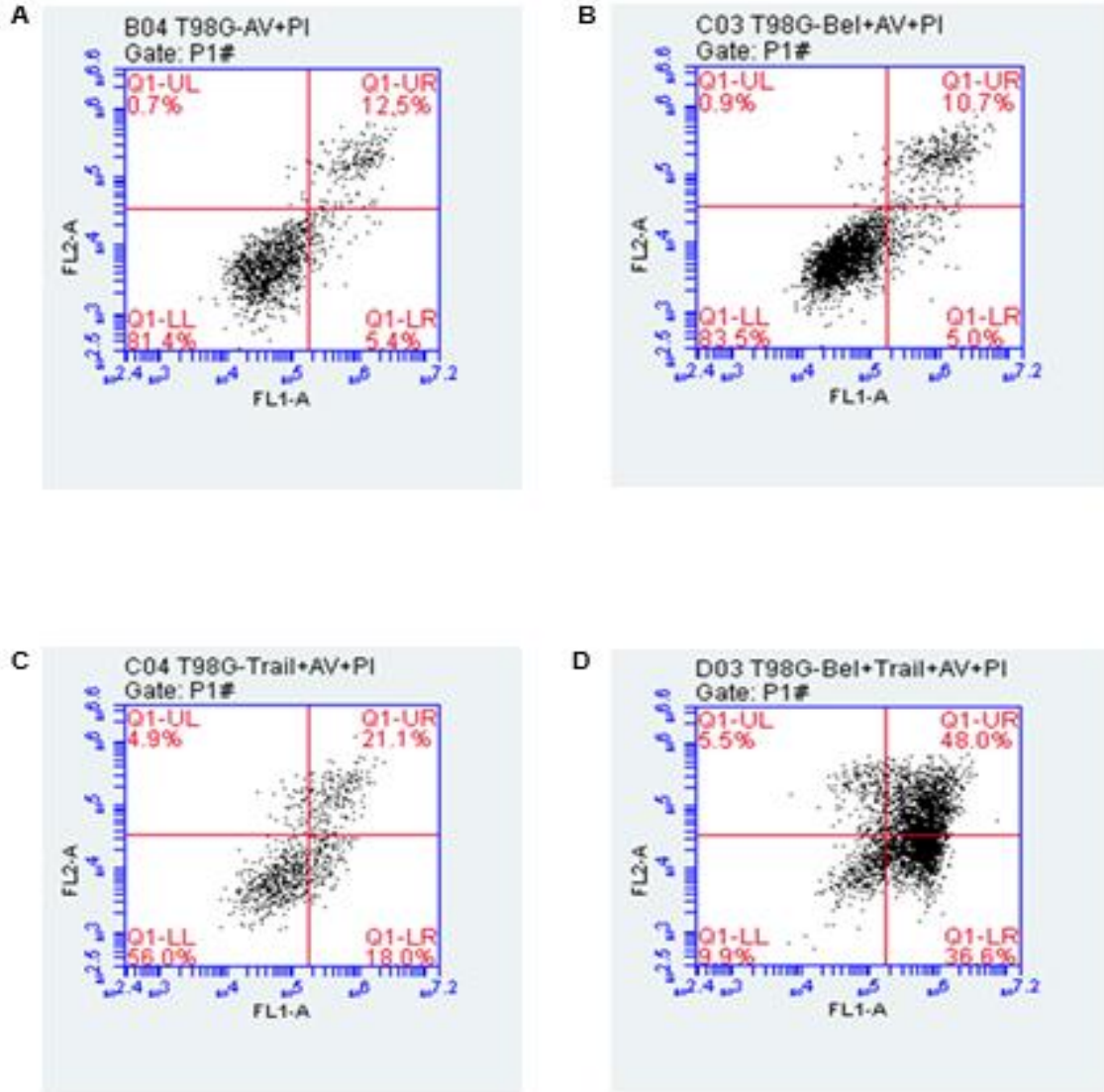
Belinostat ve Romidepsin'in TRAIL ile kombinasyonlarının T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarındaki etkisini doğrulamak amacıyla akım-sitometri deneyleri uygulanmıştır.

Şekil 4.37'da görüldüğü üzere, T98G hücrelerinin kontrol grubunda canlı hücre sayısı %81.6'dır (Şekil 4.37-A). Sadece Belinostat uygulanan grupta apoptotik hücre yüzdesi anlamlı şekilde değişmezken (Şekil 4.37-B), sadece TRAIL uygulanan T98G hücre hattında %39.1 oranında apoptotik hücre bulunmaktadır (Şekil 4.37-C). Belinostat ve TRAIL'in kombine uygulaması sonucu, %84.6 oranında apoptotik hücre meydana gelmiştir. Bu oranın %48'i geç apoptoz iken, %36.6'sı erken apoptozdur (Şekil 4.37-D). Sonuç olarak, Belinostat T98G hücre hatını TRAIL aracılı ölüme duyarlı hale getirerek, apoptozun indüklenmesine neden olmakta ve bu hücre hattı için sinerjistik etki göstermektedir. Elde ettiğimiz akım-sitometri sonucu, daha önce T98G hücrelerinde sitotoksik olarak belirlediğimiz kombine deneme sonucunu desteklemektedir.

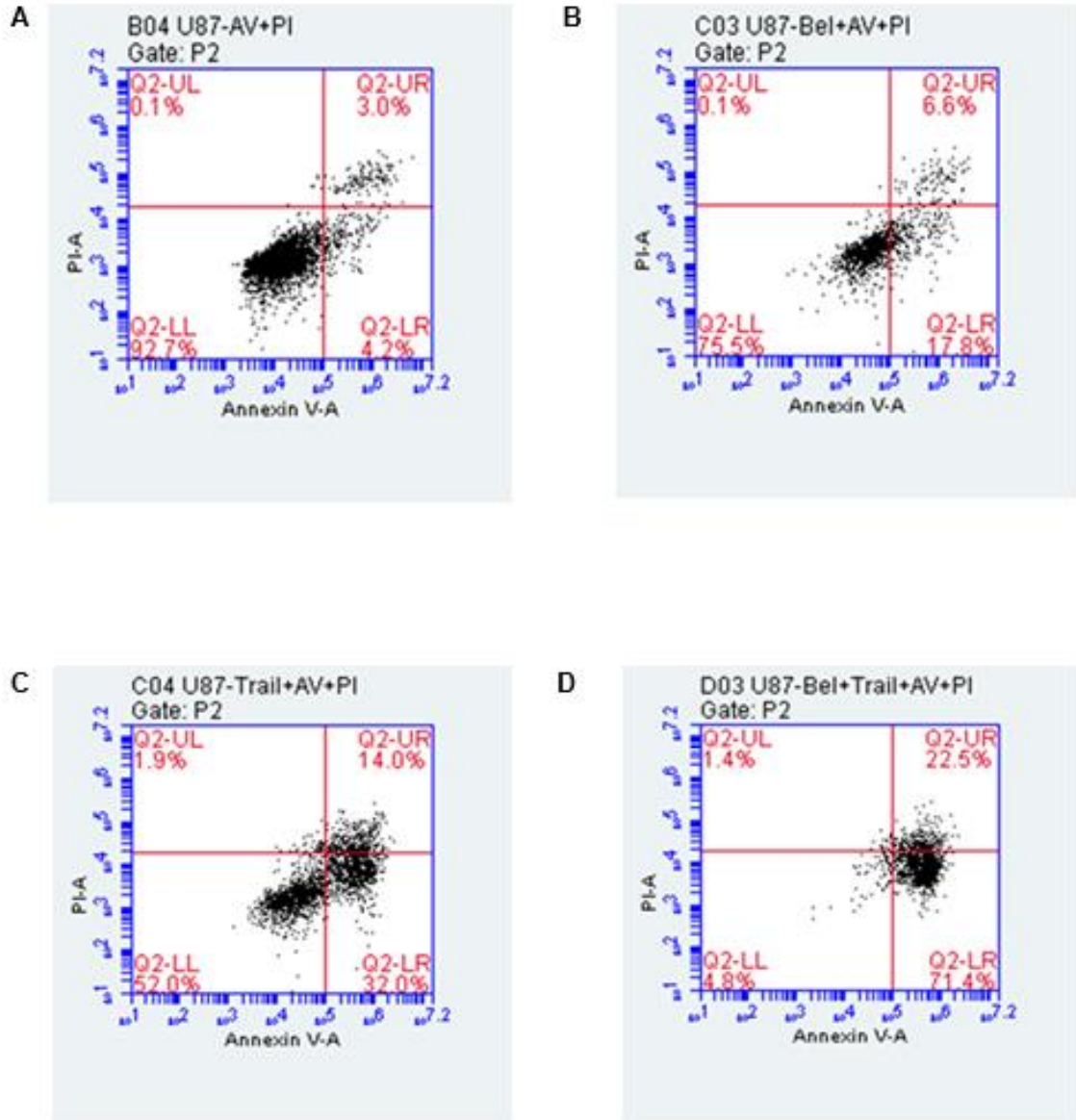
Şekil 4.38'de, U87MG hücrelerinin kontrol grubunda canlı hücre sayısı %92.7'dir (Şekil 4.38-A). Sadece Belinostat uygulanan grupta apoptotik hücre yüzdesi %24.4 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.38-B). Sadece TRAIL uygulanan U87MG hücre hattında %46 oranında apoptotik hücre bulunmaktadır (Şekil 4.38-C). Belinostat ve TRAIL'in kombine uygulaması sonucu, %93.9 oranında apoptotik hücre meydana gelmiştir. Bu oranın %22.5'i geç apoptoz iken, % 71.4'ü erken apoptozdur (Şekil 4.38-D). Sonuç olarak, Belinostat U87MG hücre hattını TRAIL aracılı ölüme duyarlı hale getirerek, apoptozun indüklenmesine neden olmakta ve bu hücre hattı için sinerjistik etki göstermektedir. Elde ettiğimiz akım-sitometri sonucu, daha önce U87MG hücrelerinde sitotoksik olarak belirlediğimiz kombine deneme sonucunu desteklemektedir.

Şekil 4.39'a bakıldığında, U373 hücrelerinin kontrol grubunda canlı hücre sayısı %93.4'dür (Şekil 4.39-A). Sadece Belinostat uygulanan grupta canlı hücre yüzdesi %88.3 iken (Şekil 4.39-B), sadece TRAIL uygulanan U373 hücre hattında canlı hücre yüzdesi % 92.7'dir (Şekil 4.39-C). Belinostat ve TRAIL'in tek olarak uygulanması U373 hücre hatlarında herhangi bir şekilde hücre ölümüne neden olmamıştır. Belinostat ve TRAIL'in kombine uygulaması sonucu %37.8 oranında apoptotik hücre meydana gelmiştir. Bu oranın %6.7'si geç apoptoz iken, % 31.7'si erken apoptozdur (Şekil 4.39-

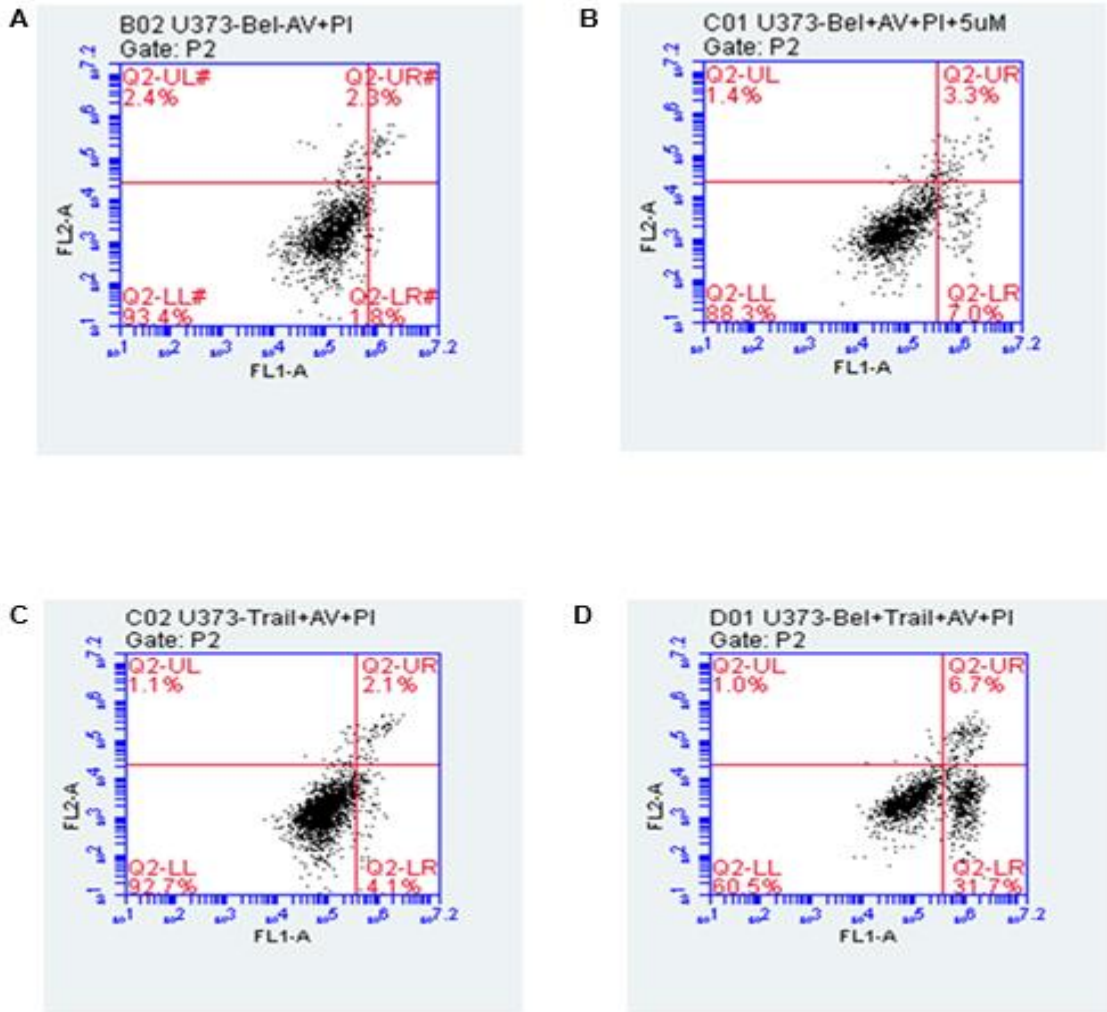
D). Sonuç olarak, Belinostat U373 hücre hatını TRAIL aracılı ölüme duyarlı hale getirerek, apoptozun indüklenmesine neden olmakta ve bu hücre hattı için sinerjistik etki göstermektedir. Elde ettiğimiz akım-sitometri sonucu, daha önce U373 hücrelerinde belirlediğimiz TRAIL ve Belinostat kombine deneme sonucunu desteklemektedir.



**Şekil 4.37** Belinostat ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının T98G hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi. **A.** Kontrol grubu, **B.** Belinostat (1.25  $\mu$ M), **C.** TRAIL (2 ng/ml), **D.** Belinostat (1.25  $\mu$ M) + TRAIL (2 ng/ml)

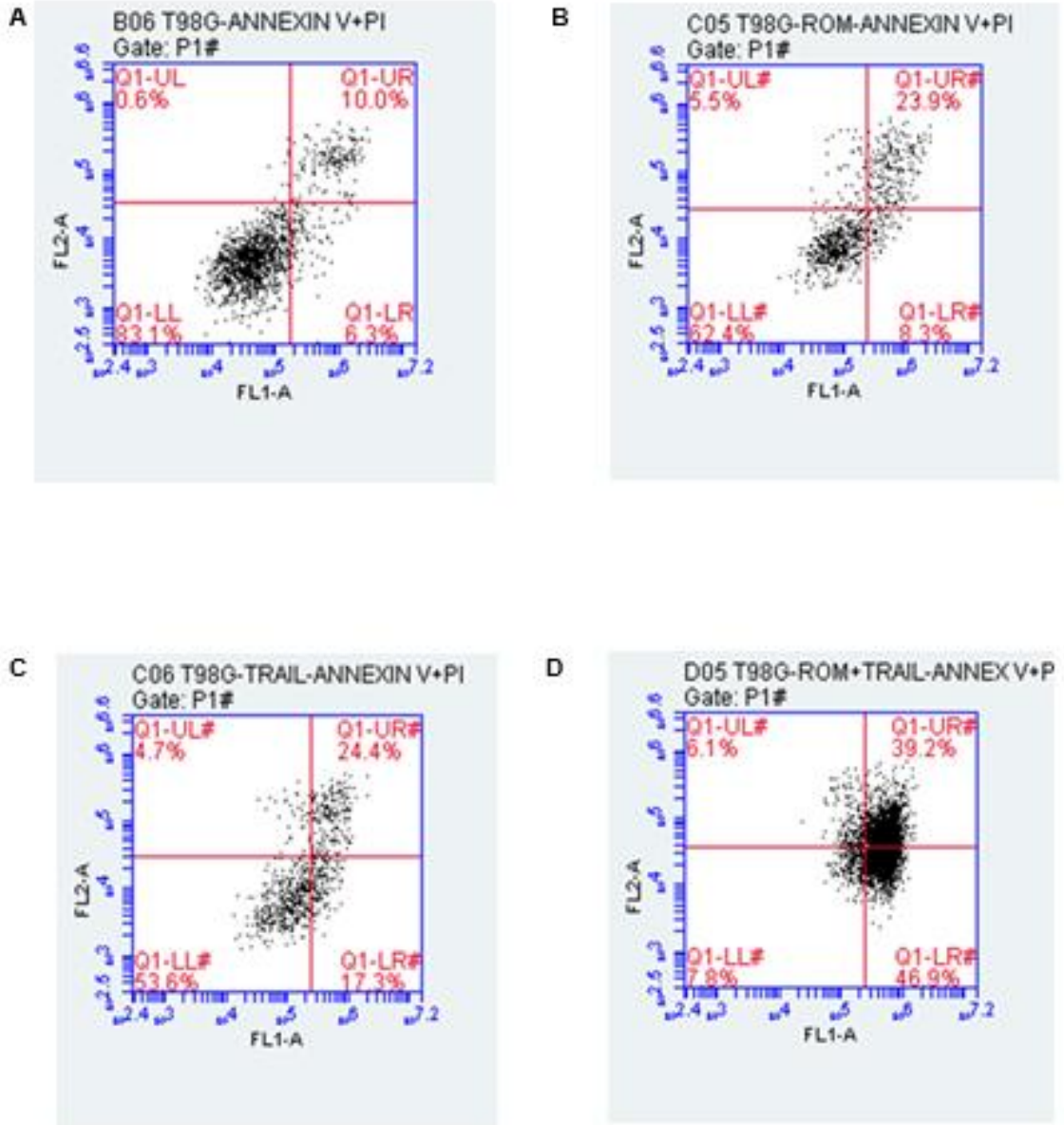


**Şekil 4.38** Belinostat ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının U87MG hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi. **A.** Kontrol grubu, **B.** Belinostat (1.25  $\mu$ M), **C.** TRAIL (25 ng/ml), **D.** Belinostat (1.25  $\mu$ M) + TRAIL (25 ng/ml)



**Şekil 4.39** Belinostat ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının U373 hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi. **A.** Kontrol grubu, **B.** Belinostat (5  $\mu$ M), **C.** TRAIL (50 ng/ml), **D.** Belinostat (5  $\mu$ M) + TRAIL (50 ng/ml)

Şekil 4.40 incelendiğinde, T98G hücrelerinin kontrol grubunda canlı hücre sayısı %83.1'dir (Şekil 4.40-A). Sadece Romidepsin uygulanan grupta, apoptotik hücre yüzdesi %32.2 iken (Şekil 4.40-B), sadece TRAIL uygulanan T98G hücre hattında apoptotik hücre yüzdesi %41.7'dir (Şekil 4.40-C). Romidepsin ve TRAIL'in kombine uygulaması sonucu %86.1 oranında apoptotik hücre meydana gelmiştir. Bu oranın %39.2'si geç apoptoz iken, % 46.9'u erken apoptozdur (Şekil 4.40-D). Sonuç olarak, Romidepsin T98G hücre hattını TRAIL aracılı ölüme duyarlı hale getirerek, apoptozun indüklenmesine neden olmakta ve bu hücre hattı için sinerjistik etki göstermektedir. Elde ettiğimiz akım-sitometri sonucu, daha önce T98G hücrelerinde sitotoksik olarak belirlediğimiz kombine deneme sonucunu desteklemektedir.

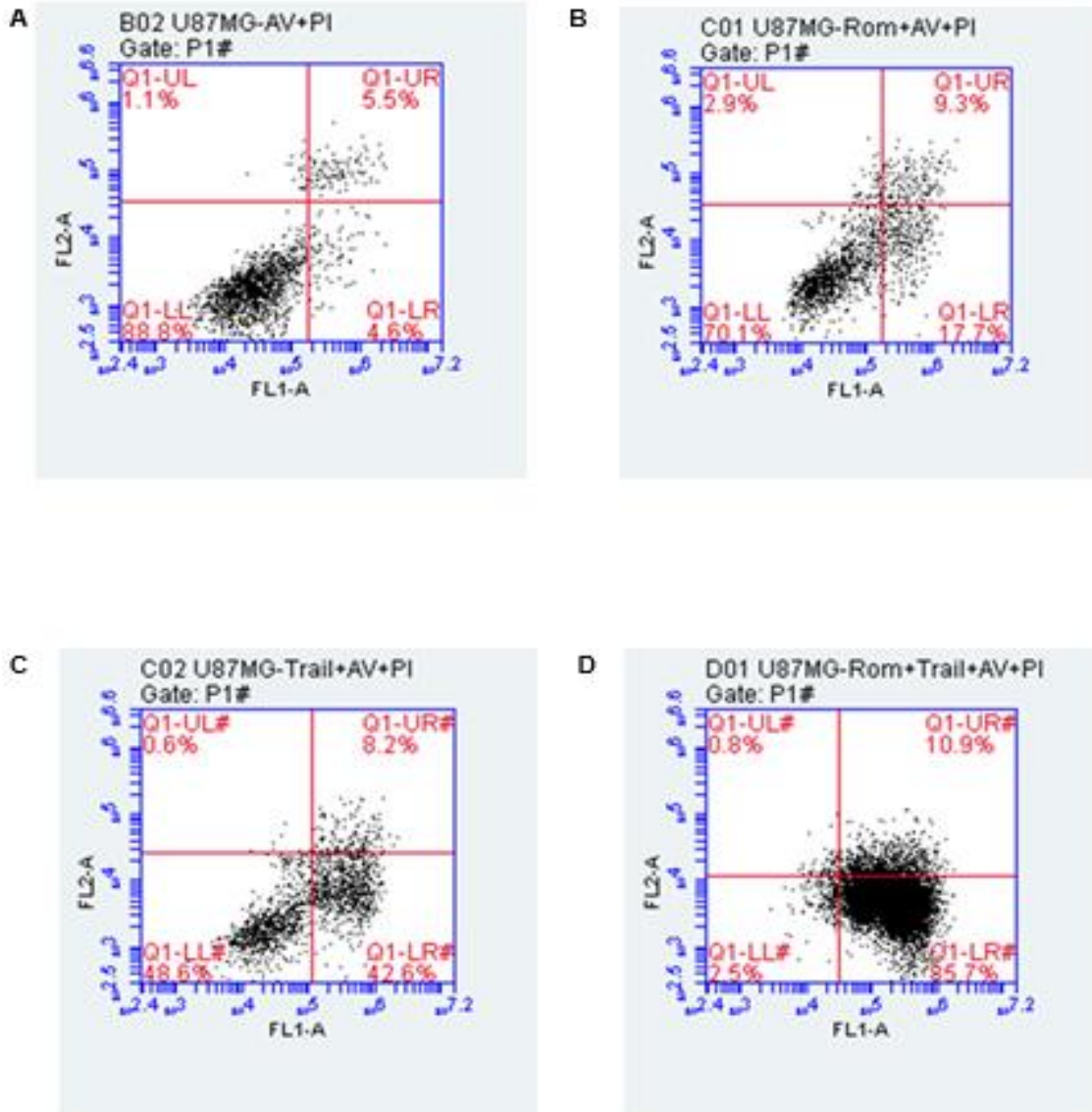


**Şekil 4.40** Romidepsin ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının T98G hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi. **A.** Kontrol grubu, **B.** Romidepsin (0.3125  $\mu$ M), **C.** TRAIL (2 ng/ml), **D.** Romidepsin (0.3125  $\mu$ M) + TRAIL (2 ng/ml)

Şekil 4.41'de, U87MG hücrelerinin kontrol grubundaki canlı hücre sayısı %88.8'dir (Şekil 4.41-A). Sadece Romidepsin uygulanan grupta apoptotik hücre yüzdesi %27 iken (Şekil 4.41-B), sadece TRAIL uygulanan U87MG hücre hattında apoptotik hücre yüzdesi %50.8'dir (Şekil 4.41-C). Romidepsin ve TRAIL'in kombine uygulaması sonucu %96.6 oranında apoptotik hücre meydana gelmiştir. Bu oranın %10.9'u geç apoptoz iken, %85.7'si erken apoptozdur (Şekil 4.41-D). Sonuç olarak, Romidepsin U87MG hücre hattını TRAIL aracılı ölüme duyarlı hale getirerek, apoptozun indüklenmesine neden

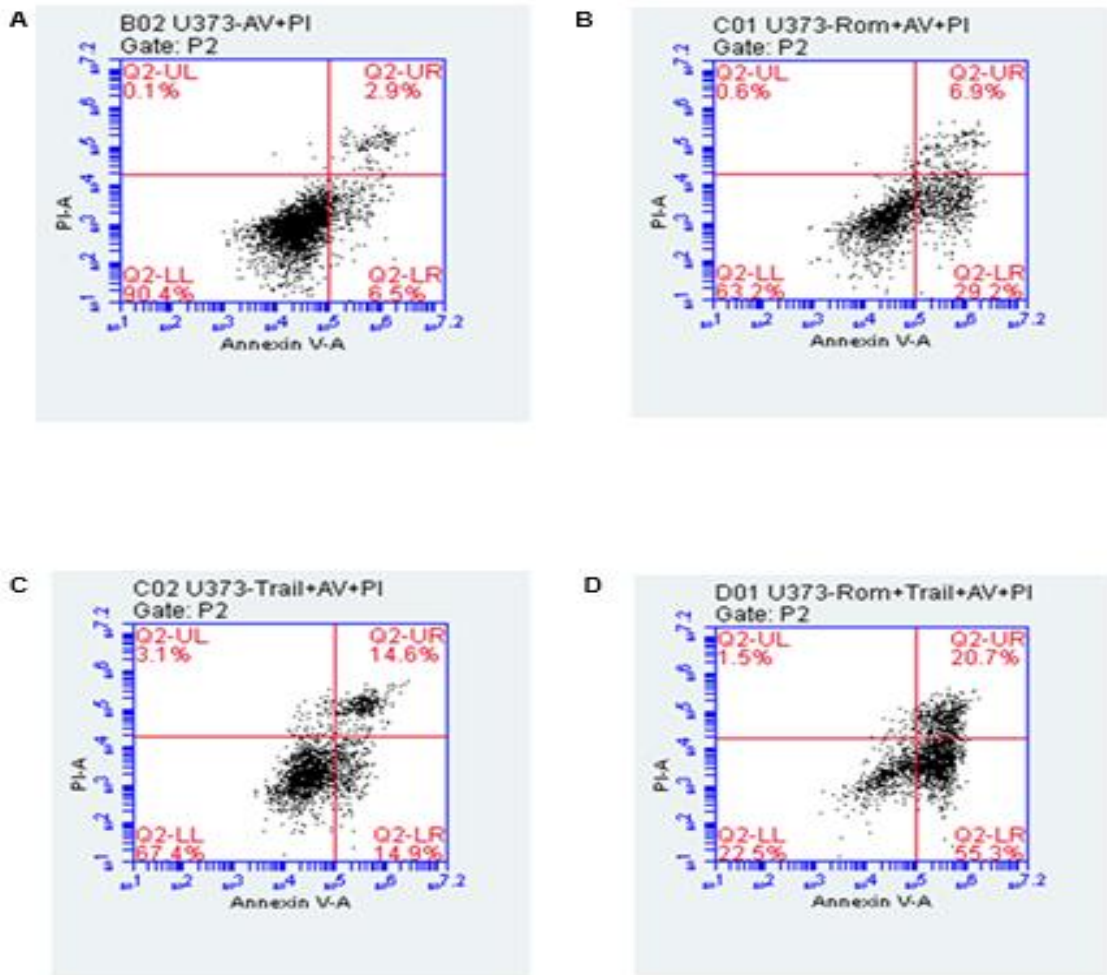


olmakta ve bu hücre hattı için sinerjistik etki göstermektedir. Elde ettiğimiz akım-sitometri sonucu, daha önce U87MG hücrelerinde sitotoksik olarak belirlediğimiz kombine deneme sonucunu desteklemektedir.



**Şekil 4.41** Romidepsin ve TRAIL'in tebli ve kombine dozlarının U87MG hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisi. **A.** Kontrol grubu, **B.** Romidepsin (0.3125  $\mu$ M), **C.** TRAIL (25 ng/ml), **D.** Romidepsin (0.3125  $\mu$ M) + TRAIL (25 ng/ml)

Şekil 4.42'de görüldüğü üzere, U373 hücrelerinin kontrol grubunda canlı hücre sayısı %90.4'dür (Şekil 4.42-A). Sadece Romidepsin uygulanan grupta apoptotik hücre yüzdesi %36.1 iken (Şekil 4.42-B), sadece TRAIL uygulanan U373 hücre hattında apoptotik hücre yüzdesi % 29.5'dir (Şekil 4.42-C). Romidepsin ve TRAIL'in kombine uygulaması sonucu %76 oranında apoptotik hücre meydana gelmiştir. Bu oranın %20.7'si geç apoptoz iken, %55.3'ü erken apoptozdur (Şekil 4.42-D). Sonuç olarak, Romidepsin U373 hücre hattını TRAIL aracılı ölüme duyarlı hale getirerek, apoptozun indüklenmesine neden olmakta ve bu hücre hattı için sinerjistik etki göstermektedir. Elde ettiğimiz akım-sitometri sonucu, daha önce U373 hücrelerinde sitotoksik olarak belirlediğimiz kombine deneme sonucunu desteklemektedir.



**Şekil 4.42** Romidepsin ve TRAIL'in tekli ve kombine dozlarının U373 hücre hattı üzerine apoptoza olan etkisinin akım-sitometri sonuçları. **A.** Kontrol grubu, **B.** Romidepsin (0.3125  $\mu$ M), **C.** TRAIL (50 ng/ml), **D.** Romidepsin (0.3125  $\mu$ M) + TRAIL (50 ng/ml)

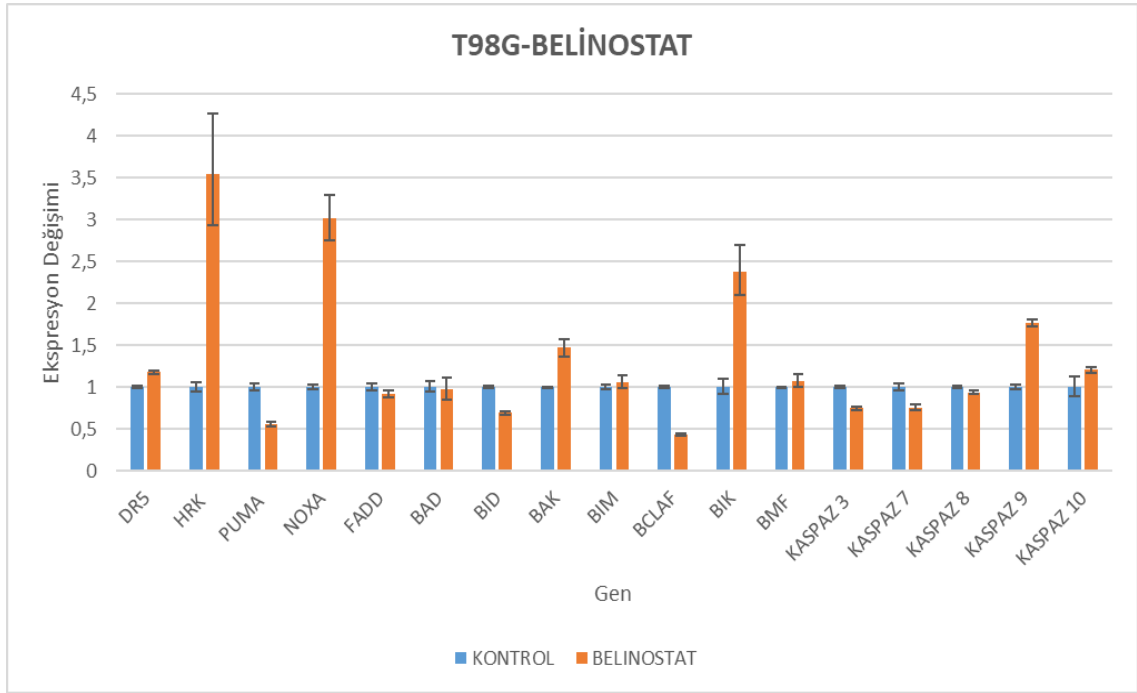
#### 4.7. Gerçek-zamanlı PCR Deneyleri

Belinostat ve Romidepsin'in T98G, U87MG ve U373 hücrelerinde apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonuna olan etkisi kantitatif gerçek-zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. Hem kontrol gruplarından hem de Belinostat ve Romidepsin uygulanmış gruplardan, 24 saat sonunda RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlgili hücre hatlarında Tablo 3.7'de belirtilmiş olan apoptoz ile ilişkili genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonları araştırılmıştır. GAPDH housekeeping geni sonuçların normalizasyonunda kullanılmıştır.

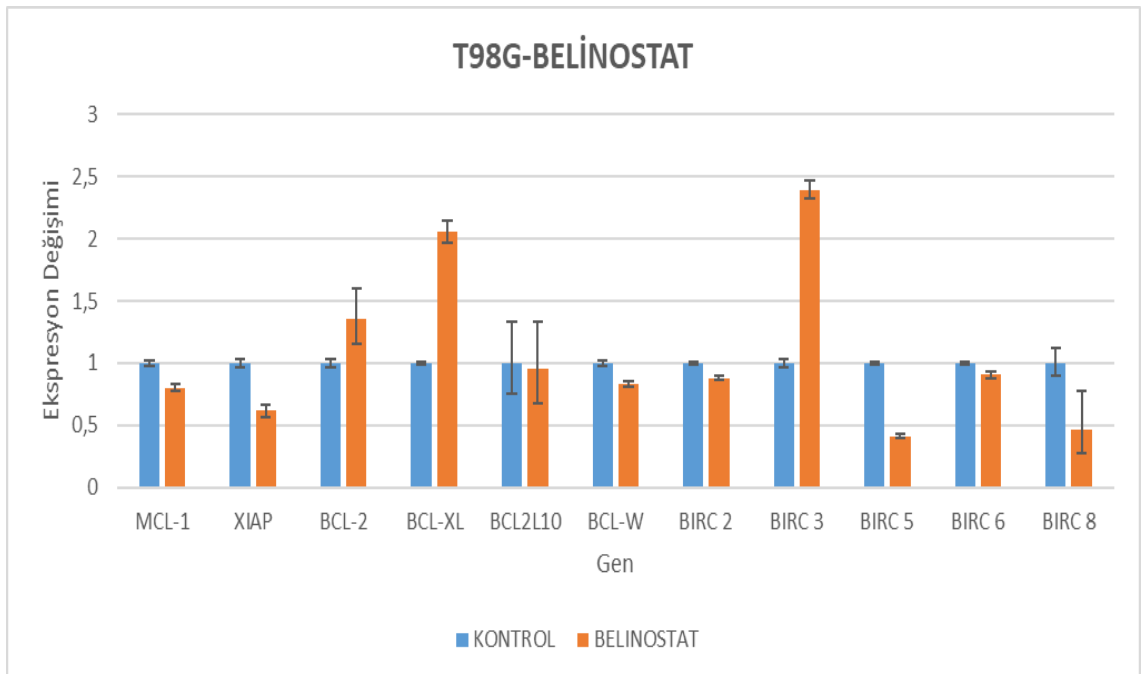
Belinostat'ın T98G hücre hattında pro-apoptotik genler üzerine etkisi incelendiğinde; Belinostat uygulanmış T98G hücrelerinde *Hrk*, *Noxa*, *Bak*, *Bik* ve *kaspaz-9* genlerinin ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. Anti-apoptotik genler açısından bakıldığında; *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-W*, *Birc 5* ve *Birc 8* genlerinde doz grubunda kontrol grubuna göre ekspresyonun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.43 ve 4.44). Bu sonuçlar, T98G hücrelerinde TRAIL-duyarlılığını arttıran Belinostat'ın hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri üzerine etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Belinostat'ın intrinsik yolda görev alan kaspaz-9 ve kaspaz inhibitörü olan cIAP üyesi *Birc*'lere de etkisinin olduğu görülmektedir. Bu nedenle, Belinostat'ın TRAIL ile kombine uygulamasında apoptozu tetiklemesinde yukarıda belirtilen apoptotik ve anti-apoptotik genler üzerinden işlev gördüğünü söyleyebiliriz.

U87MG hücrelerinde Belinostat, T98G hücreleriyle benzer şekilde *HRK*, *Noxa* ve Kaspaz-9 genlerinin ekspresyonunu, aynı zamanda pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi *Bik*, *Bim* ve Bcl-2 modifiye edici faktör *Bmf*'nin ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.45 ve 4.46). Anti-apoptotik genler açısından bakıldığında; *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *Birc 2* ve *Birc 5* genlerinin ekspresyonunu da anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür (Şekil 4.47). Bu sonuç bize, Belinostat'ın U87MG hücrelerinde TRAIL ile apoptozu indüklerken, ekstrinsik yoldan MOMP'un tetiklenmesine ve kaspazların inhibisyonuna neden olacak genlerin aktivasyonuna neden olabileceğini çabıştırabilmektedir.

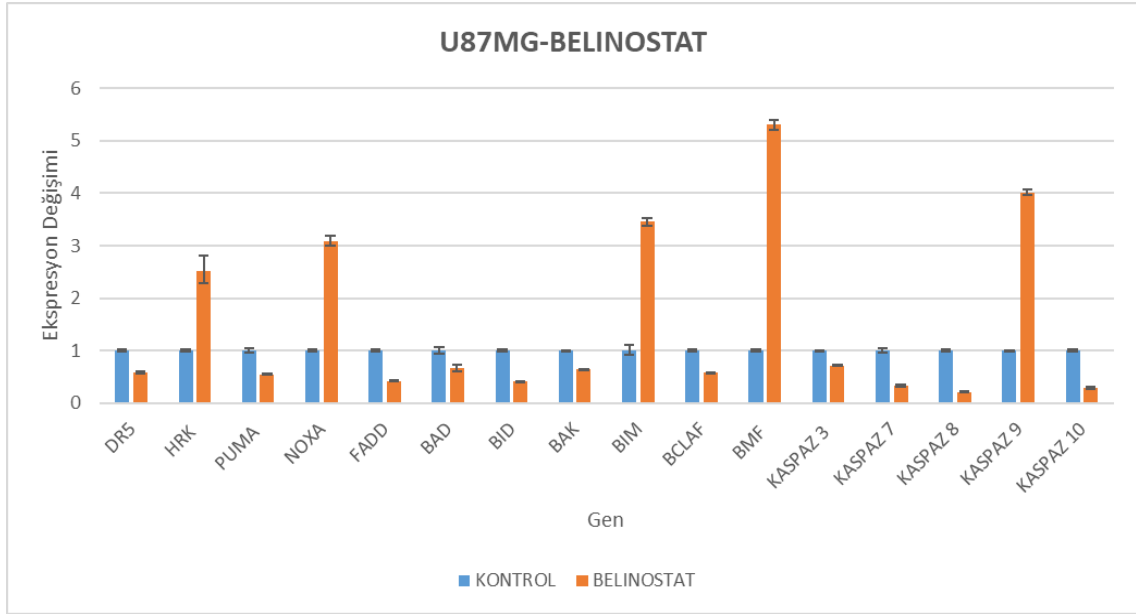




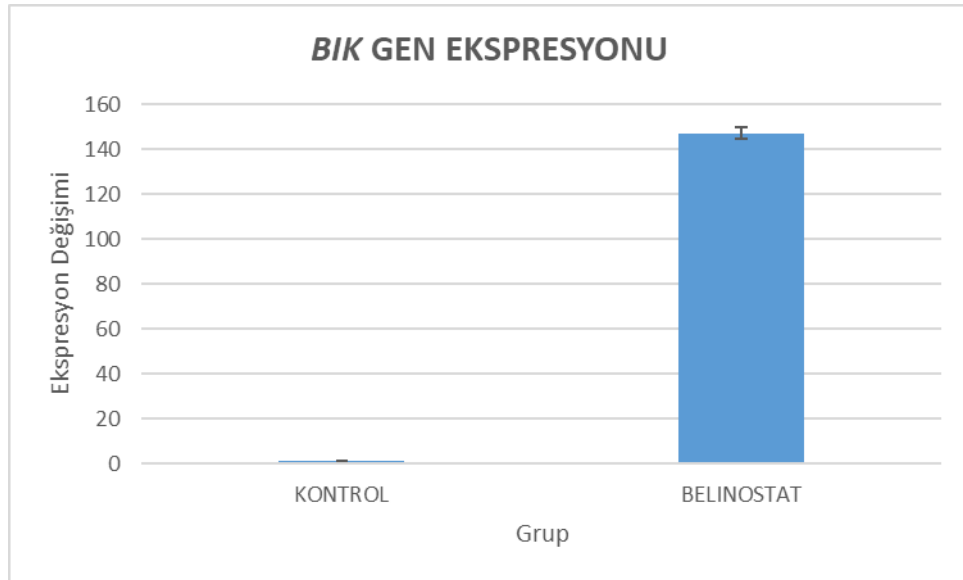
**Şekil 4.43** Belinostat'ın T98G hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi.



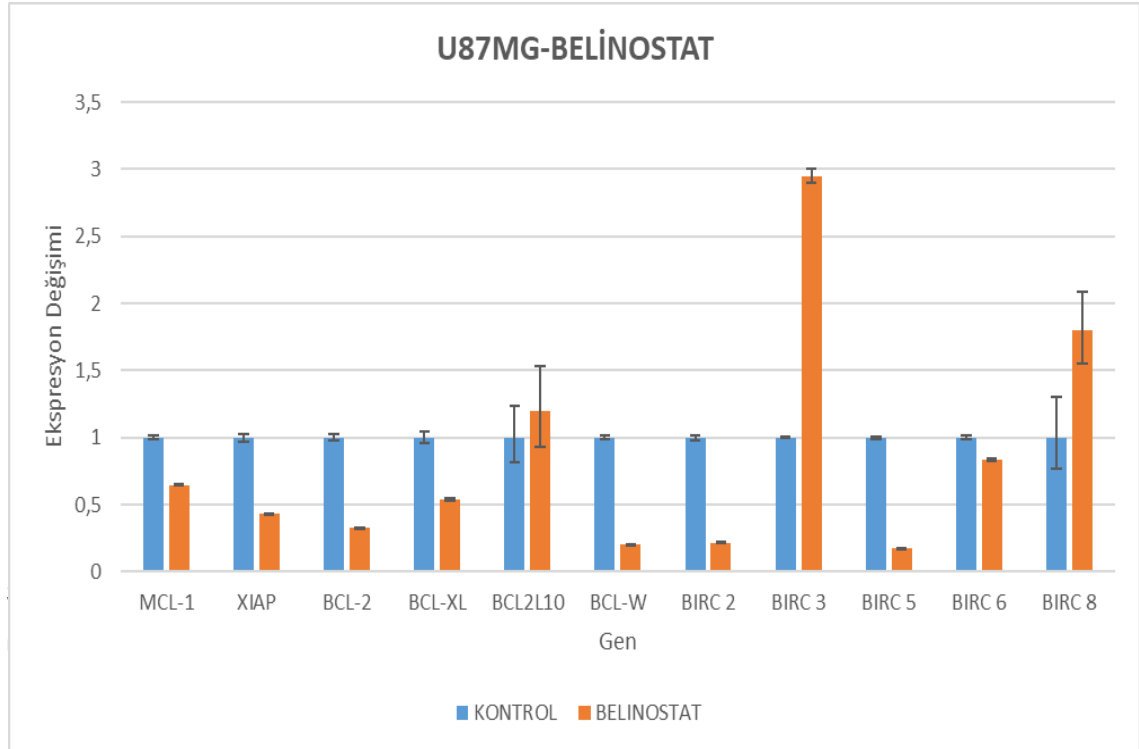
**Şekil 4.44** Belinostat'ın T98G hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi.



**Şekil 4.45** Belinostat'ın U87MG hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi.



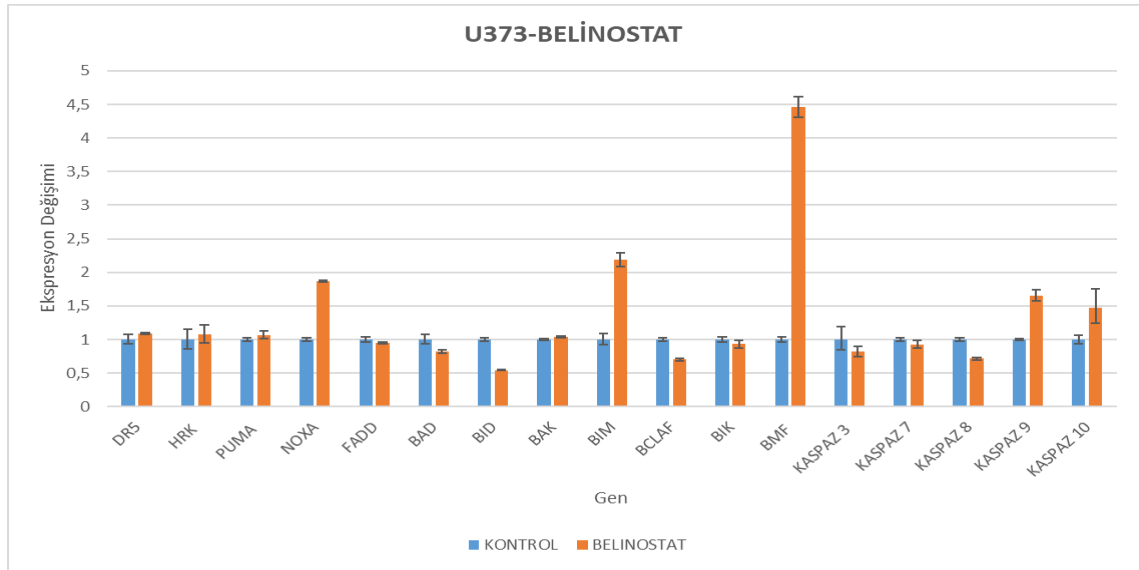
**Şekil 4.46** Belinostat'ın U87MG hücrelerinde Bik gen ekspresyonu üzerine olan etkisi.



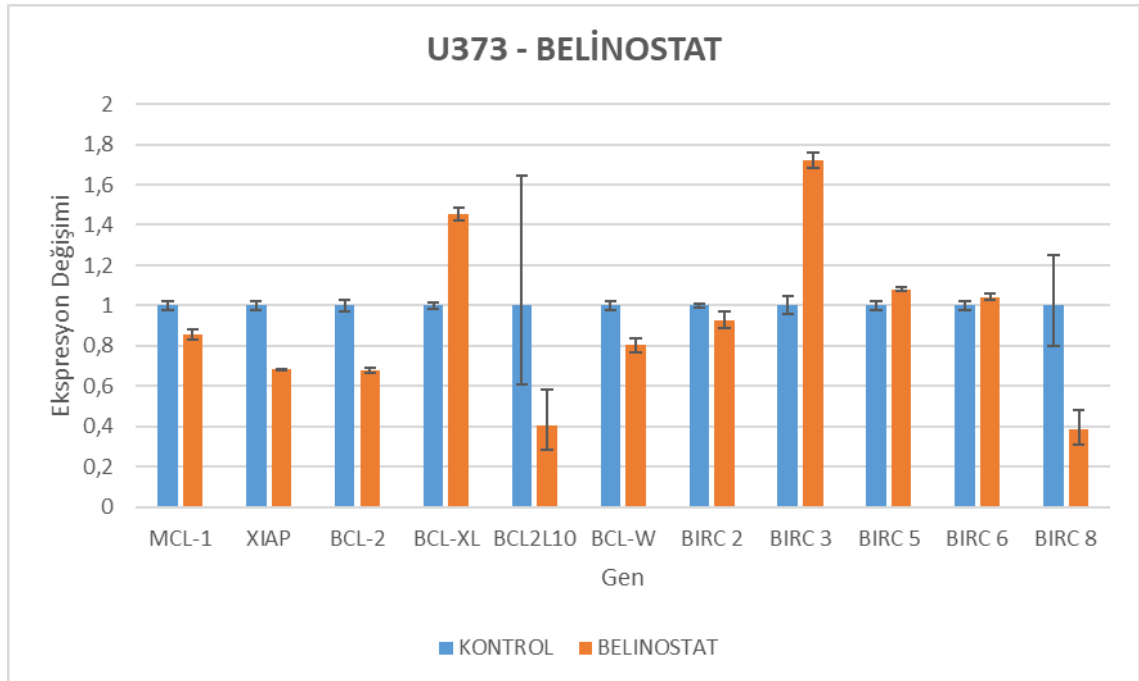
**Şekil 4.47** Belinostat'ın U87MG hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.

TRAIL-dirençli U373 hücre hattında Belinostat'ın pro-apoptotik genlerden *Noxa*, *Bim*, *Bmf*, *kaspaz-9* ve *kaspaz-10*'un ekspresyonlarını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttırmıştır (Şekil 4.48). Anti-apoptotik genlerin ekspresyonuna bakıldığında; Belinostat'ın *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-2*, *BCL2L10*, *Bcl-W*, *Birc 2* ve *Birc 8* ekspresyonlarını kontrol grubuna göre azaltmıştır (Şekil 4.49). Bu sonuçlarla, Belinostat'ın TRAIL-indüklü apoptozu artırırken, pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleriyle birlikte kaspaz-9, -10 ve *Birc* genleri üzerine etki ettiğini düşünebiliriz.

T98G, U87MG ve U373 hücre hatları için tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, Belinostat'ın GBM hücre hatlarını TRAIL'a duyarlı hale getirmede ve TRAIL-aracılı apoptozu arttırmada, pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, *kaspaz-9*, -10 ve *clAP* üyeleri üzerinden rol oynadığını söyleyebiliriz. Bu sonuçlar, Belinostat için hipotezimizde belirtilen; HDACi'lerin apoptotik yolaktaki genler üzerine etki edebileceği düşüncesini doğrulamaktadır.

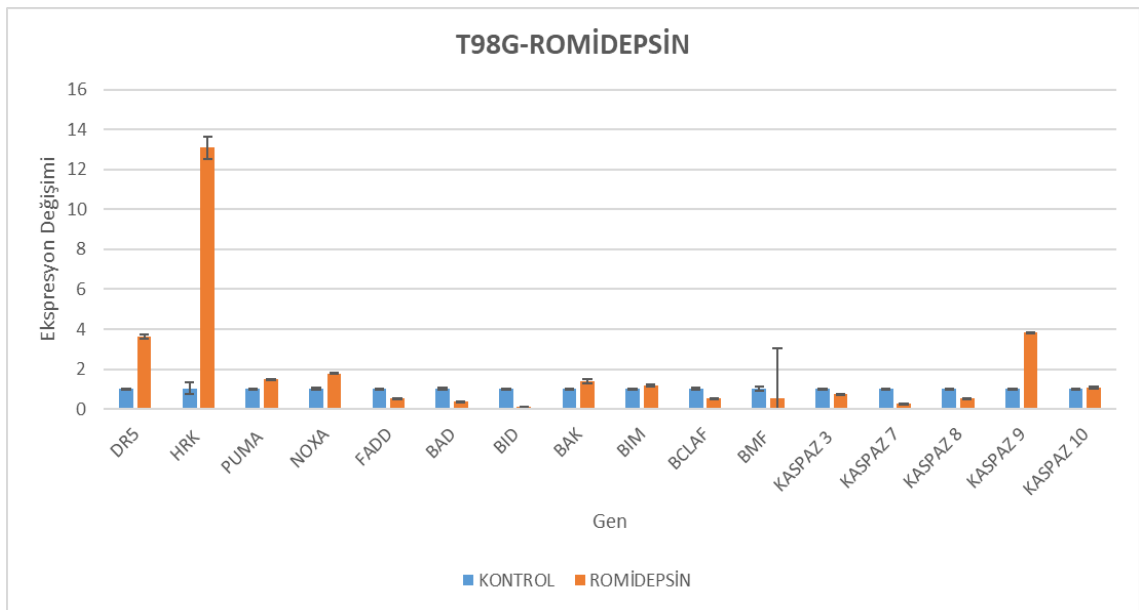


**Şekil 4.48** Belinostat'ın U373 hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi.

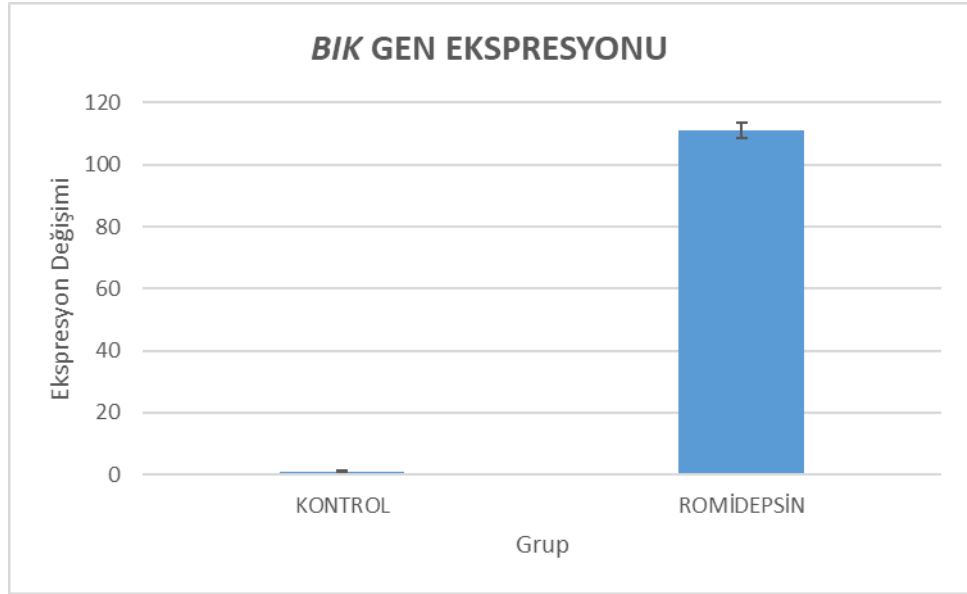


**Şekil 4.49** Belinostat'ın U87MG hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.

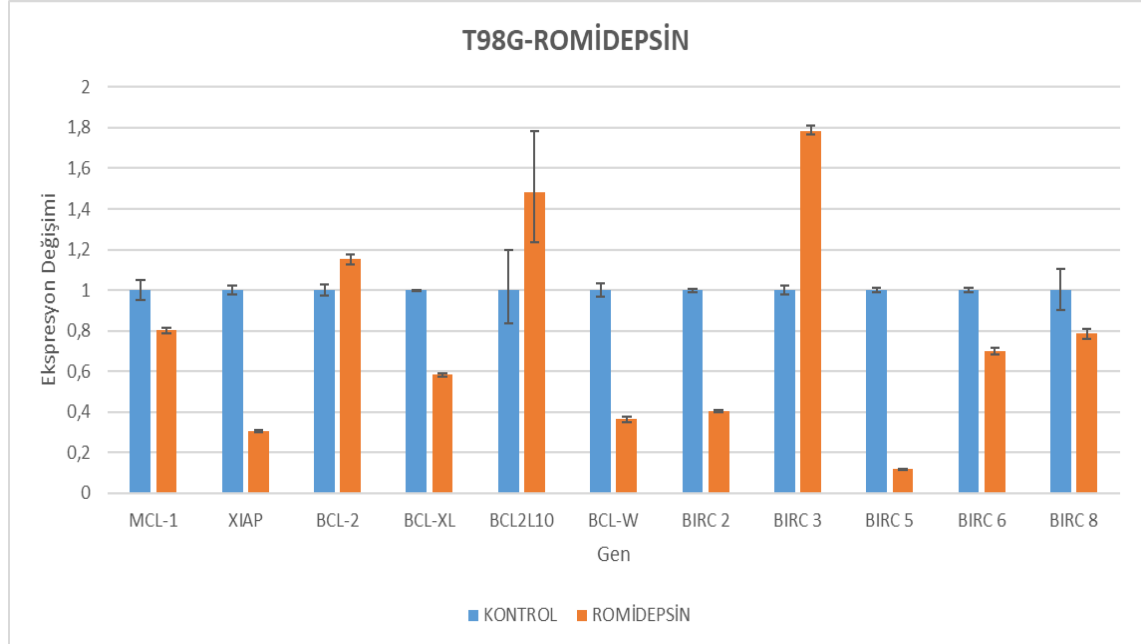
Romidepsin'in T98G hücre hatlarındaki gen ekspresyon değişimlerine bakıldığında, kontrol grubuna göre *DR5*, *HRK*, *Puma*, *Noxa* ve *kaspaz-9*'un ekspresyonlarını anlamlı şekilde arttırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte en belirgin artışın kontrole göre, 111 kat ile *Bik* ve 12 kat ile *HRK*'da meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.50 ve 4.51). Anti-apoptotik genlere bakıldığında, *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *Birc 2*, *Birc 5*, *Birc 6* ve *Birc 8*'de kontrol grubuna göre ekspresyonun anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.52). Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, Romidepsin'in ölüm reseptör ekspresyonunu artırarak ve hem ekstrinsik hem de intrinsik yolda rol oynayan Bcl-2 ailesi üyeleri üzerine etki ederek T98G hücrelerinde TRAIL-aracılı ölüme yardım ettiği sonucu çıkarılabilir.



**Şekil 4.50** Romidepsin'in T98G hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi.

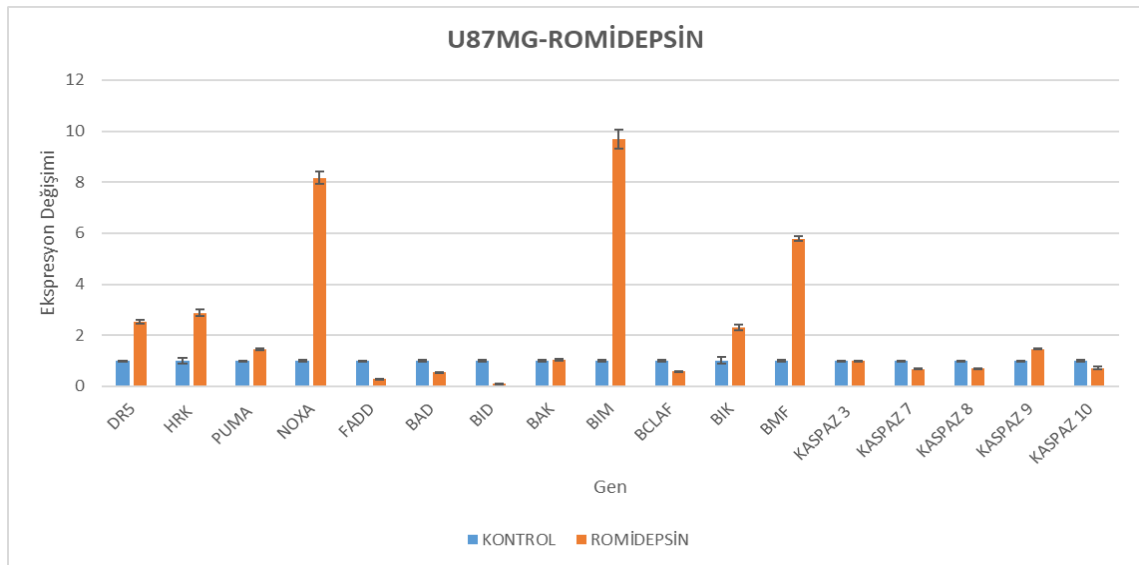


**Şekil 4.51** Romidepsin'in T98G hücrelerinde *Bik* gen ekspresyonu üzerine olan etkisi.

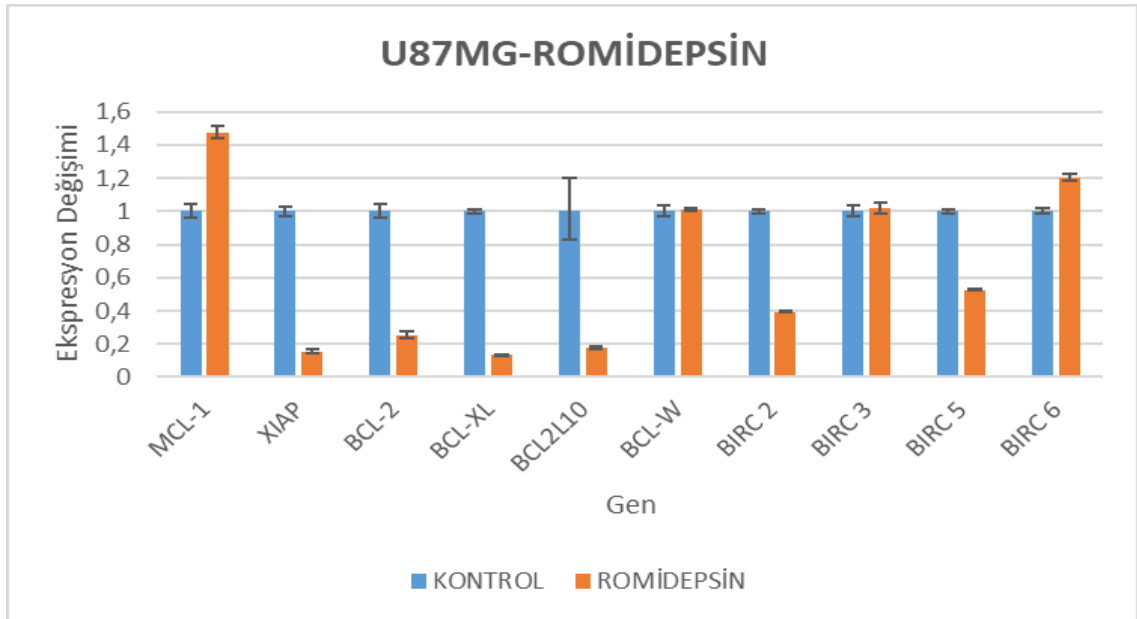


**Şekil 4.52** Romidepsin'in T98G hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.

Romidepsin'in U87MG hücrelerinde 24 saatlik uygulaması sonucu, pro-apoptotik genlerden *DR5*, *HRK*, *Puma*, *Noxa*, *Bim*, *Bik*, *Bmf* ve *kaspaz-9*'un ekspresyonlarını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttırmıştır (Şekil 4.53). U87MG hücrelerinde Romidepsin uygulaması sonucu anti-apoptotik genlerin ekspresyon durumuna bakıldığında; *XIAP*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *BCL2L10*, *Birc 2* ve *Birc 5* genlerinin ekspresyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.54). Bu genlerdeki ekspresyon değişimlerine bakarak, Romidepsin'in U87MG hücrelerinin TRAIL'e duyarlılığını ölüm reseptör DR5 'in ekspresyonunu arttırarak, özellikle pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri üzerinden gerçekleştirdiğini, aynı zamanda MOMP üzerinde de *Bcl-2* ve *Bcl-XL* genlerinin ekspresyonunu azaltarak görev aldığını söyleyebiliriz.



**Şekil 4.53** Romidepsin'in U87MG hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi.

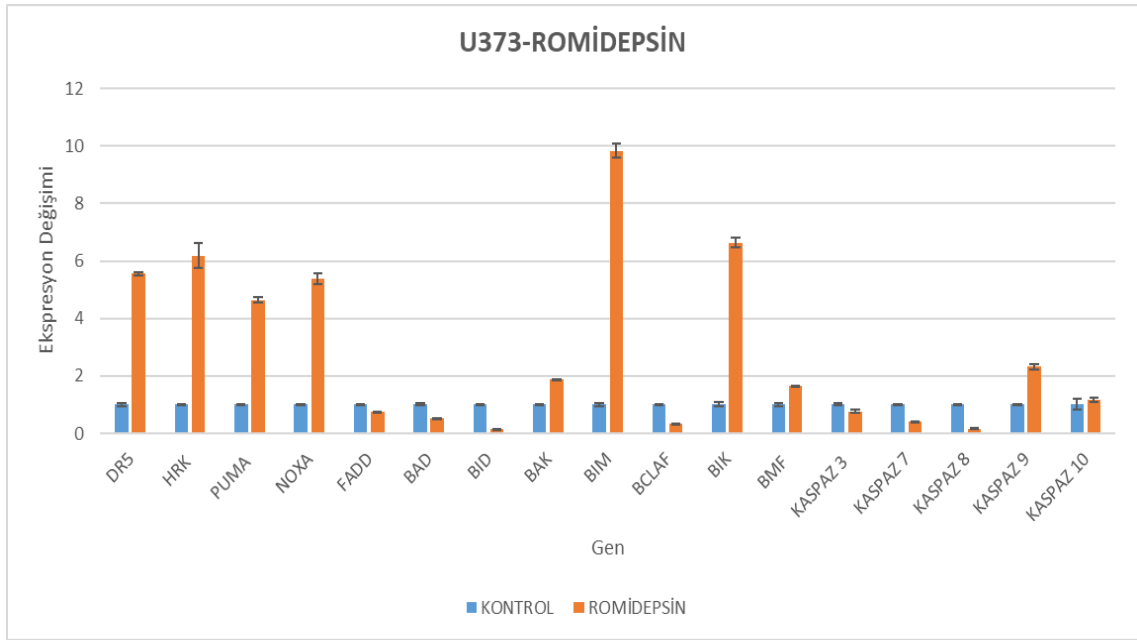


**Şekil 4.54** Romidepsin'in U87MG hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.

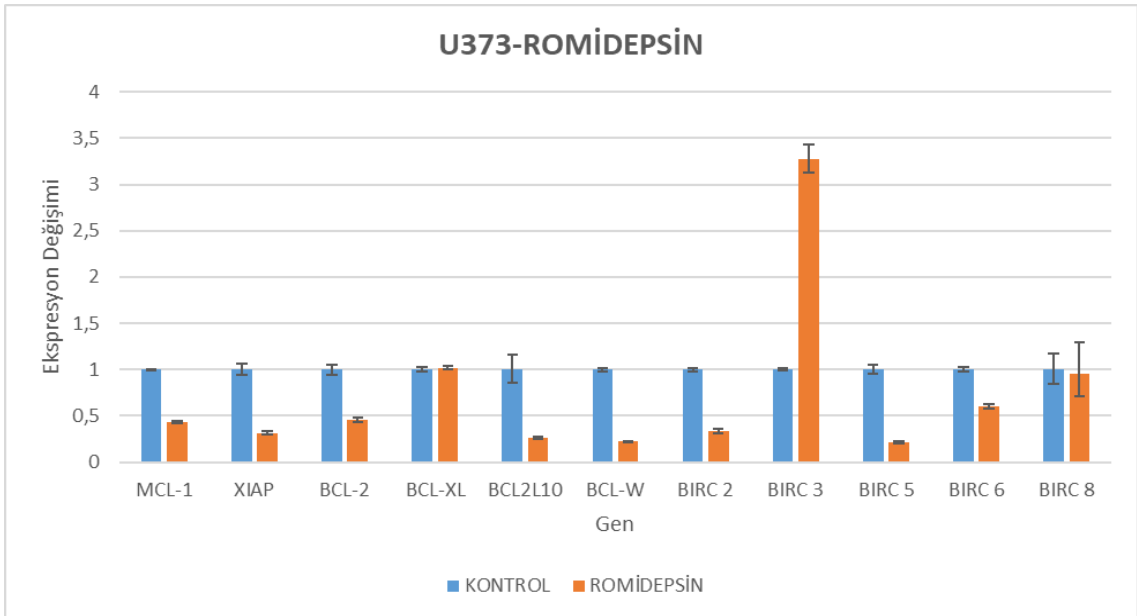
TRAIL-duyarlı U373 hücrelerindeki duruma baktığımızda, Romidepsin'in *DR5*, *HRK*, *Puma*, *Noxa*, *Bak*, *Bim*, *Bik*, *Bmf* ve *kaspaz-9* genlerinin ekspresyonlarını kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde arttırmıştır (Şekil 4.55). Anti-apoptotik genler açısından incelendiğinde ise, kontrol grubuna göre *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-2*, *BCL2L10*, *Bcl-W*, *Birc 2*, *Birc 5* ve *Birc 6* gen ekspresyonlarının Romidepsin uygulanan grupta anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.56). Bu sonuçlar ışığında, Romidepsin'in U373 hücrelerinin TRAIL'e olan direncini kırmada ölüm reseptörü *DR5*, *kaspaz-9* ve pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyonlarını arttırarak, aynı zamanda anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını azaltarak görev aldığı söylenebilir.

Üç GBM hücre hattı için tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, Romidepsin'in GBM hücre hatlarını TRAIL'a duyarlı hale getirmede ve TRAIL-aracılı apoptozu arttırmada, pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, *kaspaz-9* ve *cIAP* üyeleri üzerinden rol oynadığını söyleyebiliriz. Bu sonuçlar, Romidepsin için; hipotezimizde belirtilen; HDAC'ilerin apoptotik yolaktaki genler üzerine etki edebileceği düşüncesini doğrulamaktadır.





**Şekil 4.55** Romidepsin'in U373 hücrelerinde pro-apoptotik genlerin ekspresyonu üzerine etkisi.



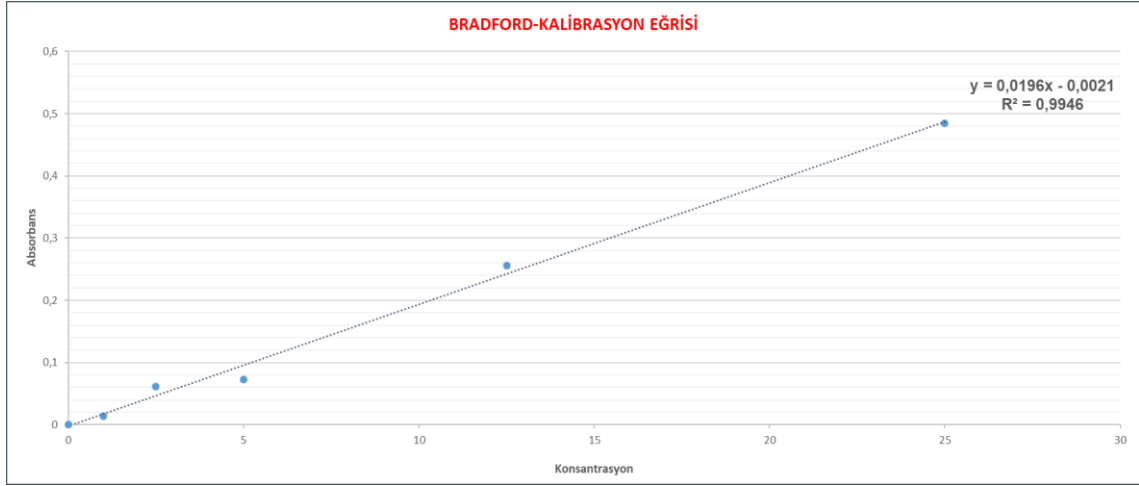
**Şekil 4.56** Romidepsin'in U373 hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerine etkisi.

#### 4.8. Western Blot Deneyleri

Çalışmamızda Belinostat ve Romidepsin'in T98G, U87MG ve U373 GBM hücre hatlarında apoptoz ile ilişkili proteinlerin ekspresyonuna olan etkisi western blot yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Belinostat ve Romidepsin'in belirlenen dozlarda üç hücre hattına 24 saat boyunca uygulanmasının ardından, kontrol ve doz gruplarından RIPA tamponu ile protein lizatı elde edilmiş ve Bradford yöntemiyle her bir gruptaki protein konsantrasyonu hesaplanmıştır (Şekil 4.57) (Tablo 4.6). Western blot çalışması için her bir gruptaki örnekten 75 µg protein hesabı yapılmış ve SDS-PAGE'de yürütülmüştür.

Projemizin bütçesi western blot çalışmalarının sadece sarf malzeme kısmına yettiğinden, primer ve sekonder antikor temin edecek bütçemiz olmamıştır. Bu nedenle, qRT-PCR deney sonucu, ekspresyon değişimi anlamlı bulunan genlerin protein düzeyindeki ekspresyonlarına bakılamamıştır. Çalışmamızın bu ayağında, Doç. Dr. Tuğba BAĞCI-ÖNDER ve Doç. Dr. Yavuz DODURGA tarafından sağlanan, apoptoz ile ilişkili Bcl-2, Bax, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 ve GAPDH proteinlerinin ekspresyon düzeylerine bakılabilmektedir. Bu proteinlere ait primer antikorlardan Bcl-2 ve Bax fare kökenli ve monoklonal özellikte, kaspaz-3, -8 ve -9 için kullanılan primer antikorlar tavşan kökenli olup poliklonal karakterdedir.

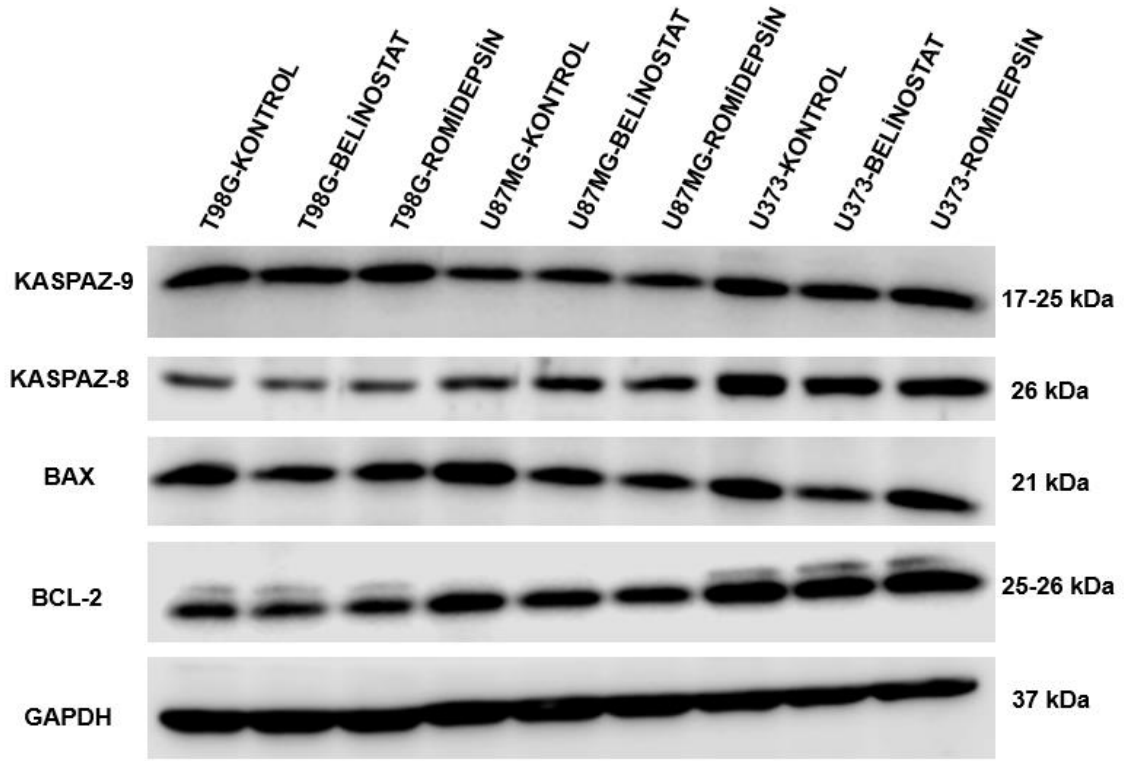
Western blot sonuçlarını incelediğimizde, her iki HDACi'nin de T98G, U87MG ve U373 hücre hattında yukarıda belirtilen proteinlerin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.58). Kaspaz-3 antikorunun deneyimizde çalışmamasından dolayı, sonuç verilememiştir. Sonucumuzun anlamlı çıkmama nedenini, Belinostat ve Romidepsin'in hücreler üzerine uyguladığımız dozlarının ve sürelerinin yeterli gelmemiş olma olasılığına bağlayabiliriz. Diğer bir faktör de, kullandığımız HDACi'lerin GBM hücrelerinde sadece mRNA ekspresyon düzeyine etki etmesi, mRNA'dan proteine giden yolda meydana gelen farklı bir epigenetik mekanizma sonucu protein ekspresyonuna etki etmemesi olabilir.



**Şekil 4.57** Bradford yöntemi sonucu standartlara yönelik çizilen kalibrasyon eğrisi grafiği.

**Tablo 4.6** Bradford yöntemi sonucu üç hücre hattında kontrol, Belinostat ve Romidepsin gruplarına ait protein konsantrasyonları.

GRUP	PROTEİN KONSANTRASYONU (µg/ml)
T98G-KONTROL	6,087099725
T98G-BELİNOSTAT	4,707639646
T98G-ROMİDEPSİN	5,286672272
U87MG-KONTROL	4,060485535
U87MG-BELİNOSTAT	4,179698134
U87MG-ROMİDEPSİN	4,298910734
U373-KONTROL	4,963095216
U373-BELİNOSTAT	4,877943359
U373-ROMİDEPSİN	4,622487789



**Şekil 4.58** Belinostat ve Romidepsin'in T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarında kaspaz-9, kaspaz-8, Bax, Bcl-2 proteinlerin ekspresyonuna olan etkisi.

## 5. TARTIŞMA

Kanser, mutasyonlarla birlikte onkogenlerin sürekli aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonel inaktivasyonu ile sonuçlanan genetik bir hastalıktır. Tümörögenез süreci, tümör hücrelerinin apoptozdan kaçtığı, kendilerine yetecek büyüme sinyallerini elde ettiği, sürekli bölünme potansiyeli kazandıkları, anjiyogenezi sürdürdükleri ve normal dokulara invazyon ve metastaz yeteneği kazandıkları çok basamaklı bir süreçtir (Hanahan ve Weinberg 2000). Genetik bilimi alanındaki güncel bulgular, epigenetik regülasyonun, kanser hücreleri için yeni terapötik hedeflerin aydınlatılmasının yanı sıra, kanserin patogenezi ve moleküler sınıflandırılmasına olanak sağladığını ortaya çıkarmaktadır (Zhang vd 2017). Kanser ya da herhangi bir metabolik hastalık, bir veya daha fazla epigenetik mekanizmaya karışma eğilimine girerek, fenotipinde adaptif değişiklikleri tetiklemek suretiyle hücrel çevresini değiştirir. DNA ve histonlardaki epigenetik modifikasyonlarda değişiklikler ve de miRNA ekspresyonundaki değişiklikler, bir hastalığın sonucu olarak meydana gelebileceği gibi bir hastalığın nedeni de olabilmektedirler (Zhang vd 2017).

Glioblastoma multiforme (GBM) son derece agresif, yüksek oranda invaziv ve damarlanmış beyin tümörüdür. Kemoterapi, radyoterapi ve kemoterapiyi içeren tedavi uygulamalarına rağmen, hastalığın prognozu maalesef ki çok zayıftır ve hastaların %5'inden daha azı, teşhisin ardından 5 yıl kadar yaşayabilmektedir. Hastalığın ortalama sağkalım süresi ise yaklaşık 15 ay kadardır. Standart tedavi yöntemi olarak, tümörün maksimum düzeyde güvenli biçimde cerrahi olarak çıkarıldıktan sonra, kemoterapi ve radyoterapinin birlikte uygulanmasıdır (Rasmussen vd 2016, Lee vd 2017). Genetik, epigenetik, bakteriyel enfeksiyon ve diğer birçok faktör GBM onkogenizini etkilemektedir, fakat gliomagenезin altında yatan moleküler mekanizmalar yeterince anlaşılammıştır. Konvansiyonel kemoterapi GBM'de belirli bir yere kadar etkili olmaktadır, bunun nedeni

kan-beyin bariyeri penetrasyonu, tümör içi heterojenite, GBM'in intrinsik direnci ve non-spesifik toksisite olarak sıralanabilir (Ellis vd 2015). Birçok klinik deneme yeni tedavi yaklaşımlarının etkinliğini test etmektedir, fakat son birkaç on yılda GBM hastalarının sağkalımındaki artış sınırlı seviyededir (Rasmussen vd 2016). Bundan dolayı, günümüzde GBM tedavisi için yeni terapötik hedeflerin keşfedilmesi ve daha etkili kombine uygulama stratejilerinin geliştirilmesi acilen gerekmektedir.

Epigenetik değişiklikler, mutasyonlar gibi DNA'da herhangi bir değişikliğe neden olmaksızın, gen ekspresyonunun kromatin yapıdaki post-translasyonel modifikasyonlar yoluyla regülasyonu olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik değişiklikler farklı fizyolojik ve patolojik hücresel süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Epigenetikte en sık meydana gelen değişikliklerden birisi histonların asetilasyonudur. Asetilasyon, kromatin yapının ve gen ekspresyon değişimlerinde anahtar rol oynayan regülatör bir mekanizmadır (Zhang ve Zhong 2014). Asetilasyon, HAT ve HDAC gibi iki geniş enzim ailesi tarafından kontrol edilmektedir. Histon kuyruklarının N-terminalinin HAT'lar tarafından hiperasetilasyonu, kromatinin açılmasına neden olarak gen aktivasyonu ile ilişkili iken, bu kuyrukların HDAC'lar tarafından deasetilasyonu kapalı kromatin yapısı ve transkripsiyonel baskılanma ile ilişkilidir (Bezecny 2014). Bu iki antagonistik mekanizma arasındaki denge birçok gelişimsel süreci yönetmekte ve aralarındaki dengenin bozulması, kanser gibi hastalıkların ortaya çıkışına neden olabilmektedir. Kolorektal, meme, prostat, gastrik ve ovaryum kanserlerinde HAT proteinlerinin mutasyonları sıklıkla tanımlanmıştır. Bu nedenle, HDAC'lerin inhibisyonu yeni kanser terapilerinin geliştirilmesi için akılcı bir hedeftir (Laksmaiah vd 2014).

HDAC'lar fonksiyonlarına ve maya proteinleriyle olan homolog durumlarına göre "Sınıf I (HDAC 1, 2, 3 ve 8)", "Sınıf IIa (HDAC 4, 5, 7, 9) sınıf IIb (HDAC 6, 10)", "Sınıf III (Sirt 1-7)" ve "Sınıf IV (HDAC 11)" olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadırlar (Eckshlager vd 2017). Sınıf I, II ve IV HDAC'ler  $Zn^{2+}$ -bağımlı enzimlerdir ve klasik HDAC'lar olarak adlandırılmaktadır. Sınıf IV HDAC'lar ise NAD-bağımlı enzimlerdir (Lee vd 2017). Histonlar, HDAC'ların en çok çalışılmış substratları olmalarına rağmen, yapılan çalışmalar HDAC'ların histon-olmayan proteinleri de deasetile edebileceğini önermektedir. Bu nedenle, HDAC'ların substratları olarak histon-olmayan proteinler de araştırma konusudur. Örneğin; HDAC1 ve sınıf III HDAC Sirt1, histon-olmayan protein olarak tümör baskılayıcı gen p53'ü deasetilleyerek, p53-indüklü transkripsiyonun inhibisyonuna neden olmaktadır. HDAC'ların hedefi olan histon-olmayan proteinlerin, doğrudan ya da dolaylı

olarak gen ekspresyonuna, hücre proliferasyonunun regülasyonuna, farklılaşmaya, migrasyon ve hücre ölümü gibi önemli hücresel olaylara katıldığı bildirilmiştir (Zhang ve Zhong 2014).

HDAC'ların çeşitli solid ve hematolojik malignansilerde overeksprese ya da mutasyona uğramış durumdadır (Lee vd 2017). HDAC'ların birbirinden ayrı olarak ekspresyonları, sağkalım oranları ile ters ilişkide olduğu belirtilmiştir. HDAC'ların anormal ekspresyonu zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir (West ve Johnstone 214). GBM'de HDAC'ların ekspresyon paternleri ve fonksiyonları iyi karakterize edilmemiştir. Güncel çalışmalarda, GBM'deki HDAC'ların ekspresyon profilleri üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. GBM dokularının, neoplastik-olmayan beyin dokularıyla karşılaştırıldığında, hem mRNA hem de protein seviyesinde, kısmen ve değişik oranda artmış HDAC 1, 3 ve 6 ekspresyon seviyelerine sahip olduğu belirtilmiştir (Staberg vd 2017). Özellikle, HDAC 1 ve 3 ekspresyon seviyelerinin DSÖ tümör evrelemesi ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. GBM hastalarında yapılan Kaplan-Meier sağkalım analizlerinde, HDAC 3'ün zayıf prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. HDAC 9'un overekspresyonunun da prognostik olarak zayıf olan GBM hastalarında gözlemlendiğine rastlanılmıştır (Yang vd 2015). Sınıf III HDAC Sirt 2'nin GBM progresyonuyla pozitif olarak ilişkili olduğu ve GBM hastalarının sağkalım zamanı ile ters olarak ilişki gösterdiği belirtilmektedir. Sirt'lerin tümör baskılayıcı ya da onkogen olarak davranmaları nedeniyle, GBM'deki rolü şu an tartışmalı durumdadır. Ayrıca Sirt'lerin GBM'deki rolü klinik olarak henüz test edilmemiştir (Lee vd 2017).

Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi), histon kuyruklarındaki pozitif yükleri nötröle eden histon asetilasyonunu teşvik etmektedir ve histonların negatif yüklü DNA'ya afinitesini azaltmaktadır. Kromatinlerin bu şekilde gevşemesi transkripsiyonel mekanizmanın DNA'ya ulaşmasına ve gen transkripsiyonunun artmasına olanak sağlar. HDACi'lerin bir diğer etkisi, DNA-bağlanma proteinleri, transkripsiyon faktörleri, sinyal-iletim molekülleri, DNA-tamir proteinleri ve şaperon proteinleri gibi histon olmayan proteinlerin asetilasyonunu teşvik etmektir (Lakshmaiah vd 2014). HDACi'lerinin hücre döngüsünün durdurulmasının, intrinsik ve ekstrinsik apoptoz mekanizmalarının, mitotik hücre ölümünün, otofajik hücre ölümünün, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun indüklenmesi, anjiyogenez ve doğal öldürücü (NK) hücre-aracılı tümör immünitesini inhibe etmesi gibi çoklu mekanizmalar aracılığıyla efektif anti-kanser ilacı olarak kullanılabilirler düşünülmektedir. HDACi terapisinin nörolojik kanserlerde, özellikle

de GBM'de, kullanılması için artan ilgi, HDACi'lerin kan-beyin bariyerine (BBB) penetre olma yeteneklerinden dolayıdır (Lee vd 2015). HDACi'ler kimyasal yapılarına bağlı olarak hidroksimatlar, siklik peptidler, alifatik asitler ve benzamidler olarak sınıflandırılmaktadırlar. HDACi'ler aynı ölçüde tüm HDAC'leri inhibe edemezler, bu nedenle birçok HDAC'yi hedef alan "pan" (çoklu) ya da belirli HDAC'leri hedef alan "sınıf I" spesifik inhibitörler olarak gruplandırılabilirler.

Kanser hücreleri devamlı olarak, apoptotik yolda bir veya daha fazla anormalliğe sahiptir. Bu özellik onlara, normal yapıdaki hücelere göre sağkalım avantajı sağlamaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011). Buna ek olarak, apoptotik yanıtta anormallikler malign hücreler tarafından ilaç direnci geliştirmede majör rol oynamaktadır. İlaçların tümü olmasa da, çoğunluğu kanser hücrelerinin apoptozunu indüklemeye yoluyla etki göstermektedirler, fakat birçok tümör hücresi kendi apoptotik mekanizmasını devam ettirmektedir (Davis ve Letai 2012). Apoptotik yollardaki defektler bu nedenle terapötik yaklaşım için ideal bir hedefdir. Moleküler düzeyde apoptoz kaspaz aktivasyonu yoluyla gerçekleşmekte ve "intrinsik" veya "ekstrinsik" yolk tarafından aktive olmaktadır. Ölüm reseptör yolağı da denilen ekstrinsik yolk, TNF süperailisi reseptörleri tarafından başlatılır. Ekstrinsik yolk TRAIL, TNF ve Fas gibi ligandların reseptörleri ile etkileşmesi sonucu gerçekleşmektedir. İntrinsik yolk ise meydana gelen çeşitli hücrel stresler sonucu tetiklenmekte ve MOMP'un oluşmasına bağlı olarak, mitokondriden salınan faktörler tarafından indüklenmektedir (Bose vd 2012).

Apo2L olarak adlandırılan TRAIL'in keşfedilmesi ve yapılan çalışmalarla birlikte normal hücrelerde herhangi bir sitotoksik etki göstermeden, seçici olarak kanser hücrelerini hedef alması, anti-kanser hedefli terapilerin geliştirilmesi için umut verici bir durum ortaya koymuştur (de Miguel vd 2016). GBM'in de içinde bulunduğu birçok kanser tipinin TRAIL-indüklü apoptoza direnç göstermesi, kanser hücrelerinde TRAIL'in monoterapi olarak uygulanmasını kısıtlamıştır. Bu nedenle, kanser hücrelerinde TRAIL-indüklü bu direnç mekanizmasının ortadan kaldırılması için TRAIL ile birlikte uygulanacak efektif kombine tedavilere ihtiyaç vardır (Bangert vd 2012). Günümüzde kanser hücreleri üzerine birtakım inhibitörler kullanılarak TRAIL ile kombine denemeler gerçekleştirilmekte ve özellikle HDACi'lerin TRAIL ile kombine uygulanarak, kanser hücrelerinde TRAIL-indüklü apoptozun uyarılması hedeflenmektedir.



Bu çalışmada, TRAIL'e direnç gösterdiğini düşündüğümüz LN18, T98G, U87MG ve U373 GBM hücre hatlarında Vorinostat, MS-275, CBHA, Belinostat ve Romidepsin gibi HDACi'lerin etkilerinin denenmesi, bu hücre hatlarında TRAIL-aracılı ölümün artırılması ve GBM tedavisi için bu HDACi'lerin terapötik etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, ilk olarak seçtiğimiz bu hücre hatlarının TRAIL'a olan duyarlılıkları, TRAIL'in farklı dozlarda uygulanmasıyla ATP-tabanlı CellTiter-Glo yöntemiyle test edilmiştir. CellTiter-Glo analizi sonucunda LN18 ve T98G hücrelerinin TRAIL-duyarlı, U87MG hücrelerinin TRAIL-orta derecede dirençli, U373 hücrelerinin ise TRAIL-dirençli hücreler olduğunu desteklemiştir. Ardından yukarıda bahsettiğimiz HDACi'lerin bu hücrelerdeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla, hücrelere 24, 48 ve 72 saat boyunca 0,3125 – 10  $\mu$ M aralığında her bir HDACi'den uygulanmış ve sitotoksik etki CellTiter-Glo analiziyle belirlenmiştir. Sitotoksikite analizleri sonucunda, HDACi'lerden 3 doz, TRAIL'den de 3 doz seçilerek 24 saat boyunca kombine denemeler yapılmış, bu sayede HDACi'lerin GBM hücrelerinin TRAIL'a olan duyarlılığını nasıl etkilediği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında, kullanılan bu 5 HDACi'den hem hücrelere sitotoksikite göstermede hem de hücrelerin TRAIL'a olan duyarlılığını arttırmada Belinostat ve Romidepsin'in en etkili 2 HDACi olduğu sonucuna varılmıştır. Romidepsin ve Belinostat'ın TRAIL ile kombine uygulamasının T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarında apoptozu indükleyerek, TRAIL'a olan duyarlılığı arttırdığı Anneksin V/PI yöntemi ile akım-sitometri cihazında doğrulanmıştır. Belinostat ve Romidepsin'in T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarında pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyon değişimlerine olan etkisi kantitatif gerçek-zamanlı PCR cihazında SYBR Green metoduna göre belirlenmiştir. Belinostat ve Romidepsin'in T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarında kaspaz-8, kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonlarına olan etkisi western blot yöntemi ile analiz edilmiştir.

Çalışma sonuçlarımıza göre, GBM hücrelerine TRAIL uygulaması sonucu LN18 ve T98G hücrelerinin TRAIL-duyarlı hücreler olduğu, U87MG hücrelerinin TRAIL'e orta derecede dirençli olduğu, U373 hücrelerinin ise TRAIL-dirençli hücreler oldukları CellTiter-Glo yöntemiyle bulduğumuz sonuçlarımızla desteklenmiştir. Fibroblast hücresi olan BJ'ye ise TRAIL herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Bu hücrelere HDACi'lerin 24, 48 ve 72 saat süreyle 0.3125-10  $\mu$ M arasındaki dozlarda uygulanması sonucu Vorinostat, Belinostat ve Romidepsin'in belirgin derecede sitotoksikiteye sahip oldukları, MS-275 ve CBHA'nın ise GBM hücrelerinde tam olarak sitotoksik etkiye sahip olmadıkları belirlenmiştir. Her HDACi için seçilen 3 doz ile TRAIL için seçilen 3 dozun kombine olarak uygulanması, HDACi'lerin GBM hücrelerinin hepsinde TRAIL'e olan

duyarlılıklarını arttırmıştır. Bu sonuç, CBHA ve MS-275'in tek başlarına GBM hücrelerine sitotoksik etki göstermezken, TRAIL ile kombine olarak uygulanması sonucu hücre ölümünün tetiklenmesi, bu HDACi'lerin TRAIL ile kombine verilmesinin önemini vurgulamaktadır. HDACi'lerin GraphPad Prism IC<sub>50</sub> sonuçlarına bakılarak, GBM hücrelerinde en etkili HDACi'nin Belinostat ve Romidepsin olduğuna karar verilmiştir. Akım-sitometri deneyleri ile, Belinostat ve Romidepsin'in TRAIL ile kombine olarak uygulanmasının T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarında apoptozu ciddi şekilde arttırdığı ve bu hücreleri TRAIL-aracılı ölüme duyarlı hale getirdiği doğrulanmıştır. Tüm gerçek-zamanlı PCR analizlerinde, Belinostat ve Romidepsin'in hücrelere 24 saat boyunca uygulanmasının nedeni, TRAIL ile yapılan kombine denemelerde, TRAIL'in yarı ömrünün az olmasından dolayı olup, TRAIL ve HDACi'ler hücrelere aynı anda verilmiştir. Belinostat ve Romidepsin'in toksik olmayan dozlarının GBM hücrelerine uygulanması sonucu gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR analizlerine göre; Belinostat'ın 1.25 µM'lık dozunun 24 saatlik uygulanması, T98G hücrelerinde; pro-apoptotik *Hrk*, *Noxa*, *Bak*, *Bik* ve *kaspaz-9* gen ekspresyonlarını arttırmış, anti-apoptotik *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-W*, *Birc5* ve *Birc8* genlerinin ekspresyonunu azaltmıştır. Belinostat'ın 1.25 µM'lık dozunun 24 saatlik uygulanması, U87MG hücrelerinde pro-apoptotik *Hrk*, *Noxa*, *kaspaz-9*, *Bik*, *Bim* ve *Bmf* genlerinin ekspresyonunu arttırmış, *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *Birc2* ve *Birc5* anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını azaltmıştır. Belinostat'ın 5 µM'lık dozunun U373 hücrelerine 24 saatlik uygulanması sonucu, pro-apoptotik genlerden *Noxa*, *Bim*, *Bmf*, *kaspaz-9* ve *kaspaz-10* gen ekspresyonlarının artmış, *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-2*, *BCL2L10*, *Birc2* ve *Birc8* anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarının azalmış olduğu belirlenmiştir. Romidepsin'in 0.3125 µM'lık dozunun 24 saat boyunca T98G hücrelerine uygulanması, *DR5*, *Hrk*, *Puma*, *Noxa*, *kaspaz-9* ve *Bik* gibi pro-apoptotik genlerin ekspresyonlarını arttırmış, anti-apoptotik *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *Birc 2*, *Birc 5*, *Birc 6* ve *Birc 8* genlerinin ekspresyonlarını azaltmıştır. U87MG hücrelerinde 24 saat boyunca uygulanan 0.3125 µM Romidepsin dozu, *DR5*, *HRK*, *Puma*, *Noxa*, *Bim*, *Bik*, *Bmf* ve *kaspaz-9* ekspresyonlarını arttırmış, bununla birlikte *XIAP*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *BCL2L10*, *Birc2* ve *Birc5* anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını baskılamıştır. 0.3125 µM Romidepsin'in 24 saat boyunca uygulanması, U373 hücrelerinde *DR5*, *HRK*, *Puma*, *Noxa*, *Bak*, *Bim*, *Bik*, *Bmf* ve *kaspaz-9* genlerinin ekspresyonlarını arttırmış, *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-2*, *BCL2L10*, *Bcl-w*, *Birc2*, *Birc 5* ve *Birc 6* genlerinin ekspresyonlarını azaltmıştır. Bu sonuçlar bize, Belinostat ve Romidepsin'in DR5 ölüm reseptörüne, pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine, cIAP üyelerine ve kaspazlara etki ederek, hem intrinsik hem de ekstrinsik yolak üzerinden TRAIL-aracılı ölüme yardım ettiğini desteklemektedir. Western blot sonuçları ise Belinostat ve Romidepsin'in Bcl-2, Bax, kaspaz-8, kaspaz-9 proteinlerinin ekspresyonlarında bir etki

meydana getirmedigini göstermektedir. Bunun nedeni olarak, Belinostat ve Romidepsin konsantrasyonlarının protein seviyelerine etki edecek kadar yüksek olmaması, uygulanan 24 saatlik sürenin yine protein seviyesini değiştirmede yetersiz kalması ya da mRNA'dan proteine giden yolda meydana gelebilecek farklı bir epigenetik mekanizmanın, bu proteinlerin ekspresyonlarına etki etmiş olabileme ihtimali sayılabilir.

Literatürde HDACi'lerin pro-apoptotik proteinleri up-regüle ve anti-apoptotik proteinleri down-regüle ederek hem ekstrinsik hem de intrinsik yolda etkili olabilecekleri rapor edilmiştir (Bose vd 2014). Multiple miyelom hücrelerinde Vorinostat'ın kaspaz inhibitörlerini down-regüle ettiği belirlenmiştir (Mitsiades vd 2004). HDACi'lerin hem solid hem de malign hematopietik hücrelerde Bcl-XL, Mcl-1 ve XIAP'yi down-regüle ettiği gösterilmiştir (Gillespie vd 2006, Rosato vd 2006, Rosato vd 2007, Jona vd 2011). Glioma hücrelerinde yapılan çalışmada, HDACi'lerin survivin ve XIAP'yi down-regüle ederek etki gösterdiği bildirilmiştir (Kim vd 2005). Kronik lenfositik lösemi hücrelerinde, Romidepsin'in cFLIP down-regülasyonu yoluyla ekstrinsik yolağı aktive ettiği bulunmuştur (Aron vd 2003). HDACi'lerin apoptozun ana medyatörü olan ASK1'in indüklenmesi yoluyla E2F1-bağımlı Bim upregülasyonuna neden olduğu saptanmıştır (Zhao vd 2005, Tan vd 2006). İnsan lösemi ve miyelom hücrelerinde HDACi'ler tarafından Bim proteininin up-regülasyonun, bu hücreleri BH3-mimetik ABT-737'ye duyarlılaştırmada kritik bir role sahip olduğu bulunmuştur (Chen vd 2009). Epigenetik olarak susturulan Bim'in HDACi'ler tarafından aktivasyonu, pediatrik akut lenfoblastik lösemide glukortikoidlere olan direncin (Bachmann vd 2010) ve Burkitt lenfomada kemoterapiye olan direncin üstesinden gelebileceği bildirilmiştir (Richter-Larrea vd 2010). Bim dışındaki Bmf ve Noxa gibi diğer pro-apoptotik proteinlerin HDACi-indüklü apoptozla indüklendiği ve ABT-737 ile sinerjistik etki gösterdiği belirtilmiştir (Inoue vd 2007, Wiegmans vd 2011). Mantle hücreli lenfomada, Vorinostat'ın Bim, Bmf ve Noxa'nın promotor bölgelerini hiperasetile ederek, transkripsiyonlarını aktive ettiği ve ABT-263 ile sinerjistik olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Tse vd 2008). HDACi'ler, apoptoz olayını gerçekleştirmede Mcl-1, Bcl-XL, XIAP, c-FLIP gibi anti-apoptotik proteinleri down-regüle ederek, Bim, Bmf ve Noxa gibi pro-apoptotik proteinleri up-regüle ederek hem mitokondriyal hem de ölüm reseptör yollarının indüklenmesine neden olmaktadır. Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, diğer kanserlerde yapılan bu çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızda kullandığımız Belinostat ve Romidepsin'de pro- ve anti-apoptotik genlerden bazılarının ekspresyonlarını arttırmaktadır.

GBM hücrelerinde, çalışmamızda kullandığımız HDACi'lerle ilgili yapılan çalışmalara kronolojik bir sırayla bakıldığında; Yin ve ark. (2007) Vorinostat'ın *in vitro* ve *in vivo* olarak GBM hücrelerinin çoğalmasında ve gen ekspresyonuna etkisini araştırmışlar ve T98G, U87MG hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe ederek, hücrelerin G2-M fazında toplandıklarını bulmuşlardır. Vorinostat'ın  $2.5 \times 10^{-6}$  mol/L'lik konsantrasyonunun 24 saat uygulanması sonucunda *DR5*, *TNF $\alpha$* , *p21<sup>WAF1</sup>* genlerinin ekspresyonunu arttırdığını, *CDK2* ve *CDK4* genlerinin ekspresyonlarını azalttığını, protein seviyesinde de *p21<sup>WAF1</sup>*, *p27<sup>KIP1</sup>*'in ekspresyonlarının arttığını, *CDK2*, *CDK4*, siklin D2 ve siklin D1 protein ekspresyonlarının azaldığını belirlemişlerdir. *In vivo* olarak da SAHA'nın C57BL/6 farelerinin vücut ağırlığı, görünüş ve davranışında herhangi bir yan etkiye neden olmadan kan-beyin bariyerini aştığını göstermişlerdir (Yin vd 2007). 2010 yılında yapılan bir çalışmada, Vorinostat'ın U87MG ve U373 hücre hatlarında, topoizomeraaz I inhibitörü SN38'in sitotoksik etkisini arttırdığı, Vorinostat'ın tek başına DNA'da çift zincir kırığı meydana getirmeyenken, SN38 ile kombine uygulanmasıyla birlikte DNA'da çift zincir kırıklarının ciddi şekilde arttığı görülmüştür (Sarcar vd 2010). GBM hasta örneklerinden elde edilen primer glioma kök hücre benzeri hücrelerde yapılan araştırmada, Vorinostat'ın policomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2)'nin hedefi olan genlerin upregülasyonuna, glioma kök hücre benzeri hücrelerin ölümüne ve histon metiltransferaz olan Zeste 2 enhansörün (EZH2) ve kök hücre belirteci CD133'ün ekspresyonunun azalmasına neden olduğu bulunmuştur (Orzan vd 2011). 2011 yılında LN18, U87MG, SNB-19 ve U251 GBM hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada, gen baskılanmasından sorumlu olan lizin-spesifik demetilaz 1 (LSD1)'in shRNA ile knock-down ya da inhibitör yoluyla baskılanması LN18 ve U87MG hücrelerinde DNA fragmentasyonunu ve kaspaz-3 aktivasyonunu uyarmazken, susturulma ya da baskılanmayla birlikte 5  $\mu$ M Vorinostat uygulaması kaspaz-3 aktivitesini 2 kat, LSD1 inhibitörü ile birlikte uygulanmasıyla kaspaz-3 aktivitesinin 6 kat arttığı bulunmuştur. Bunun birlikte, bu çalışmada kontrol olarak kullanılan immortalize edilmiş astrosit hücrelerinde, Vorinostat tek başına ya da inhibitörle kombine uygulandığında herhangi bir etki göstermemiştir (Singh vd 2011). Asklund ve ark. (2012) R11 ve TB101 GBM kök hücrelerinde, 5  $\mu$ M proteozom inhibitörü Bortezomib ile 2.5  $\mu$ M Vorinostat'ı kombine olarak uygulamışlar, bunun sonucunda; GBM kök hücrelerinde kontrole göre hücre canlılığının %80-90 oranında azaldığını ve bu hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerinin ciddi oranda azaldığını belirlemişlerdir (Asklund vd 2012). Vorinostat'ın otofajik faktör LC3'ün ekspresyonu arttırdığı ve memeli rapamisin hedefini (mTOR) inhibe ettiği, bu sayede otofajik protein kinaz ULK1'in aktivasyonu ile otofaji mekanizmasının indüklendiği bulunmuştur. Aynı çalışmada, otofaji ilişkisini protein ATG7'nin susturulduğu T98G hücrelerinde otofajinin inhibe edildiği fakat 20  $\mu$ M Vorinostat'ın 48 saatlik

uygulanması sonucu, T98G hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı bir artışın ortaya çıkarak hücre canlılığının %20'lerin altına düştüğü gözlenmiştir. ATG7 susturulmuş hücrelere kaspaz-3 inhibitörü zVAD ile birlikte Vorinostat'ın uygulanması sonucu, hücre canlılığının ve koloni oluşumunda da anlamlı bir düşüşün meydana geldiği belirlenmiştir. Bu sonuç; Vorinostat'ın otofaji ve apoptozun baskılanmasına rağmen apoptotik olmayan bir hücre ölümüne neden olduğunu önermektedir (Gammoh vd 2012). Vorinostat'ın GBM5 ve GBM12 hücrelerinde çoklu kinaz inhibitörü Sorafenib'in toksisitesini artırarak hücre ölümünü tetiklediği, ayrıca PDGFR $\alpha$  reseptörünün knock-down edilmesi, vorinostatın GBM hücrelerinde doza-bağımlı olarak toksisitesini arttırmıştır (Tang vd 2012). Sferoid, farklılaşmamış adherent yapıda ve farklılaşmış GBM kök hücreleri (GSC) ile yapılan bir çalışmada Vorinostat'ın 5  $\mu$ M'lık dozunun 1 ile 7 gün arasında uygulanması, 7. günün sonuna doğru adherent yapıdaki hücrelerin canlılığını farklılaşmış GSC'lere göre ciddi şekilde azalttığı, Vorinostat'ın 5 ve 10  $\mu$ M'lık dozunun da sferoid yapıdaki GSC'lerin koloni oluşturma kapasitesini ciddi şekilde azalttığı bulunmuştur. Aynı zamanda, 5  $\mu$ M'lık Vorinostat dozunun 5. ve 7. günlerde aktive kaspaz-3 ve PARP protein konsantrasyonlarının ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırmıştır. GSC hücrelerinin canlılığını azaltan en etkili dozun 48. saatteki 20  $\mu$ M'lık doz olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda, Vorinostat'ın ksenograft modelde otofajiyi de indüklediği, bunu da AKT aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla mTOR'un inhibe edilmesine bağlı olarak gerçekleştiği kanıtlanmıştır (Chiao vd 2013). Premkumar ve ark. (2013) yaptığı çalışmada, 0-20  $\mu$ M'lık uygulanan Vorinostat, doz bağımlı olarak T98G hücre hatlarının koloni oluşumunu azalttığı ve bu hücrelerin G2-M fazında durmasını sağladığı, T98G hücrelerinde sitotoksik etkisi olmasına rağmen, kontrol olarak kullanılan astrosit hücrelerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda, Vorinostat'ın Bortezomib ile kombine uygulaması, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına ve ROS'un salınımına, Bak/Bax konformasyonel değişikliğinin indüklenerek sitokrom-c salınımına, Bim, Noxa'nın ekspresyon artışına ve Mcl-1'in inaktivasyonuna, DNA hasarının indüklenmesini arttırdığı bulunmuştur (Premkumar vd 2013). U87MG, LN229 ve U251 GBM hücreleri ile yapılan bir çalışmada, Vorinostat'ın artan konsantrasyonuyla birlikte hücre canlılığını azalttığı ve IC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 5  $\mu$ M, 7  $\mu$ M ve 14.5  $\mu$ M olduğu belirlenmiştir. Vorinostat'ın 10  $\mu$ M'lık dozunun Ki67 pozitif hücrelerin sayısını %70-90'dan %20'lerin altına çektiği, böylelikle hücrelerin proliferasyonunu düşürdüğü, 48 saatlik uygulama sonucunda da hücrelerin koloni oluşturma kapasitesinin ciddi oranda azaldığı bulunmuştur. Vorinostat'ın 10  $\mu$ M'lık dozunun kaspaz-3 ve kaspaz-9 protein ekspresyonunu arttırdığı ve mitokondriyal yolağı aktive ettiği görülmüştür. Aynı zamanda, Vorinostat'ın kaspas/CAD yolağının aktivasyonu yoluyla DNA fragmentasyon arttığı, ROS üretimini

arttırarak DNA hasarını tetiklediği, Wee1 ve Chk1 gibi G2 kontrol noktasındaki kinazların, Survivin ve TPX2 genlerinin ekspresyonlarını azalttığı ve mitotik katastrofa neden olduğu bildirilmiştir (Cornago vd 2014). PTEN ve p53 bakımından yaban-tip olan D54 ve her iki gen bakımından mutant olan U118 hücrelerindeki çalışmada, Vorinostat'ın D54 hücrelerinde 0.25 Gy'lik düşük radyasyon dozunda hiperradyosensitiviteyi arttırdığı fakat U118 hücrelerinde değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. D54 hücrelerinde etkili şekilde ölümün meydana gelmesinde kaspaz-3 aktivasyon artışı, H2AX fosforilasyonunun olmaması ve hücrelerin G2 fazında durdurulmasının etkili olduğu belirtilmiştir (Diss vd 2014). Hasta biyopsi örneklerinden elde edilen 22 adet primer GBM hücrelerinde, Vorinostat'ın IC<sub>50</sub> değerinin 0.7-6.1 µM arasında değiştiği ve kaspaz-3/-7 aktivitesini arttırdığı, Bcl-2 protein seviyesini ise %46 oranında düşürdüğü bulunmuştur (Pont vd 2015). 2015 yılında Singh ve ark. yaptığı çalışmada, LN18 hücrelerinde KDM1A (histon demetilaz 1/LSD1)'nin knock-down edildikten sonra 5 µM Vorinostat uygulanmış ve RNA sekanslama yöntemine göre Vorinostat'ın sadece kendi başına 4065 geni up-regüle ettiği, 3518 geni ise down-regüle ettiği bulunmuştur. Bu sonuçlar qRT-PCR apoptoz panel sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, Vorinostat'ın 5 µM'lık dozu *HRK*, *BIRC*, *CRADD*, *TNFRSF9*, *CD40*, *TNFRSF10B*, *BCL10*, *BCL2L11*, *CD70*, *KASPAZ-9*, *GADD45A* genlerinin ekspresyonunu 2 kat üzerinde arttırırken, *TNFRSF25*, *CFLAR*, *CARD6*, *BCLAF1*, *XIAP*, *CASP4*, *TNFSF10*, *BID*, *KASPAZ-1*, *LTBR*, *NOD1*, *TP73*, *NOL3*, *TNFRSF1A*, *CARD8*, *TNFRSF11B* ve *TP53*'ün ekspresyonlarını 2 kat üzerinde down-regüle ettiği bulunmuştur. Aynı zamanda, Vorinostat'ın LN18 hücrelerinde p53 proteininin ekspresyonunu baskıladığı görülmüştür (Singh vd 2015). LN18, SNB19, U87MG ve U251 GBM hücrelerinde, Vorinostat'ın 5 µM'lık dozunun proteozom inhibitörü bortezomib ve marizomib ile kombine denemesinde, GBM hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasının indüklediği ve kaspaz-9'un kesilerek aktif hale geçmesini arttırdığı bulunmuştur. Marizomib ve Bortezomib'in vorinostatla birlikte *in vivo* olarak farelerde uygulanması, kaspaz substratı olan lamin A'nın kesilmiş halinin anlamlı şekilde artmasına yol açtığı bildirilmiştir (Manton vd 2016). 2016 yılında Hsu ve ark. gerçekleştirdiği başka bir çalışmada, U87MG ve U373 GBM hücrelerinden sferoid yapıda hücrelerin ve glioblastom kök-hücre benzeri hücrelerin (GSC) oluşturulması sağlanmıştır. Vorinostat'ın 1, 2.5, 5, 10 ve 25 µM'lık dozu bu hücrelere uygulanmış ve MTT analizine göre artan doza bağımlı olarak hücre canlılığının azaldığı, koloni oluşturma kapasitelerini kaybettikleri, ayrıca kök hücre belirteçleri olan CD133 ve Bmi1 proteinlerinin ekspresyonlarının azaldığı bulunmuştur. Yapılan akım-sitometri analizlerine göre, Vorinostat'ın belirtilen dozlarda uygulanması hücrelerin sub-G1 fazında durduklarını, Anneksin V/PI testine göre de hücrelerin hem erken hem geç evre apoptoza uğradıkları belirtilmiştir. Araştırmacılar Vorinostat'ın düşük dozlarda hücre

döngüsüne etki ettiğini fakat yüksek konsantrasyonlarda apoptozu indüklediğini önermişlerdir. Artan dozla birlikte aktif kaspaz-3, -8 ve -9 protein ekspresyonlarının DMSO uygulanmış kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada, 0.1, 0.5, 1 ve 2.5  $\mu\text{M}$  gibi düşük konsantrasyondaki Vorinostat'ın GSC hücrelerinde p53 proteinin aktivasyonuna neden olarak, p38 proteininin fosforilasyonu üzerinden senesens-ilişkili  $\beta$ -galaktosidaz (SA- $\beta$ -gal) pozitif hücrelerin arttığını, böylelikle hücre senesensinin indüklendiğini bulmuşlardır (Hsu vd 2016). Zhang ve ark. 2017 yılında yaptığı çalışmada, U87MG hücrelerinde 0.5  $\mu\text{M}$  Vorinostat uygulamasının, hipoksi uyarıcı faktör 1 alfa (HIF1 $\alpha$ )'nın protein ekspresyonunun azalmasına neden olarak ilişkili olduğu şaperon olan ısı şok proteini 90 (Hsp90) asetilasyonu yoluyla nükleer translokasyonunu inhibe ettiğini kanıtlamışlardır. Böylelikle Vorinostat'ın hipoksi durumunu baskıladığı bulunmuştur (Zhang vd 2017). Yukarıda özetlediğimiz bilgilere bakılarak, GBM tedavisi için Vorinostat HDACi ile ilgili araştırmalar artarak devam etmektedir. Vorinostat GBM ve GSC hücrelerinde farklı hücresel olaylara etki edebilmektedir. Biz de çalışmamızda, Vorinostat'ın LN18, T98G, U87MG ve U373 GBM hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisini araştırdık. Vorinostat'ın özellikle 48. ve 72 saatlerde tüm hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı, T98G ve U373 hücre hattı için 10  $\mu\text{M}$ 'lık dozun, U87MG için 2.5, 5 ve 10  $\mu\text{M}$ 'lık dozun, LN18 hücresi için ise 5 ve 10  $\mu\text{M}$ 'lık dozun etkili olduğu görülmüştür. Hücrelerde etki gösteren bu dozlar literatürde uygulanan dozlarla paralellik görülmektedir. IC<sub>50</sub> değerleri; 48 ve 72. saat için LN18 hücresinde sırasıyla 4.123 ve 4.068, T98G hücresi için sırasıyla 10.30 ve 7.230, U87MG hücresi için sırasıyla 3.341 ve 2.298, U373 hücresi için sırasıyla 9.807 ve 8.525 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda, Vorinostat'ın GBM hücrelerine sitotoksik olarak Belinostat ve Romidepsin'den daha az etki göstermesinden dolayı, kısıtlı bütçe nedeniyle araştırmamızın diğer basamaklarında kullanılmamıştır.

Çalışmamızda kullandığımız diğer bir inhibitör olan MS-275 ile ilgili olarak da, Chen ve ark. 2005 yılında yaptığı çalışmada, U87MG hücrelerinde trichostation A, HDAC42, Vorinostat ve MS-275'in etkisini denemişlerdir. Yapılan çalışmada, MS-275'in 5  $\mu\text{M}$ 'lık dozu 48 saat boyunca U87MG hücrelerine uygulanmış ve MS-275'in hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. MS-275 için IC<sub>50</sub> değeri 48. saatte 4.8  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. MS-275'in 0.5, 2.5 ve 5  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonları p21<sup>WAF/CIP</sup> genini up-regüle ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, kullanılan diğer HDACi'lere göre MS-275'in 5  $\mu\text{M}$  ve altındaki dozları Akt fosforilasyonunu baskılamada düşük etki göstermiş, bu nedenle Akt aktivasyonunu baskılamada etkisiz olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, MS-275'in U87MG hücrelerinde terapötik olarak uygulanabilir dozları ( $\leq 5 \mu\text{M}$ ), bu hücrelerin G0/G1

fazında durdurulmasına neden olmaktadır (Chen vd 2005). GBM-kökenli nörosfer HSR-GBM1A (20193) ve HSR-GBM1B (10627) hücrelerinde 2009 yılında yapılan başka bir çalışmada, MS-275'in doz- ve zamana-bağlı olarak nörosfer hücre büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir. MS-275'in artan konsantrasyonlarda 72 saat boyunca nörosfer hücrelere uygulanması sonucunda, kolorimetrik MTS yöntemine göre IC<sub>50</sub> değeri ~3.5 µM olarak hesaplanmıştır. Nörosfer hücrelere IC<sub>50</sub> dozunun 144 saat uygulanması, bu hücrelerin canlılığını %82-86 oranında inhibe etmiştir. Yapılan koloni analizi çalışmalarında, MS-275'in ard arda 14 gün boyunca ya da 3 gün boyunca uygulandıktan sonra uzaklaştırılıp yerine 11 gün boyunca besiyeri uygulaması, nörosfer hücrelerinin koloni oluşumunu anlamlı şekilde baskılamıştır. MS-275 uygulaması sonucu, kök hücre fenotip belirteci ALDH'in kantitatif akım-sitometrisi analizi, hücrelerdeki ALDH ekspresyonunun 10 kat azaldığını göstermiştir. Astrosit hücre belirteçleri GFAP ve nöronal belirteç β-tübülin III (TuJ1)'in ekspresyonlarının, 72 saatlik MS-275 uygulaması sonucu önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada önemli bir bulgu da, MS-275 ve TSA'nın, nörosfer oluşumunu inhibe eden ve nörosfer hücre farklılaşmasını indükleyen DNER reseptörünü upregüle ettikleri ortaya çıkarılmıştır (Sun vd 2009). MS-275'in GBM hücrelerini kemoterapi-indüklü apoptoza duyarlı hale getirdiği ilk kez 2011 yılında tanımlanmıştır. MS-275'in U87MG ve A172 hücrelerine sırasıyla 8 µM ve 5 µM olarak uygulanması H3 histon asetilasyonunu arttırdığı belirlenmiştir. MS-275'in GBM hücrelerine 24 saat boyunca, toksik dozun altında uygulanmasından sonra artan dozlarda doksorubisin uygulanması, doz- ve zamana-bağlı olarak doksorubisin-indüklü apoptozu ciddi şekilde arttırdığını göstermiştir. Aynı durum, MS-275'in temozolomid-aracılı apoptozun indüklendiğinde de görülmüştür. Kanserin tedavisinde kullanılan diğer ilaçlardan etoposid ve cisplatinin, MS-275 uygulanmasından sonra hücrelere verilmesi, bu ilaçların U87MG ve A172 hücrelerindeki apoptoz indüklemeye kapasitesini arttırmıştır. Bu çalışmada sadece, MS-275'in vincristine veya taxol gibi mikrotübül inhibitörüyle birlikte uygulanması, apoptozu arttırmak yerine azaltmıştır. Bunun nedeni olarak, MS-275 bu çalışmada U87MG ve A172 hücrelerini G1 fazında durdurmuş, S ve G2 fazındaki bulunan hücreleri azaltmıştır. Bu nedenle, G1 fazındaki hücrelerin mitotik inhibisyona daha az duyarlı olmalarından dolayı, MS-275 bu inhibitörlerin apoptozu indüklemeye kapasitesini arttıramamıştır (Bangert vd 2011). Gli35-EvIII, U251 ve LN229 GBM hücre hatları ile yapılan çalışmada, MS-275'in 5 µM'lık dozunun her üç hücre hattında da kaspaz-3, -7 aktivitesinde bir değişikliğe neden olmadığı, aynı şekilde kaspaz-8 ve PARP protein seviyelerini değiştirmedeği ve tek başına apoptozu indüklemediği bulunmuştur. Bununla birlikte, MS-275'in 2.5 µM'lık dozunun U251 hücrelerinde DR4 ve DR5'in protein ekspresyonlarını arttırdığı fakat akım sitometri deneyinde sadece DR5'in hücre yüzey seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Bağcı-Önder vd 2013). Literatür bilgilerine bakılarak,



GBM hücrelerinde MS-275 ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Biz de çalışmamızda, MS-275'in sitotoksik etkisini 24, 48 ve 72. saatte 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda test ettik. Analizlerimiz sonucunda, MS-275'in T98G ve U373 hücre hatlarının canlılığında etkili bir değişime neden olmadığı, LN18 hücrelerinde 48 ve 72. saatlerde kısmi bir azalışa neden olduğu, en belirgin etkinin de 48. ve 72. saatlerde U87MG hücrelerinde 5 ve 10  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması sonucu meydana geldiği belirlenmiştir. U87MG hücresi için MS-275'in  $\text{IC}_{50}$  değeri 48. Saat için 3.789, 72. saat için 3.520 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, Chen ve ark. (2005)'nin U87MG için bulmuş olduğu  $\text{IC}_{50}$  değerinden daha düşüktür.

Depsipeptid veya FK-228 olarak da bilinen Romidepsin, *Chromobacterium violaceum*'dan izole edilmiştir ve HDACi'lerin siklik peptid sınıfında yer almaktadır. Romidepsin, güçlü bir tersine döndürebilir HDAC inhibe edici aktiviteye sahiptir (Bezecny 2014). Literatürde, GBM üzerine Romidepsin ile ilgili yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Sawa ve ark. (2004)'nin T98G, U251 ve U87MG hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada, Romidepsin'in 1 ng/ml dozunun GBM hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı, aktif kaspaz-3'ün protein seviyesinde artışa neden olarak apoptozu indüklediği, Histon 4 asetilasyonun artışını sağlayarak p21WAF1'in ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. Romidepsin'in 24 ve 48 saat boyunca uygulanmasının GBM hücrelerinde Bad ekspresyonunu arttırdığı, anti-apoptotik protein Bcl-XL'nin ise protein ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir. Sadece U87MG hücrelerinde Romidepsin uygulanması sonucu anti-apoptotik Bcl-2'nin inhibe edildiği görülmüştür. Bununla birlikte Bax ve Fas proteinlerinin ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe rastlanılmamıştır. Bu çalışmada ayrıca, Romidepsin'in MMP-2'nin aktivitesi düşürerek U251 hücrelerinde invazyonu inhibe ettiği belirtilmiştir. Yapılan in vivo çalışmada da, Romidepsin'in tümör büyümesini baskıladığı ve Tunel yöntemi sonucu apoptoz miktarının indüklendiği bulunmuştur (Sawa vd 2004). 2016 yılında U251, AM38, LN382, U138MG, A172, KMG4 GBM hücreleri üzerinde yapılan çalışmada, Romidepsin'in 10 nM'lık dozunun 50  $\mu\text{M}$  Temozolomid ile birlikte kombine uygulanmasının, GBM hücrelerinin canlılığını ciddi şekilde azalttığı bulunmuştur. Anneksin V/PI yöntemine göre yapılan akım-sitometri analizinde, Romidepsin ve TMZ'nin belirtilen dozlarda kombine uygulamasının, kontrole ve tek başlarına uygulanmasına göre, LN382 ve U251 hücrelerinin apoptozunu anlamlı şekilde arttırdığı, her iki hücre hattında da aktif kaspaz-3, Bax ve PARP'ın protein ekspresyon düzeylerinin artarak Bcl-2 protein ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. Romidepsin'in GBM hücrelerinde TMZ aracılı apoptozu artırma mekanizmasını aydınlatmaya çalışan araştırmacılar, kombine uygulama ile birlikte LN382 hücrelerinde

histon H3 asetilasyonunun arttığı, EGFR, Akt, mTOR, p70S6K'nın protein ekspresyonlarında azalma meydana geldiği ve mTOR'u inhibe eden 4EBP1 proteininin ekspresyonunun arttığını bulmuşlardır. Yaptıkları *in vivo* deneyde de PI3K/AKT/mTOR yolak üyelerinin ekspresyonlarının azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca Romidepsin ve TMZ'nin kombine olarak uygulanması, *in vivo*da tümör boyutu ve ağırlığında azalma meydana getirmiştir. Tüm bu sonuçlar, Romidepsin'in GBM hücrelerini TMZ-aracılı ölüme duyarlı hale getirmede, PI3K/AKT/mTOR yolağını baskıladığını göstermektedir (Wu vd 2016). Sunduğumuz araştırmamızda, Romidepsin'in LN18, T98G, U87MG ve U373 GBM hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca meydana getireceği sitotoksik etki ilk kez ATP-tabanlı bir sitotoksikite yöntemiyle gösterilmiştir. Romidepsin'in 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10  $\mu\text{M}$ 'lık dozları 24. saatte hücrelerin hepsinin canlılığına etki ettiği, 72. saatin sonunda artan konsantrasyonla birlikte LN18 ve T98G hücre hatlarının canlılığı %5'lerin altına, U87MG ve U373 hücre hatlarında 0.3125  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonda hücre canlılığının %20-40 arasında olduğu gözlenmiştir. Tüm hücre hatlarında,  $\text{IC}_{50}$  değerlerinin, 48. ve 72. saatte 0.5  $\mu\text{M}$ 'ların altında olduğu hesaplanmıştır. Çalışmamızda kullanılan Vorinostat, MS-275 ve CBHA HDACi'lere göre Romidepsin'in GBM hücrelerine daha etkili sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

PXD-101 olarak da bilinen Belinostat, yeni bir hidroksimat grubundan bir HDACi'dir ve sınıf I ve sınıf II HDAC'leri hedeflemektedir. GBM'de Belinostat ile ilgili çalışmalar tarandığında sadece 2016 yılında gerçekleştirilmiş 1 adet çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, Belinostat LN18 ve LN229 hücrelerine 0.1-10  $\mu\text{M}$  aralığında uygulanmış ve sitotoksik etki kolorimetrik bir yöntem olan MTT ile analiz edilmiştir. Belinostat'ın belirtilen dozlarda 24 ve 48 saatlik uygulanması sonucu,  $\text{IC}_{50}$  değerleri GraphPad Prism programıyla LN229 hücresi için 0.6  $\mu\text{M}$ , LN18 hücresi için 1.3  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. Belinostat'ın Anneksin V/PI yöntemi kullanılarak akım sitometri cihazında GBM hücrelerinde apoptoza olan etkisi bakılmış, 0.5 ve 2  $\mu\text{M}$ 'lık dozun 48 saat boyunca uygulanması sonucu, LN229 hücrelerinde sırasıyla %52,4 ve %69 oranında apoptotik hücre saptanmıştır. LN18 hücreleri ise aynı doz ve sürelerde sırasıyla %16.1 ve %28 oranında apoptotik hücre saptanmış ve LN18 hücrelerinin apoptoza daha dirençli olduğu görülmüştür. Meydana gelen apoptotik hücrelerin erken faz apoptotik hücreler olduğu belirlenmiştir. Akım sitometri yöntemiyle hücre döngüsü analizlerine bakıldığında, hücre döngüsü evreleri bakımında her iki hücre hattında çok ufak bir değişiklik gözlenmiştir ve Belinostat'ın her iki hücre hattında da G1 veya G2/M-bağımlı hücre döngüsü susturulmasını indüklemeye yetersiz olduğu görülmüştür. Belinostat'ın 0.5 ve 2  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarının 24 saat boyunca uygulanmasının her iki hücrede de pro-apoptotik ve anti-

apoptotik genlerin ekspresyonlarını değiştirmediği, bunun nedeni olarak da Belinostat'ın GBM hücrelerinde 24 saatlik olarak uygulanan sürenin, gen ekspresyon paternlerini değiştirecek kadar yeterli olmadığı önerilmiştir. Belinostat'ın LN229 hücrelerinde 48 saat olarak uygulanması *Puma*, *Bim* ve *Chop* genlerinin ekspresyonlarını up-regüle ettiği, *p21* ekspresyonunun ise her iki hücre hattında overeksprese olduğu, GRP78 ve GRP90 şaperonlarının protein ekspresyonlarının sadece LN229 hücrelerinde baskılandiğı bulunmuştur. *Bax*, *Bcl-XL*, *Bax*, *Noxa* ve *DR5* ekspresyonları bakımından her iki hücre hattında da anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Kusaczuk vd 2016). Bizim çalışmamızda, bu çalışmaya paralel olarak LN18, T98G, U87MG ve U373 hücrelerinde Belinostat'ın IC<sub>50</sub> değeri mikromolar seviyelerinde bulunmuş, bu çalışmadan farklı olarak LN18 hücrelerinde 72. saatte 2.561  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır. LN18 hücresi deney aşamasında kontaminasyona maruz kaldiğından çalışma dışı bırakılmış ve gen ekspresyon analizleri gerçekteştirilememiştir. Araştırmamızda, Belinostat'ın T98G ve U87MG hücrelerine 1.25  $\mu$ M, U373 hücrelerine ise 5  $\mu$ M olarak uygulanması sonucu; *Hrk*, *Noxa*, *Bak*, *Bik*, *Bim*, *Bmf* pro-apoptotik genlerin ekspresyon artışı, *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-W*, *Bcl-XL*, *Bcl-2*, *BCL2L10*, *Birc2*, *Birc5* ve *Birc8* anti-apoptotik genlerin ekspresyon azalışı meydana gelmiştir. Bu sonuçlar bize, Belinostat GBM hücrelerindeki sitotoksik etki göstermede ve apoptozu indüklemeye hücre tipine bağlı olarak etki gösterdiği sonucunu göstermiştir.

HDACi'lerin konvansiyonel kemoterapötikler, radyoterapi, transkripsiyonel modülatörler gibi farklı farmakolojik ve biyolojik anti-kanser ilaçlarla çalışabildiği bilindiğinden, son 15 yılda HDACi'lerin kanser hücrelerinin TRAIL-indüklü öldürülmesinde kombine olarak kullanılması fikri giderek artmıştır. Literatürde HDACi ve TRAIL'in kombine uygulamalarına ait yayınlar değişik kanser türlerinde giderek artan ve ilgi çeken bir konudur. Multiple myelomda (MM) yapılan bir çalışmada, HDACi olan panobinostat'ın doza ve hücre tipine bağlı olarak, DR5 reseptörünü upregüle ederek ve c-FLIP ekspresyonunu baskılayarak, MM hücrelerini TRAIL-indüklü apoptozu duyarlı hale getirdiği bulunmuştur (Matthew vd 2013). Prostat kanseri LNCaP hücrelerinde yapılan çalışmada, TRAIL gen terapisi ile birlikte Romidepsin ve MS-275 uygulamasının, LNCaP hücrelerinin apoptozunu PARP ve kaspaz-3 aktiveştirmek suretiyle gerçekteştirerek, bu hücreleri TRAIL-aracılı ölüme duyarlı hale getirmiştir (Kasman ve Johnson 2007). Kronik lenfositik lösemide yapılan çalışmada, Romidepsin'in CLL hücrelerinin TRAIL-R2 reseptör seviyesini arttırarak ve DISC kompleksi oluşumunu indükleyerek hızlı bir şekilde kaspaz-8 aktivasyonu aktiveştirir ve CLL hücrelerini TRAIL-aracılı ölüme duyarlı hale getirmektedir (Inoue vd 2005). Renal hücre karsinomunda da

benzer şekilde Trichostatin A'nın ve sodyum bütratin TRAIL-R2 ekspresyonunu arttırarak, bu hücreleri TRAIL-aracılı apoptoza duyarlı hale getirmektedir (VanOosten vd 2005). CLL'de yapılan başka bir çalışmada, Romidepsin'in FADD proteinlerinin TRAIL-R1'e çekerek kaspaz-8 aktivasyonuna neden olarak hücreleri TRAIL'a duyarlı hale getirmiştir (Inoue vd 2009). Vorinostat, MS-275, CBHA ve Trichostatin'in lösemi hücrelerinde TRAIL ile birlikte denemesi, DR4, DR5, Bak, Bax, Bim, Noxa ve Puma'nın upregülasyonuna, IAP, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-XL'nin down-regülasyonuna neden olarak TRAIL-aracılı apoptozu indüklediği bulunmuştur (Shankar vd 2005). Hepatosellüler karsinomda yapılan çalışmada, vorinostat, MS-275 ve sodyum bütratin TRAIL reseptör ekspresyonlarını arttırmayıp, TRAIL-indüklü Bid aktivasyonuna neden olarak hepatosellüler karsinom hücrelerinin TRAIL'a duyarlı hale getirmektedir (Dzieran vd 2008). Vorinostat, valproik asit, sodyum bütrat ve MS-275'in lösemi hücrelerinde TRAIL-R2, c-FLIP ve Apaf-1 ekspresyonlarını regüle ederek, TSA'nın ise sadece Apaf-1 ekspresyonunu düzenleyerek TRAIL-aracılı ölümü tetiklediği belirtilmiştir (Morales vd 2010). Melanom hücrelerinde yapılan çalışmada, MS-275'in TRAIL-dirençini c-FLIP ekspresyonunu down-regüle etmek suretiyle gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Venza vd 2014). TRAIL'e dirençli MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan çalışmada, Vorinostat'ın bu hücreleri TRAIL'e duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir. Vorinostat'ın bu etkiyi kaspaz-8, -9 ve -3'ün, Bid ve PARP'in aktivasyonu, Bax ve DR5 ekspresyon artışı yoluyla gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Butler vd 2006).

GBM'de, HDACi'leri ve TRAIL ile birlikte gerçekleştirilen çalışmalar sınırlı sayıdadır. HDACi-aracılı TRAIL'e duyarlılık birçok solid ve hematolojik kanser hücre hatlarında daha önce tanımlanmış olmasına rağmen, GBM'de 2012 yılına kadar sadece bir yayın mevcuttur. 2005 yılında U87MG, U251MG, A172 ve T98 insan glioblastom hücre hatlarında yapılan çalışmada, sodyum bütratin TRAIL ile kombine halde uygulandığında bu hücre hatlarını TRAIL-indüklü ölüme duyarlılaştırdığı fakat normal astrosit hücrelerinde herhangi bir değişime neden olmadığı bulunmuştur. Ayrıca, sodyum bütrat ve TRAIL'in kombine halde uygulanması sonucu kaspaz-3, -7, -8, -9 aktivasyonunun arttığı, survivin ve XIAP'nin baskılandığı görülmüştür. Ayrıca araştırmacılar bu çalışmada TSA ve SAHA histon deasetilaz inhibitörlerinin de glioma hücrelerini, Cdc2 aktivasyonunun inhibisyonu ve survivinin, XIAP'nin downregülasyonu yoluyla TRAIL-indüklü apoptoza duyarlılaştırdığı belirtilmiştir (Kim vd 2005). 2012 yılında Bangert ve ark. tarafından, MS-275, SAHA ve valproik asit ile U87MG, U138MG, A172, T98G ve LN18 GBM hücre hatları ile yapılan çalışmada, HDACi'lerin inhibitörlerin bu hücre hatlarında TRAIL-indüklü apoptozu arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca aynı araştırmacılar, MS-

275'in, cFLIPL ve cFLIPs'in ekspresyonunu azaltarak, kaspaz-8, -9 ve -3'ün aktivasyonuna neden olduğunu, Bid'in tBid olarak işlenmesine, Bax aktivasyonuna, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına ve sitokrom c salınımına neden olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda, MS-275, c-myc'in cFLIP promoter bölgesine bağlanmasını arttırarak cFLIP promoter aktivitesinin kaybına neden olduğu da saptanmıştır (Bangert vd 2012). 2013 yılında Bağcı-Önder ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada, MS-275'in Gli36-EvIII, U251 ve LN229 hücrelerinin apoptozunu indüklemeye tek başına yeterli olmadığı, *in vitro* ve *in vivo* TRAIL-dirençli GBM hücrelerini kök hücre-aracılı TRAIL'e duyarlı hale getirdiğini rapor etmişlerdir. Her üç hücre hattında da kombine uygulama sonucu doz-bağımlı olarak kaspaz-3/-7 aktivitesinin arttığı, aktif kaspaz-8 ve PARP'in protein ekspresyonlarının ciddi şekilde arttığı gözlenmiştir. Literatürden elde edilen bu veriler, HDACi'lerin hem solid hem de hematolojik malignansilerin yanında GBM'in de TRAIL-duyarlılığını arttırdığı, böylelikle kanser hedefli terapötikler için uygun bir hedef olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Biz de gerçekleştirdiğimiz çalışmada, Vorinostat, MS-275, CBHA, Romidepsin ve Belinostat HDACi'lerin TRAIL ile birlikte kombine uygulaması sonucu tüm hücrelerde TRAIL-aracılı ölümün indüklendiği, en belirgin etkinin Belinostat ve Romidepsin aracılığıyla meydana geldiği bulunmuştur. Belinostat ve Romidepsin'in TRAIL-aracılı hücre ölümünü gerçekleştirmede pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyonu artırarak, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyonu azaltarak gerçekleştirebileceği düşünülebilir. Araştırmamız literatür bilgilerini destekler nitelikte, HDACi'ler GBM hücrelerinde TRAIL-aracılı hücre ölümünü desteklemektedir.

Çalışmamızda, Belinostat'ın T98G hücre hattında Puma, Bid, Bclaf, kaspaz-3, kaspaz-7 gibi pro-apoptotik genlerde ekspresyon azalışına, Bcl-XL, Birc 3 anti-apoptotik genlerin ekspresyonunda artışa, U87MG hücre hattında Bid, Bclaf, kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8, kaspaz-10 genlerinde ekspresyon azalışına, BCL2L10, Birc 3, Birc 8 gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonunda artışa, U373 hücre hattında ise Bid, Bclaf, kaspaz-3, kaspaz-8 gibi pro-apoptotik genlerde ekspresyon azalışına, Bcl-XL, Birc 3 gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonunda artış meydana getirdiği gözlenmiştir. Romidepsin'in ise T98G hücre hattında FADD, Bad, Bid, BCLAF, Bmf, kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8, U87MG hücre hattında FADD, Bad, Bid, BCLAF, kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8, kaspaz-10, U373 hücre hattında FADD, Bad, Bid, BCLAF, kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu azalttığı; T98G hücre hattında BCL2L10, Birc 3, U87MG hücre hattında Mcl-1, Birc 6, U373 hücre hattında Birc 3 anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını arttırdığı belirlenmiştir. Belinostat ve Romidepsin 3 hücre hattında

yukarıda belirtilen genlerde meydana gelen beklenmeyen bu artış ya da azalışların, bu genlerle ilişkili olan transkripsiyon faktörlerinden kaynaklandığı düşünülebilir. Bu iki HDACi'nin pro-apoptotik genlerin ilişkili olduğu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını azaltmak suretiyle bu genlerin ekspresyonlarında azalış meydana getirdiği, anti-apoptotik genlerin ilgili transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını arttırarak bu genlerin ekspresyon artışına neden olabileceği önerilebilir. Elde edilen veriler sadece mRNA düzeyinde olduğundan protein düzeyinde de ilişkilendirilmelidir. Bu nedenle Belinostat ve Romidepsin'in glioblastoma üzerine olan moleküler etkilerinin daha detaylı araştırılması gerekmektedir. Çalışmamızda ayrıca Belinostat ve Romidepsin'in tüm hücre hatlarında Hrk, Noxa, Bmf, Bik gibi pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu anlamlı bir şekilde arttırması, bu genler üzerinde fonksiyon çalışması yapılmasını işaret etmektedir. İlgili genlerin overekspresyonu ve baskılanması sağlanarak, bu HDACi'lerin glioblastoma üzerindeki olası moleküler mekanizması aydınlatılabilir.

Tümör baskılayıcı gen TP53 mutasyonları, glioblastomaların %30-50'sinde meydana gelmektedir. *TP53* geninde mutasyon meydana gelmesi, yabani-tip TP53'ün transkripsiyon fonksiyonunun kaybıyla sonuçlanması nedeniyle yüksek malignansi ve tümörögenез ile ilişkilidir. Yabani-tip TP53 fonksiyon kaybı tümör progresyonunu arttırmada yeterli olmasına rağmen, mutant TP53, hücre canlılığını ve hücre büyümesini arttırma, apoptozu azaltma ve ilaç direnci gibi yeni fonksiyonlar kazanabilmektedir. Mutant *TP53* olan hücrelerde çoklu ilaç direnci geni 1 (MDR1)'in artan ekspresyonuyla ilişkilidir. Mutant *TP53*'ün ovaryum, akciğer, osteosarkoma, prostat ve kolon kanserlerinde kemoterapi ve radyoterapiye direnci arttırdığı belirtilmektedir. Glioblastomalarda mutant TP53'ün fonksiyonu yeterince aydınlatılmamıştır (Wang vd 2013).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz T98G, U87MG ve U373 hücre hatlarının genetik analizleri, T98G ve U373 hücrelerinin *p53* geni bakımından mutant, U87MG hücrelerinin ise *p53* geni bakımından yaban tipinde olduğunu göstermiştir (Premkumar vd 2013). Yaban tip *p53*'ün Puma ve Noxa gibi pro-apoptotik proteinlerin regülasyonunu düzenleyerek apoptoz sürecine katkı sağlamaktadır. Kantitatif gerçek zamanlı PCR sonuçlarından elde ettiğimiz verilere göre, Belinostat'ın T98G ve U373 hücre hatlarında Noxa ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırmakta, ek olarak Romidepsin de aynı hücre hatlarında Puma ve Noxa'nın ekspresyonunu arttırmaktadır. *p53* bakımından mutant

olan hücrelerde böyle bir durumun oluşması, HDACi'lerin apoptoz yolağındaki genleri p53-bağımsız olarak regüle ettiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. p53-bağımsız gerçekleşen Noxa aktivasyonu anti-apoptotik protein Mcl-1'e bağlanarak, pro-apoptotik Bak'ın Mcl-1'den ayrılmasına böylelikle mitokondriyal membran potansiyelinin değıştirmesine ve apoptozu uyarmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz Belinostat ve Romidepsin'in p53 mutant hücrelerde apoptozu indükleme yeteneğine sahip olduğu ve apoptotik etki mekanizmasının Noxa üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bu nedenle, yaban tip ve mutant p53 GBM hücrelerinde Belinostat ve Romidepsin'in etki mekanizmasının daha ayrıntılı olarak ileri çalışmalarla aydınlatılmaya ihtiyaç vardır.

Literatür verileri tüm olarak dikkate alındığında, GBM hücreleri üzerinde HDACi'lerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi genellikle kolorimetrik sitotoksisite yöntemleriyle saptanmışken, araştırmamızda diğer yöntemlerle kıyaslandığında, çok daha güvenilir olan ATP ölçümüne dayalı lüminometrik bir metod olan CellTiter-Glo kullanılması, sitotoksisite sonuçlarımızın güvenilirliğini arttırmaktadır. Ayrıca, doktora tez projesi olan 30.000 TL'lik bütçenin yanında, Koç Üniversitesi'nden aldığımız desteklerle aynı anda 5 farklı inhibitörün, 4 farklı hücre hattında geniş bir doz aralığında yürütülmüş olması çalışmamızın geniş kapsamlı olmasına ve kıyaslanabilir sonuçlar elde etmemize neden olarak özgün bir araştırmanın ortaya çıkması gerçekleşmiştir.

Bu alanda yapılacak GBM ve diğer kanser araştırmaları için, bu araştırma sonuçları temel alınarak, başta Romidepsin ve Belinostat olmak üzere diğer HDACi'lerle, ilk önce hücre döngüsü basamaklarına, sağkalımı etkileyen PI3K/Akt/mTOR gibi sinyal yollarına ve otofaji gibi diğer hücre ölümü mekanizmalarına olan etkilerinin araştırılması önerilmektedir.

## 6. SONUÇ

Primer beyin tümörlerinin en agresifi olan GBM, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi yaklaşımlarına kısa süreli yanıt vermesi nedeniyle oldukça zor bir hastalıktır. GBM'in kompleks bir hastalık olması yapısındaki genetik ve epigenetik değişimlerin oldukça karmaşık olmasından kaynaklanmaktadır. GBM'e yönelik günümüzde tam efektif bir tedavi stratejisi olmamasına karşın, bilim camiası bu hastalığın tedavisi için kombine denemeler gibi yeni stratejiler geliştirme çabasıdadır. Bu stratejilerden biri de, sadece kanser hücrelerine seçici özellikte davranan TRAIL ile apoptoz, vb. hücrel olaylara etki eden HDACi'lerin kombine uygulanmasıdır. Günümüzde birçok kanser için *in vitro* ve *in vivo* olarak TRAIL+HDACi uygulaması araştırılmaktadır ve GBM ile ilgili çalışmalar sınırlı olsa da, gün geçtikçe artmaktadır.

Gerçekleştirdiğimiz bu doktora tez çalışmamızda; FDA-onaylı Vorinostat, Romidepsin ve Belinostat'ın, FDA-onayı olmayan MS-275 ve CBHA HDACi'lerin GBM hücrelerinde TRAIL-aracılı ölümü indükleyip indüklediği ve TRAIL-aracılı hücre ölümünü en iyi tetikleyen iki HDACi'nin apoptotik yolaktaki genlerin seviyelerini nasıl etkilediğini araştırdık. Amaçlarımız doğrultusunda, bu çalışmanın sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- LN18 ve T98G hücrelerinin TRAIL'a duyarlı hücreler oldukları,
- U87MG hücrelerinin TRAIL'a orta derecede dirençli hücreler oldukları,
- U373 hücrelerinin TRAIL-dirençli hücreler oldukları,
- BJ fibroblast hücrelerinde ise TRAIL'in herhangi bir sitotoksik etki göstermediği,
- Vorinostat'ın 0.3125 – 10  $\mu$ M arasındaki konsantrasyonlarda LN18, T98G, U87MG ve U373 hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu,



- Vorinostat'ın LN18, T98G ve U87MG hücrelerinde TRAIL ile kombine olarak denenmesi bu hücrelerde TRAIL-aracılı ölümü indüklediği, U373 hücrelerinde de diğer hücreler kadar olmasada hücre canlılığını azalttığı,
- MS-275'in 24, 48 ve 72'lik uygulamasının sadece LN18 ve U87MG hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu, T98G ve U373 hücrelerinde belirgin bir sitotoksik etkiye neden olmadığı,
- MS-275'in tek başına GBM hücrelerinde ciddi sitotoksik etkiye sahip olmasa da, LN18, T98G ve U87MG hücrelerinin TRAIL'e olan duyarlılığını arttırdığını, fakat U373 hücrelerinde bu etkinin kısmi olduğu,
- CBHA'nın 24, 48 ve 72 saatlik uygulamasının hücrelerde belirgin bir sitotoksik etkiye neden olmadığı,
- CBHA'ın TRAIL ile kombine uygulamasının MS-275'in kombine uygulamasına benzer olarak LN18, T98G ve U87MG hücrelerinin TRAIL-aracılı ölümünü indüklediği, U373 hücrelerinde bu etkinin düşük seviyede olduğu,
- Belinostat'ın 24, 48 ve 72 saatlik uygulamasının doz- ve zamana-bağlı olarak tüm GBM hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı,
- Belinostat'ın TRAIL ile 24 saatlik kombine uygulamasının tüm GBM hücrelerinde ölümü ciddi şekilde arttırdığı, bu nedenle Belinostat'ın GBM hücrelerini TRAIL-aracılı ölüme duyarlı hale getirdiği,
- Romidepsin'in 24, 48 saatlik ve 72 saatlik uygulamasının doz- ve zamana-bağlı olarak tüm GBM hücrelerinde ciddi derecede sitotoksik etkiye neden olduğu,
- GBM hücrelerinde TRAIL-aracılı ölümü en etkin Romidepsin'in gerçekleştirdiği,
- Akım sitometri deneyleri ile Belinostat+TRAIL ve Romidepsin+TRAIL uygulamasının T98G, U87MG ve U373 hücrelerinin ölümünü ciddi şekilde arttırarak ve bu iki HDACi'nin tüm GBM hücrelerini TRAIL'a duyarlı hale getirdiğinin konfirme edilmesinin sağlandığı,
- qRT-PCR deneyleri sonucunda, **Belinostat'ın** 1.25  $\mu$ M'lık dozunun 24 saatlik uygulanması, T98G hücrelerinde; pro-apoptotik *Hrk*, *Noxa*, *Bak*, *Bik* ve *kaspaz-9* gen ekspresyonlarını arttırdığı, anti-apoptotik *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-W*, *Birc5* ve *Birc8* genlerinin ekspresyonunu azalttığı,
- Aynı deneyde Belinostat'ın 1.25  $\mu$ M'lık dozunun 24 saatlik uygulanması, U87MG hücrelerinde pro-apoptotik *Hrk*, *Noxa*, *kaspaz-9*, *Bik*, *Bim* ve *Bmf* genlerinin ekspresyonunu arttırdığı, *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *Birc2* ve *Birc5* anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını azalttığı,
- Belinostat'ın 5  $\mu$ M'lık dozunun U373 hücrelerine 24 saatlik uygulanması sonucu, pro-apoptotik genlerden *Noxa*, *Bim*, *Bmf*, *kaspaz-9* ve *kaspaz-10* gen

- ekspresyonlarının arttığı, *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-2*, *BCL2L10*, *Birc2* ve *Birc8* anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarının azaldığı,
- **Romidepsin'in** 0.3125 µM'lık dozunun 24 saat boyunca T98G hücrelerine uygulanması, *DR5*, *Hrk*, *Puma*, *Noxa*, *kaspaz-9* ve *Bik*'in pro-apoptotik genlerin ekspresyonlarını arttırdığı, anti-apoptotik *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*, *Birc 2*, *Birc 5*, *Birc 6* ve *Birc 8* genlerinin ekspresyonlarını azalttığı,
  - U87MG hücrelerinde 24 saat boyunca 0.3125 µM Romidepsin dozunun, *DR5*, *HRK*, *Puma*, *Noxa*, *Bim*, *Bik*, *Bmf* ve *kaspaz-9* ekspresyonlarını arttırdığı, bununla birlikte *XIAP*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *BCL2L10*, *Birc2* ve *Birc5* anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını baskıladığı,
  - 0.3125 µM Romidepsin'in 24 saat boyunca uygulanması, U373 hücrelerinde *DR5*, *HRK*, *Puma*, *Noxa*, *Bak*, *Bim*, *Bik*, *Bmf* ve *kaspaz-9* genlerinin ekspresyonlarını arttırdığı, *Mcl-1*, *XIAP*, *Bcl-2*, *BCL2L10*, *Bcl-w*, *Birc2*, *Birc 5* ve *Birc 6* genlerinin ekspresyonlarını azalttığı,
  - Western blot deneylerinde qRT-PCR deneylerinde T98G, U87MG ve U373 hücreleri için uygulanan dozların *kaspaz-8*, *kaspaz-9*, *Bcl-2* ve *Bax* proteinlerinin ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur.

Araştırmamızın sonuçları, Belinostat ve Romidepsin'in GBM tedavisi için alternatif bir potansiyel ajan olabileceğini, hem TRAIL ile birlikte hem de kemoterapötik ajanlarla birlikte tedavi yaklaşımı olarak araştırılabileceği fikrini desteklemektedir. Belinostat ve Romidepsin'in 24 saat ya da daha fazla sürelerde ve daha farklı dozlarda uygulanarak, GBM hücrelerindeki ilişkili moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca *in vitro* etkinin yanında, bu iki HDACi'nin de *in vivo* olarak denenmesi de, hem kan-beyin bariyerini aşmaları noktasında hem de biyolojik olarak meydana getirecekleri moleküler etkinin aydınlatılmasında oldukça önem arz etmektedir.

Belinostat ve Romidepsin'in GBM hücrelerinde TRAIL ile kombine olarak uygulanması ve apoptotik yolaktaki etkileri ilk kez doktora tez araştırmamızla gösterilmiştir. Bu nedenle, elde ettiğimiz veriler özgün olup, literatüre önemli katkı sağlayacak ve bu alanda yapılacak ileri çalışmalara zemin oluşturacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. **Expert Opin Investig Drugs** 2009; 18(8): 1061-1083.

Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta Neuropathol** 2015; 129: 829-848.

Alexiou GA, Tsamis KI, Kyritsis AP. Targeting Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL): A promising Therapeutic Strategy in Gliomas. **Semin Pediatr Neurol** 2015; 22: 35-39.

Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human TRAIL gene. **Cancer Biology & Therapy** 2012; 13(12): 1143-1151.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2017, **ACS**, Atlanta, 2017; s. 1-71.

Aron JL, Parthun MR, Marcucci G, Kitada S, Mone AP, Davis ME, Shen T, Murphy T, Wickham J, Kanakry C, Lucas DM, Reed JC, Grever MR, Byrd JC. Depsipeptide (FR901228) induces histone acetylation and inhibition of histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia cells concurrent with activation of caspase-8-mediated apoptosis and down-regulation of c-FLIP protein. **Blood** 2003; 102(2): 652-8.

Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 2003; 27: 199–214.

Ashkenazi, A, Herbst RS. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. **J. Clin. Invest** 2008; 118: 1979-1990.

Asklund T, Kvarnbrink S, Holmund C, Wibom C, Bergenheim T, Henriksson R, Hedman H. Synergistic killing of glioblastoma stem-like cells by bortezomib and HDAC inhibitors. **Anticancer Research** 2012; 32: 2407-2414.

Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters GJ, de Jong S, Kruyt FAE. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. **Cell Death and Differentiation** 2013; 20: 858-868.

Bachmann PS, Piazza RG, Janes ME, Wong NC, Davies C, Mogavero A, Bhadri VA, Szymanska B, Geninson G, Magistroni V, Cazzaniga G, Biondi A, Miranda-Saavedra D, Göttgens B, Saffery R, Craig JM, Marshall GM, Gambacorti-Passerini C, Pimanda JE, Lock RB. Epigenetic silencing of BIM in glucocorticoid poor-responsive pediatric acute

lymphoblastic leukemia, and its reversal by histone deacetylase inhibition. **Blood** 2010; 116(16): 3013-22.

Bagci-Onder T, Agarwal A, Flusberg D, Wanninger S, Sorger P, Shah K. Real-time imaging of the Dynamics of death receptors and therapeutics that overcome TRAIL resistance in tumors. **Oncogene** 2013; 32 (23): 2818-27.

Bagci-Onder T, Wakimoto H, Anderegg M, Cameron C, Shah K. A dual PI3K/mTOR inhibitor, PI-103, cooperates with stem cell-delivered TRAIL in experimental glioma models. **Cancer Res** 2011; 71 (1): 154-63.

Banan R, Hartmann C. The new WHO 2016 classification of brain tumors-what neurosurgeons need to know. **Acta Neurochir** 2017; 159: 403-418.

Bangert A, Cristofanon S, Eckhardt I, Abhari BA, Kolodziej S, Hacker S, Vellanki SHK, Lausen J, Debatin KM, Fulda S. Histone deacetylase inhibitors sensitize glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by c-myc-mediated downregulation of cFLIP. **Oncogene** 2012; 31: 4677-4688.

Bangert A, Hacker S, Cristofanon S, Debatin KM, Fulda S. Chemosensitization of glioblastoma cells by the histone deacetylase inhibitor MS-275. **Anti-Cancer Drugs** 2011; 22: 494-499.

Bayin NS, Modrek AS, Placantonakis DG. Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications. **World J Stem Cells** 2014; 6 (2): 230-238.

Bayram F. Glioblastomlarda Metil Guanin Metil Transferaz Promoter Bölgesinde Metilasyonun Polimeraz Zincir Reaksiyon Yöntemiyle Gösterilmesi, Klinik ve Histopatolojik Prognostik Faktörlerle İlişkisi. Uzmanlık Tezi, **Çukurova Üniversitesi Tıbbi Patoloji AD**, Adana, 2012, 76s.

Bezecny P. Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: pre-clinical and clinical experience. **Med. Oncol** 2014; 31: 985.

Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **J Neurooncol** 2012; 108: 11-27.

Blumenthal DT, Schulman S. Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. **Expert Rev Neurotherapeutics** 2005; 5(5): 683-690.

Bose P, Dai Y, Grant S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. **Pharmacol Ther** 2014; 143 (3): 323-36.

Butler LM, Liapis V, Bouralexis S, Welldon K, Hay S, Thaile M, Labrinidis A, Tilley WD, Findlay DM, Evdokiou A. The histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, overcomes resistance of human breast cancer cells to Apo2L/TRAIL. **Int J Cancer** 2006; 19, 944-954.

Chang L, Su J, Jia X, Ren H. Treating malignant glioma in Chinese patients: update on temozolomide. **Onco Targets and Therapy** 2014; 7: 235-244.

Chen CS, Weng SC, Tseng PH, Lin HP, Chen CS. Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the resuffling of protein

phosphatase 1 complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280 (46): 38879-38887.

Chen S, Dai Y, Pei XY, Grant S. Bim upregulation by histone deacetylase inhibitors mediates interactions with the Bcl-2 antagonist ABT-737: evidence for distinct roles for Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1. *Mol Cell Biol* 2009; 29(23): 6149-69.

Chiao MT, Cheng WY, Yang YC, Shen CC, Ko JL. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) causes tumor growth slowdown and triggers autophagy in glioblastoma stem cells. *Autophagy* 2013; 9 (10): 1509-1526.

Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010; 37: 299–310.

Chuang DM, Leng Y, Marinova Z, Kim HJ, Chiu CT. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci* 2009; 32(11): 591-601.

Cooper MC, Hausman RE. Hücre Moleküler Yaklaşım, (Çev. Ed: Atabey N, Kalay E, Sakızlı M), *İzmir Tıp Kitabevi*, İzmir, 2016, s.723-769.

Cornago M, Garcia-Alberich C, Blasco-Angulo N, Vall-Iaura N, Nager M, Herreros J, Cornella JX, Sanchis D, Llovera M. Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe. *Cell Death and Disease* 2014; 5: e1435.

Crespo I, Vital AL, Gonzales-Tablas M, del Carmen Patino M, Otero A, Lopes MC, de Oliveira C, Domingues P, Orfao A, Tabertero MD. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol* 2015; 185: 1820-1833.

Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 49–63.

Dai X, Zhang J, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, Kumar AP, Ahn KS, Sethi G. Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy. *Exp Biol Med* 2015; 240: 760-773.

Damaskos C, Valsami S, Kontos M, Spartalis E, Kalampokas T, Kalampokas E, Athanasiou A, Moris D, Daskalopoulou A, Davakis S, Tsouroufflis G, Kontzoglou K, Perrea D, Nikiteas N, Dimitroulis D. Histone deacetylase inhibitors: an attractive therapeutic strategy against breast cancer. *Anticancer Research* 2017; 37: 35-46.

Davids MS, Letai A. Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012; 30(25):3127–3135.

De Carvalho DD, Mello BP, Pereira WO, Amarante-Mendes GP. PRAME-EZH2-Mediated Regulation of TRAIL: A New Target for Cancer Therapy. *Current Molecular Medicine* 2013; 13: 296-304.

De Miguel D, Lemke J, Anel A, Walczak H, Martinez-Lostao L. Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death and Differentiation* 2016; 23: 733-747.

Deng J, Carlson N, Takeyama K, Dal Cin P, Shipp M, Letai A. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. **Cancer Cell** 2007; 12: 171–85.

De Wilt LHAM, Kroon J, Jansen G, de Jong S, Peters GJ., Kruyt FAE. Bortezomib and TRAIL: A perfect match for apoptotic elimination of tumour cells? **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 2013; 85: 363-372.

Dimberg LY, Anderson C K, Camidge, R., Behbakt K, Thorburn A, Ford HL. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. **Oncogene** 2013; 32: 1341-1350.

Diss E, Nalabothula N, Nguyen D, Chang E, Kwok Y, Carrier F. Vorinostat SAHA promotes hyper-radiosensitivity in wild type p53 human glioblastoma cells. **J Clin Oncol Res** 2014; 2 (1): 1-16.

Duprez L, Wirawan E, Berghe TV, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection** 2009; 11: 1050-1062.

Durmaz R, Vural M. Primer ve sekonder glioblastoma multiforme genetiği. **Türk Nöroşirürji Dergisi** 2007; 17(2): 80-90.

Dutta S, Ryan J, Chen TS, Kougentakis C, Letai A, Keating AE. Potent and specific peptide inhibitors of human pro-survival protein Bcl-xL. **J Mol Biol** 2015; 427: 1241–53.

Dzieren J, Beck JF, Sonnemann J. Differential responsiveness of human hepatoma cells versus normal hepatocytes to TRAIL in combination with either histone deacetylase inhibitors or conventional cytostatics. **Cancer Sci** 2008; 99: 1685-1692.

Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. **Int J Mol Sci** 2017; 18: 1414.

Ellis HP, Greenslade M, Powell B, Spiteri I, Sottoriva A, Kurian KM. Current Challenges in Glioblastoma: Intratumour Heterogeneity, Residual Disease, and Models to Predict Disease Recurrence. **Front Oncol** 2015; 5: 251.

Elmas L. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde *Kras* gen mutasyonlarının real-time PCR yöntemi ile tespiti ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkilerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, **Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Denizli, 2011, s. 91.

Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol** 2007; 35 (4): 495-516.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11, Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**, 2013. Erişim Adresi: <http://globocan.iarc.fr>, Erişim tarihi: 19.07.2017.

Fornara O. Towards understanding of human cytomegalovirus in glioblastoma. Thesis for Doctoral Degree, **Karolinska Institutet Department of Medicine**, Stockholm, 2016, 76p.

Forman D, Ferlay J, Stewart BW, Wild CP. "The global and regional burden of cancer", World Cancer Report 2014, Eds. Stewart BW, Wild CP, **WHO Press**, Lyon, 2014, s. 16-53.

Fulda S. Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). **Adv Exp Med Biol** 2014; 818: 167-80.

Gammoh N, Lam D, Puent C, Ganley I, Marks PA, Jiang X. Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. **PNAS** 2012; 109 (17): 6561-6565.

Giannini G, Cabri W, Fattorusso C, Rodriquez M. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives. **Future Med Chem** 2012; 4 (11): 1439-1460.

Gillespie S, Borrow J, Zhang XD, Hersey P. Bim plays a crucial role in synergistic induction of apoptosis by the histone deacetylase inhibitor SBHA and TRAIL in melanoma cells. **Apoptosis** 2006; 11(12): 2251-65.

Gimenez-Cassina A, Danial NN. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. **Trends Endocrinol Metab** 2015; 26 (4): 165-175.

Hacıkamiloğlu E, Gültekin M, Boztaş G, Dündar S, Utku EŞ, Kavak Ergün A, Sevinç A, Tütüncü S, Seymen E. Türkiye Kanser İstatistikleri, **T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu**, Ankara, 2017; s. 1-47.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**. 2011; 144(5):646–674.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100: 57–70.

Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. **J Clin Oncol** 2008; 26(25): 4189-99.

Hrabeta J, Stiborova M, Adam V, Kizek R, Eckschlager T. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review. **Biomed Pap Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub** 2014; 158 (2): 161-169.

Hsu CC, Chang WC, Hsu TI, Li JJ, Yeh SH, Wang JY, Liou JP, Ko CY, Chang KY, Chuang JY. Suberoylanilide hydroxamic acid represses glioma stem-like cells. **Journal of Biomedical Science** 2016; 23: 81.

Hyman G, Manglik V, Rousch JM, Verma M, Kinkebiel D, Banerjee HN. Epigenetic approaches in glioblastoma multiforme and their implication in screening and diagnosis. **Methods in Molecular Biology** 2014; 1238: 511-521.

Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. **J Med Life** 2009; 2: 386-393.

Inoue S, Harper N, Walewska R, Dyer MJS, Cohen GM. Enhanced Fas-associated death domain recruitment by histone deacetylase inhibitors is critical for the sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. **Mol Cancer Ther** 2009; 8 (11): 3088-97.

Inoue S, MacFarlane M, Harper N, Wheat LMC, Dyer MJS, Cohen GM. Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies. ***Cell Death and Differentiation*** 2004; 11: S193-S206.

Inoue S, Riley J, Gant TW, Dyer MJ, Cohen GM. Apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in leukemic cells is mediated by Bim and Noxa. ***Leukemia*** 2007; 21(8): 1773-82.

Jona A, Khaskhely N, Buglio D, Shafer JA, Derenzini E, Bollard CM, Medeiros LJ, Illes A, Ji Y, Younes A. The histone deacetylase inhibitor entinostat (SNDX-275) induces apoptosis in Hodgkin lymphoma cells and synergizes with Bcl-2 family inhibitors. ***Exp Hematol*** 2011; 39(10): 1007-1017.e1.

Jovcevska I, Kocevar N, Komel R. Glioma and glioblastoma – how much do we (not) know? (Review). ***Molecular and Clinical Oncology*** 2013; 1: 935-941.

Kasman L, Lu P, Voelkel-Johnson C. The histone deacetylase inhibitors depsipeptide and MS-275, enhance TRAIL gene therapy of LNCaP prostate cancer cells without adverse effects in normal prostate epithelial cells. ***Cancer Gene Therapy*** 2007; 14: 327-334.

Kısım A. (-)-Gossypol (AT-101) ve Rekombinant İnsan Apo2L/TRAIL'in Tekli ve Kombine Dozlarının Meme Kanseri Hücre Hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması., Yüksek Lisans Tezi, ***Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Manisa, 2010, 63s

Khurana VG, Teo C, Kundi M, Hardell L, Carlberg M. Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiological data. ***Surgical Neurology*** 2009; 72: 205-215.

Kim L, Glantz M. Chemotherapeutic options for primary brain tumors. ***Curr Treat Options Oncol*** 2006; 7(6): 467-78.

Kim EH, Kim HS, Kim SU, Noh EJ, Lee JS, Choi KS. Sodium butyrate sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis through inhibition of Cdc2 and the subsequent downregulation of survivin and XIAP. ***Oncogene*** 2005; 24: 6877-6889.

Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. ***Cancer*** 2010; 9: 135.

Kreth S, Thon N, Kreth FW. Epigenetics in human gliomas. ***Cancer Letters*** 2014; 342: 185-192.

Krex D, Link B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, Schackert G. Long-term survival with glioblastoma multiforme. ***Brain*** 2007; 130: 2596-2606.

Kuijlen JM, Bremer E, Mooij JJ, den Dunnen WF, Helfrich W. Review: On TRAIL for malignant glioma therapy? ***Neuropathol Appl Neurobiol*** 2010; 36 (3): 168-82.

Kuijlen JM, Mooij JJ, Platteel I, Hoving EW, van der Graaf WT, Span MM, Hollema H, den Dunnen WF. TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for



survival in patients with a primary glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2006; 78 (2): 161-71.

Kusaczuk M, Kretowski R, Stypulkowska A, Cechowska-Pasko M. Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor-belinostat-in glioblastoma cell lines: a preliminary report. *Invest New Drugs* 2016; 34: 552-564.

Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, Forrest WF, Pujara K, Carrillo JA, Pandita A, Ellingson BM, Bowers CW, Soriano RH, Schmidt NO, Mohan S, Yong WH, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape KD, Mischel PS, Liao LM, Escovedo CJ, Chen W, Nghiemphu PL, James CD, Prados MD, Westphal PM, Lamszus K, Cloughesy T, Phillips HS. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4482-4490.

Lakshmaiah KC, Jacob LA, Aparna S, Lokanatha D, Saldanha SC. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2014; 10 (3): 469-478.

Lee DH, Ryu H-W, Won H-R, Kwon SH. Advances in epigenetic glioblastoma therapy. *Oncotarget* 2017; 8 (11): 18577-18589.

Lee P, Murhpy B, Miller R, Menon V, Banik NL, Giglio P, Lindhorst SM, Varma AK, Vandergrift WA, Patel SJ, Das A. Mechanisms and clinical significance of histone deacetylase inhibitors: epigenetic glioblastoma therapy. *Anticancer Res* 2015; 35(2): 615-25.

Lemke J, von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death and Differentiation* 2014; 21: 1350-1364.

Lim B, Allen JE, Prabhu VV, Talekar MK, Finnberg NK, El-Deiry WS. Targeting TRAIL in the treatment of cancer: new developments. *Expert Opin Ther Targets* 2015; 19: 1171-1185.

Losson H, Schneckeburger M, Dicato M, Diederich M. Natural compound histone deacetylase inhibitors (HDACi): synergy with inflammatory signaling pathway modulators and clinical applications in cancer. *Molecules* 2016; 21: 1608.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007; 114: 97-109.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131: 803-820.

Ludwig K, Kornblum HI. Molecular markers in glioma. *J Neurooncol* 2017; (Epub ahead of print).

Malzkorn B, Reifenberger G. Practical implications of integrated glioma classification according to the World Health Organization classification of tumors of the central nervous system 2016. *Curr Opin Oncol* 2016; 28(6): 494-501.

Manal M, Chandrasekar MJN, Priya JG, Nanjan MJ. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. *Bioorganic Chemistry* 2016; 67: 18-42.

Manton CA, Johnson B, Singh M, Bailey CP, Bouchier-Hayes L, Chandra Y. Induction of cell death by the novel proteasome inhibitor marizomib in glioblastoma in vitro and vivo. **Scientific Reports** 2016; 6: 18953.

Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Giuseppe Avvisati, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: Mechanism of action and related DNA repair systems. **Pharmacol Res.** 2007; 56 (4): 275-87.

Marosi C, Preusser M. Milestones of the last 10 years CNS cancer. **Memo** 2017; 10: 18-21.

Matthews GM, Lefebure M, Doyle MA, Shortt J, Ellul J, Chesi M, Banks K-M, Vidacs E, Faulkner D, Atadja P, Bergsagel PL, Johnstone RW. Preclinical screening of histone deacetylase inhibitors combined with ABT-737, rhTRAIL/MD5-1 or 5-azacytidine using syngeneic Vk\*MYC multiple myeloma. **Cell Death and Disease** 2013; 4: e798.

McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2013; 5 (4): a008656.

Mert U, Şanlıoğlu AD. Intracellular localization of DR5 and related regulatory pathways as a mechanism of resistance to TRAIL in cancer. **Cell Mol Life Sci** 2017; 74 (2): 245-255.

Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T, Akiyama M, Chauhan D, Munshi N, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Richon VM, Marks PA, Anderson KC. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 13;101(2): 540-5.

Morales JC, Ruiz-Magana MJ, Carranza D, Ortiz-Ferron G, Ruiz-Ruiz C. HDAC inhibitors with different gene regulation activities depend on the mitochondrial pathway for the sensitization of leukemic T cells to TRAIL-induced apoptosis. **Cancer Letters** 2010; 297: 91-100.

Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJS. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. **Cancer Res** 2000; 60(4): 847-53.

Nagarajan RP, Costello F. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. **Seminars in Cancer Biology** 2009; 19: 188-197.

Nagy A, Eder K, Selak MA, Kalman B. Mitochondrial energy metabolism and apoptosis regulation in glioblastoma. **Brain Res** 2015, 1595: 127-142.

Nencha U, Rahimian A, Giry M, Sechi A, Muktari K, Polivka M, Schmitt Y, Di Stefano AL, Alentorn A, Labussiere M, Sanson M. TERT promoter mutations and rs2853669 polymorphism: prognostic impact and interactions with common alterations in glioblastomas. **J Neurooncol** 2016; 126(3): 441-6.

Nishikawa R. Standart Therapy for Glioblastoma – A Review of Where We Are. **Neurol Med Chir (Tokyo)** 2010; 50: 713-719.

Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, Kim YH, Kleihues P, Ohgaki H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 2013; 126(6): 931-7.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007; 170(5): 1445-53.

Ohgaki H, Kleihues P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19(4): 764-72.

Oikonomou E, Pintzas A. The TRAIL of oncogenesis to apoptosis. *BioFactors* 2013; 39(4): 343-354.

Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011; 351: 41-58.

Olar A, Aldape KD. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol* 2014; 232: 165-177.

Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas. *JAMA* 2013; 310(17): 1842-50.

Orringer D, Lau D, Khatri S, Zamora-Berridi GJ, Zhang K, Wu C, Chaudhary N, Sagher O. Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival. *J Neurosurg* 2012; 117: 851-859.

Orzan F, Pellegatta S, Poliani PL, Pisati F, Caldera V, Menghi F, Kapetis D, Marras C, Schiffer D, Finocchiaro. Enhancer of Zeste 2 (EZH2) is up-regulated in malignant gliomas and in glioma stem-like cells. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2011; 37: 381-394.

Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Krucho C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro-Oncology* 2016; 18: v1-v75.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012; 45: 487-498.

Pont LMEB, Naipal K, Kloezeman JJ, Venkatesan S, van den Bent M, van Gent DC, Dirven CMF, Kanaar R, Lamfers MLM, Leenstra S. DNA damage response and anti-apoptotic proteins predict radiosensitization efficacy of HDAC inhibitors SAHA and LBH589 in patient-derived glioblastoma cells. *Cancer Lett* 2015; 356 (2 Pt B): 525-35.

Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813 (1): 238-259.

Prasad G, Haas-Kogan DA. Radiation induced gliomas. *Expert Rev Neurother* 2009; 9(10): doi:10.1002/pmic.200800802.

Premkumar DR, Jane EP, Agostino NR, DiDomenico JD, Pollack IF. Bortezomib-induced sensitization of malignant human glioma cells to vorinostat-induced apoptosis depends on reactive oxygen species production, mitochondrial dysfunction, Noxa upregulation, Mcl-1 cleavage, and DNA damage. *Mol Carcinog* 2013; 52(2):118-33.

Quintavalle C, Donnarumma E, Iaboni M, Roscigno G, Garofalo M, Romano G, Fiore D, De Marinis P, Croce CM, Condorelli G. Effect of mir-21 and mir-30b/c on TRAIL-induced apoptosis in glioma cells. **Oncogene** 2012; 32: 4001-4008.

Ramirez YP, Weatherbee JL, Wheelhouse RT, Ross AH. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. **Pharmaceuticals** 2013; 6: 1475-1506.

Rasmussen RD, Gajjar MK, Jensen KE, Hamerlik P. Enhanced efficacy of combined HDAC and PARP targeting in glioblastoma. **Mol Oncol** 2016; 10 (5): 751-763.

Rastogi RP, Sinha R, Sinha RP. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. **EXCLI Journal** 2009; 8: 155-181.

Redzic JS, Ung TH, Graner MW. Glioblastoma extracellular vesicles: reservoirs of potential biomarkers. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine** 2014; 7: 65-77.

Richter-Larrea JA, Robles EF, Fresquet V, Beltran E, Rullan AJ, Aquirre X, Calasanz M J, Panizo C, Richter JA, Hernandez JM, Roman-Gomez J, Prosper F, Martinez-Climent JA. Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma. **Blood** 2010; 116(14): 2531-2542.

Rosato RR, Almenara JA, Kolla SS, Maggio SC, Coe S, Gimenez MS, Dent P, Grant S. Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileukemic interactions. **Mol Cancer Ther** 2007; 6(2): 692-702.

Rosato RR, Maggio SC, Almenara JA, Payne SG, Atadja P, Spiegel S, Dent P, Grant S. The histone deacetylase inhibitor LAQ824 induces human leukemia cell death through a process involving XIAP down-regulation, oxidative injury, and the acid sphingomyelinase-dependent generation of ceramide. **Mol Pharmacol** 2006; 69(1): 216-25.

Sarcar B, Kahali S, Chinnaiyan P. Vorinostat enhances the cytotoxic effects of the topoisomerase I inhibitor SN38 in glioblastoma cell lines. **J Neurooncol** 2010; 99: 201-207.

Sarkar C, Jain A, Suri V. Current concepts in pathology and genetics of gliomas. **Indian Journal of Cancer** 2009; 46 (2): 108-119.

Sathornsumetee S ve Rich JN. Designer Therapies for Glioblastoma Multiforme. **Ann. N.Y. Acad Sc.** 2008; 1142: 108-132.

Sawa H, Murakami H, Kumagai M, Nakasato M, Yamauchi S, Matsuyama N, Tamura Y, Satone A, Ide W, Hashimoto I, Kamada H. Histone deacetylase inhibitor, FK228, induces apoptosis and suppresses cell proliferation of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. **Acta Neuropathol** 2004; 107: 523-531.

Senbabaoglu F, Cingoz A, Kaya E, Kazancioglu S, Lack NA, Acilan C, Bagci-Onder T. Identification of Mitoxantrone as a TRAIL-sensitizing agent for Glioblastoma Multiforme. **Cancer Biology & Therapy** 2016; 17 (5): 546-557.

Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 2009; 49: 223-241.

Shankar S, Singh TR, Fandy TE, Luetrakul T, Ross DD, Srivastava RK. Interactive effects of histone deacetylase inhibitors and TRAIL on apoptosis in human leukemia cells: involvement of both death receptor and mitochondrial pathways. *Int J Mol Med* 2005; 16(6):1125-38.

Sharifi S. U118 ve U87 glioblastoma hücre serilerinin sitogenetik olarak incelenmesi ve Taspine'nin bu hücre serileri üzerindeki antiproliferatif, antianjiyogenik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 2014, 88s.

Shen L, Orillion A, Pili R. Histone deacetylase inhibitors as immunomodulators in cancer therapeutics. *Epigenomics* 2016; 8 (3): 415-28.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67: 7-30.

Selvarajoo K. A systems biology approach to overcome TRAIL resistance in cancer treatment. *Prog Biophys Mol Biol* 2017; 128: 142-154.

Shabason JE, Tofilon PJ, Camphausen K. Grand Rounds at the National Institutes of Health: HDAC inhibitors as Radiation Modifiers, from Bench to Clinic. *J Cell Mol Med* 2011; 15(12): 2735-2744.

Singh MM, Johnson B, Venkatarayan A, Flores ER, Zhang J, Su X, Barton M, Lang F, Chandra J. Preclinical activity of combined HDAC and KDM1A inhibition in glioblastoma. *Neuro-Oncology* 2015; 17 (11): 1463-1473.

Singh MM, Manton CA, Bhat KP, Tsai WW, Aldape K, Barton MC, Chandra J. Inhibition of LSD1 sensitizes glioblastoma cells to histone deacetylase inhibitors. *Neuro-Oncology* 2011; 13 (8): 894-903.

Slingerland M, Guchelaar H-J, Gelderblom H. Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anti-Cancer Drugs* 2014; 25: 140-149.

Spinelli V, Chinot O, Cabaniols C, Giorgi R, Alla P, Lehucher-Michel MP. Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France. *Presse Med* 2010; 39: e35-e44.

Spyropoulou A, Piperi C, Adamopoulos C, Papavassiliou AG. Deregulated chromatin remodeling in the pathobiology of brain tumors. *Neuromol Med* 2013; 15: 1-24.

Staberg M, Michaelsen SR, Rasmussen RD, Villingshoj M, Poulsen HS, Hamerlik P. Inhibition of histone deacetylases sensitizes glioblastoma cells to lomustine. *Cell Oncol (Dordr)* 2017; 40 (1): 21-32.

Stuckey DW, Shah K. TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* 2013; 19(11): 685-694.

Sun P, Xia S, Lal B, Eberhart CG, Quinones-Hinojosa A, Maciaczyk J, Matsui W, Dimeco F, Piccirillo SM, Vescevi AL, Laterra J. *DNER*, an epigenetically modulated gene, regulates glioblastoma-derived neurosphere cell differentiation and tumor propagation. *Stem Cells* 2009; 27 (7): 1473-1486.

Sümer C. Glioblastoma multiforme genetiğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, **Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Trabzon, 2012, 73s.

Tan J, Zhuang L, Jiang X, Yang KK, Karuturi KM, Yu Q. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a direct target of E2F1 and contributes to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through positive feedback regulation of E2F1 apoptotic activity. *J Biol Chem* 2006; 281(15): 10508-15.

Tang Y, Yacoub A, Hamed HA, Poklepovic A, Tye GW, Grant S, Dent P. Sorafenib and HDAC inhibitors synergize to kill CNS tumor cells. *Cancer Biology & Therapy* 2012; 13 (7): 567-574.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23(10): 1985-1996.

Thanh-Trang V, Letai A. BH3-Only Proteins and Their Effects on Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013; 687: 49–63.

Triazene compounds: Mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res* 2007; 56 (4): 275-87.

Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells. *Front Oncol* 2015; 5: 69.

Tsamis KI, Alexiou GA, Vartholomatos E, Kyritsis AP. Combination treatment for glioblastoma cells with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and oncolytic adenovirus delta-24. *Cancer Investigation* 2013; 31: 630-638.

Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P, Roberts L, Tahir SK, Xiao Y, Yang X, Zhang H, Fesik S, Rosenberg SH, Elmore SW. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008; 68(9): 3421-8.

Urbanska K, Sokolowska J, Szmidi M, Sysa P. Glioblastoma multiforme – an overview. *Contemp Oncol (Pozn)* 2014; 18 (5): 307-312.

VanOosten RL, Moore JM, Karacay B, Griffith TS. Histone deacetylase inhibitors modulate renal cell carcinoma sensitivity to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis by enhancing TRAIL-R2 expression. *Cancer Biol Ther* 2005; 4 (10): 1104-12.

Venza I, Visalli M, Oteri R, Teti D, Venza M. Class I-specific histone deacetylase inhibitor MS-275 overrides TRAIL-resistance in melanoma cells by downregulating c-FLIP. *Int Immunopharmacol* 2014; 21(2): 439-46.

Ververis K, Hiong A, Karagiannis TC, Licciardi PV. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics: Targets and Therapy* 2013; 7: 47-60.

Voelkel-Johnson C. TRAIL-mediated signaling in prostate, bladder and renal cancer. *Nat Rev Urol* 2011; 8: 417-427.

von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer* 2017; 17: 352-366.

von Neubeck C, Seidlitz A, Kitzler HH, Beuthien-Baumann B, Krause M. Glioblastoma multiforme: emerging treatments and stratification markers beyond new drugs. **Bri J Radiol** 2015; 88: 20150354.

Walzack H. Death Receptor-Ligand Systems in Cancer, Cell Death, and Inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2013; 5 (5): a008698.

WEB\_1. Dünya Sağlık Örgütü internet sitesi. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, (son güncelleme tarihi: 2017, alındığı tarih: 19.07.2017).

WEB\_2. National Cancer Institute internet sitesi. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/brain.html>, (son güncelleme tarihi: 2017, alındığı tarih: 23.04.2017).

WEB\_3. American Brain Tumor Association internet sitesi. <http://www.abta.org/brain-tumorinformation/typesoftumors/glioblastoma.html?referrer=https://www.google.com.tr/>, (son güncelleme tarihi: 2014, alındığı tarih: 23.04.2017).

WEB\_4. Kinesis internet sitesi. <http://kinesis-usa.com/brand-general-consumables-counting-chamber-blaubrand-neubauer-improved-ivd-w-o-spring-clips-double-rul-bright-line-717810.html>, (son güncelleme tarihi: 2017, alındığı tarih: 25.04.2017).

WEB\_5. Celeromics internet sitesi. <http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/neubauer-chamber-cell-concentration.php>, (alındığı tarih: 23.04.2017).

WEB\_6. Promega İnternet Sitesi, [https://cn.promega.com/-/media/images/resources/figures/1150011599/11542tc\\_1320x1261.jpg?h=1261&la=en&w=1320](https://cn.promega.com/-/media/images/resources/figures/1150011599/11542tc_1320x1261.jpg?h=1261&la=en&w=1320), (alındığı tarih: 23.04.2017).

WEB\_7. Dojindo internet sitesi, <http://www.dojindo.eu.com/store/p/833-Annexin-V-FITC-Apoptosis-Detection-Kit.aspx>, (alındığı tarih: 25.04.2017).

WEB\_8. Miltenyibiotec internet sitesi, <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/mac-flow-cytometry/reagents/support-reagents/annexin-v-fitc-kit.aspx>, (alındığı tarih: 25.04.2017).

Weinberg RA. The Biology of Cancer, Garland Science, Taylor & Francis, **LLC**, New York, 2007, s.22-63.

Weller M, Wick W, Hegi ME, Stupp R, Tabatabai G. Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma? **Future Oncol** 2010; 6(9): 1407-1414.

Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. **N Engl J Med** 2008; 359: 492-507.

West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. **J Clin Invest** 2014; 124 (1): 30-39.

Wiegman AP, Alsop AE, Bots M, Cluse LA, Williams SP, Banks KM, Ralli R, Scott CL, Frenzel A, Villunger A, Johnstone RW. Deciphering the molecular events necessary for synergistic tumor cell apoptosis mediated by the histone deacetylase inhibitor vorinostat and BH3 mimetic ABT-737. **Cancer Res** 2011; 71(10): 3603-15.

- Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30 (1): 87.
- Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology* 2002; 4: 278-299.
- Wu Y, Dong L, Bao S, Wang M, Yun Y, Zhu R. FK228 augmented temozolomide sensitivity in human glioma cells by blocking PI3K/AKT/MTOR signal pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 84: 462-469.
- Yang JK. FLIP as an Anti-Cancer Therapeutic Target. *Yonsei Med J* 2008; 49 (1): 19-27.
- Yang R, Wu Y, Wang M, Sun Z, Zou J, Zhang Y, Cui H. HDAC9 promotes glioblastoma growth via TAZ-mediated EGFR pathway activation. *Oncotarget* 2015; 6:7644-7656.
- Yang P, Zhang W, Wang Y, Peng X, Chen B, Qiu X, Li G, Li S, Wu C, Yao K, Li W, Yan W, Li J, You Y, Chen CC, Jiang T. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget* 2015; 6(38): 40896-40906.
- Yin D, Ong JM, Jinwei H, Desmond JC, Kawamata N, Konda BM, Black KL, Koeffler HP. Suberoylanilide Hydroxamic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor: Effects on Gene Expression and Growth of Glioma Cells *In vitro* and *In vivo*. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (3): 1045-1052.
- Zhang V, Yang C, Feldman MJ, Wang H, Pang Y, Maggio DM, Zhu D, Nesvick CL, Dmitriev P, Bullova P, Chittiboina P, Brady RO, Pacak K, Zhuang Z. Vorinostat suppresses hypoxia signaling by modulating nuclear translocation of hypoxia inducible factor 1 alpha. *Oncotarget* 2017, Epub ahead of print.
- Zhang H, Shang Y-P, Chen HY, Li J. Histone deacetylase function as novel potential therapeutic targets for cancer. *Hepatology Research* 2017; 47: 149-159.
- Zhang J, Zhong Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71 (20): 3885-3901.
- Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, Yu Q. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(44):16090-5.
- Zorzan M, Giordan E, Redaelli M, Caretta A, Mucignat-Caretta C. Molecular targets in glioblastoma. *Future Oncol* 2015; 11(9): 1407-1420.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Levent ELMAS 1984 yılında İzmir’de doğdu. İlkokulu babasının görev yeri nedeniyle Balıkesir İli’ne bağlı Erdek İstiklal İlköğretim Okulu’nda, ortaokulu ve lise eğitimini yine aynı ile bağlı Bandırma Anadolu Lisesi’nde tamamladı. Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü 2004 yılında kazanmış ve bu bölümden 2008 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamış ve bu bölümden 2011 yılında “Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde *Kras* gen mutasyonlarının gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile tespiti ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkisinin belirlenmesi” isimli yüksek lisans bitirme tezini savunarak mezun olmaya hak kazanmıştır. Aynı bölümde 2011 yılının Eylül ayında doktora eğitimine başlamıştır. 2012 yılında Zuhale ELMAS ile hayatını birleştirmiştir. Evli ve bir çocuk babasıdır.