

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEDGEHOG YOLAĞINDA YER ALAN SMO
İNHİBİTÖRLERİNİN PTCH1 İNHİBİTÖRLERİ İLE KOMBİNE
KULLANIMININ İN VİTRO HÜCRE PROLİFERASYON VE
İNVAZYONUNA ETKİSİ

Aslıhan KARADAĞ

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

TRANSLASYONEL ONKOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

TEMMUZ 2021

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2018970115

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEDGEHOG YOLAĞINDA YER ALAN SMO
İNHİBİTÖRLERİNİN PTCH1 İNHİBİTÖRLERİ İLE KOMBİNE
KULLANIMININ İN VİTRO HÜCRE PROLİFERASYON VE
İNVAZYONUNA ETKİSİ**

Aslıhan KARADAĞ

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

TRANSLASYONEL ONKOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Yasemin BAŞBINAR

**Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2020.KB.SAG.021 proje numarası ile desteklenmiştir.**

İZMİR

TEMMUZ 2021

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “Hedgehog Yolağında Yer Alan Smo İnhibitörlerinin Ptch1 İnhibitörleri İle Kombine Kullanımının *İn vitro* Hücre Proliferasyon Ve İnvazyonuna Etkisi” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Aslıhan KARADAĞ

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2 Araştırmanın Amacı	1
1.3 Araştırmanın Hipotezleri	2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Hedgehog Sinyal Yolağı	3
2.2.1 Hedgehog Sinyal Yolağında Görev Alan Protein, Ligand Ve Genler	3
2.1.2 Non-Kanonik Hedgehog Sinyal Yolu	7
2.1.3 Hedgehog Sinyal Yolağının DNA Tamir Mekanizmasındaki Rolü	7
2.2. Hedgehog Sinyal Yolağı Ve Etkileşimde Olduğu Sinyal Yolakları	8
2.3 Hedgehog Yolak İnhibitör ve Antagonistleri.....	11
2.3.1 Vismodegib	13
2.3.2 Robotnikinin.....	14
2.4 Glioblastoma	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1 Araştırmanın Tipi.....	17
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	17
3.3 Araştırmanın Örneklemi.....	17
3.4 Çalışma Materyali	17

3.5 Araştırmanın Değişkenleri	17
3.6 Veri Toplama Araçları	17
3.6.1 Hücre Kültürü.....	19
3.6.2 Hücrelerin Robotnikinin ve Vismodegib ile Muamelesi	20
3.6.3 WST-1 Spektrofotometrik Hücre Proliferasyon/Canlılık Testi	20
3.6.4 Gen Ekspresyon Analizi [Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time qPCR)]	21
3.6.5 Yara İyileşmesi.....	24
3.6.6. Gerçek Zamanlı Hücre İnvazyon Analizi	25
3.6.7 Proliferasyon İmmunfloresan Boyama (Ki-67 Boyama)	26
3.6.8 Sitoiskelet Elemanları İmmunfloresan Boyama (Phalloidin Boyama)	27
3.6.9 In Silico İlaç Benzerlik Analizleri.....	28
3.7 Araştırma Planı.....	29
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi	30
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları	30
3.10 Etik Kurul Onayı	30
4. BULGULAR	31
4.1 U87-MG Glioblastoma Hücrelerinin Kültür Edilmesi ve Morfolojilerinin Gözlemlenmesi.....	31
4.2. U87-MG Glioblastoma Hücrelerinin Robotnikinin ve Vismodegib ile Kültür Edilmesi ve Morfolojilerinin Gözlenmesi.....	31
4.3. İnhibitör Uygulamaları Sonucu Hücre Proliferasyon Analizleri ve Canlılıklarının Değerlendirilmesi.....	32
4.4 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizlerinin Sonuçları	37
4.5 Yara İyileşmesi Modeli ile Oluşturulmuş Hücre Migrasyon Analizlerinin Sonuçları	41

4.6 Gerçek Zamanlı Hücre İnvazyon Analizlerinin Sonuçları.....	44
4.7 İmmunfloresan Boyama ile Hücre Proliferasyon Proteini ve Sitoiskelet Elemanlarının Görüntülenmesi ve Görüntü Analizlerinin Sonuçları.....	48
4.8 In Silico İlaç Benzerlik Analizleri	51
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
7. KAYNAKLAR	65
8. EKLER.....	70



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hedgehog sinyal yolunda nihai sonuç olarak elde edilen bir transkripsiyon faktörü olan Gli1 nukleusa geçerek proliferasoyanla ilişkili olduğu bilinen bazı gen bölgelerine ait tablo.....	5
Tablo 2. Hh yolu inhibitörleri.....	12
Tablo 3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	17
Tablo 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ısı döngüsü	23
Tablo 5. Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan RT-qPCR’da kullanılan primer listesi.....	24
Tablo 6. WST-1 analizi sonrası robotnikinin molekülüne ait alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı istatistik verileri.....	34
Tablo 7. WST-1 analizi sonrası vismodegib molekülüne ait alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı istatistik verileri.....	35
Tablo 8. WST-1 analizi sonrası farklı dozlarda uygulanan robotnikinin ve vismodegib moleküllerinin kombinasyon uygulamalarına ait alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı istatistik verileri.....	36
Tablo 9. Robotnikinin ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin gerçek zamanlı qPCR analizi sonrası elde edilen verilerin kontrol geni olan GAPDH baz alınarak $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerlerinin oluşturulduğu relatif mRNA ekspresyon istatistik verileri.	38
Tablo 10. Vismodegib ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin gerçek zamanlı qPCR analizi sonrası elde edilen verilerin kontrol geni olan GAPDH baz alınarak $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerlerinin oluşturulduğu relatif mRNA ekspresyon istatistik verileri.....	40
Tablo 11. U87-MG hücre hattında yapılan migrasyon analizinin 48. saatine ait %Yara kapanma verilerinin istatistiksel anlamlılık sonuçlarına ait oluşturulan tablo	43
Tablo 12. U87-MG hücrelerinin zamana bağlı alınan invazyon ölçümleri sonucu elde edilen 24-48-72-100. saatlerin istatistiksel anlamlılık sonuçlarına ait oluşturulan tablo	47
Tablo 13. U87-MG hücre hattı ile yapılan hücre iskeleti (phaloidin) boyamasına ait istatistiksel anlamlılık tablosu	49
Tablo 14. U87-MG hücre hattı ile yapılan Ki-67 hücre proliferasyon belirteç boyamasına ait istatistiksel anlamlılık tablosu.....	50

Tablo 15. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerinin biyo-uygunluk parametrelerinde optimal aralık tablosu.....	53
Tablo 16. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerine ait fizikokimyasal özellikler	55
Tablo 17. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerine ait lipofiliklik özellikleri.....	55
Tablo 18. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerine ait suda çözünürlük özellikleri	56
Tablo 19. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerine ait farmakokinetik özellikler	57
Tablo 20. Robotnikinin ve vismodegib moleküllerinin ilaç benzerlik kurallarına uygunluğu.....	57
Tablo 21. Robotnikinin ve vismodegib moleküllerinin medikal kimya özellikleri ..	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hedgehog sinyal yolu şematik gösterimi.....	6
Şekil 2. Kanserde yol alan yolakların tümünün gösterimi (50)	11
Şekil 3. Hemocytometer sayım yapılan kareleri (Toplam görüş sahası) (65).....	20
Şekil 4. Üst kuyucukların tabanına (upper chamber) serumsuz kültür ortamı içinde seyreltilen matrijel ve yine serumsuz kültür ortamında hazırlanan hücreler ve ilaç eklenir, alt kuyucuklara (bottom chamber) %10 FBS içeren kültür ortamı koyulur. Hücrelerin kemoatraktana karşı göçü iki kısım arasında bulunan altın elektrotlarda oluşan empedans değişimine göre ölçülür.	26
Şekil 5. U87-MG hücrelerinin yüzeye tutunduktan sonra alınan görüntü (10x), Ölçek 100 µm'dir.....	31
Şekil 6. A) 100 µM Robotnikinin ile muamele edilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü, molekülün çözünme problemi oklarla gösterilmiştir, artan dozlarda artan çözelti kalıntıları tespit edilmiştir. B) 100 µM Vismodegib ile muamele edilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü, molekülde çözünme problemi olmadığı mikroskopik görüntü ile gösterilmiştir. Ölçek 100 µm'dir.	32
Şekil 7. 48 saat boyunca U87-MG hücre hattı üzerinde 2-25-50-75 µM dozlarda uygulanan robotnikinin molekülünün WST-1 analizi sonrası alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı grafiği. İstatistiksel anlamlılık testleri non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. p<0,05 olarak seçilmiştir.	33
Şekil 8. 48 saat boyunca U87-MG hücre hattı üzerinde 10-25-50-100 µM dozlarda uygulanan vismodegib molekülünün WST-1 analizi sonrası alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı grafiği. İstatistiksel anlamlılık testleri non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. p<0,05 olarak seçilmiştir.	34
Şekil 9. 48 saat boyunca U87-MG hücre hattı üzerinde farklı dozlarda uygulanan robotnikinin ve vismodegib moleküllerinin WST-1 analizi sonrası alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı grafiği. Kombinasyon 1: Robotnikinin 25 µM+Vismodegib 50 µM, Kombinasyon 2: Robotnikinin 50 µM+Vismodegib 25 µM. İstatistiksel anlamlılık testleri non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. p<0,05 olarak seçilmiştir.	36

Şekil 10. Farklı dozlarda robotnikinin uygulanan U87-MG hücre hattında kontrol geni olan GAPDH baz alınarak $\Delta/\Delta Ct$ değerine bağlı olarak bulunan relatif mRNA ekspresyon grafiği	38
Şekil 11. Farklı dozlarda vismodegib uygulanan U87-MG hücre hattında kontrol geni olan GAPDH baz alınarak $\Delta/\Delta Ct$ değerine bağlı olarak bulunan relatif mRNA ekspresyon grafiği	39
Şekil 12. U87-MG hücreleri ile yapılan migrasyon analizinin (yara kapanması) saate bağlı görüntüleri, Ölçek 100 μm 'dir.	41
Şekil 13. 0. saat baz alınarak hesaplanan 24. saate ait yara kapanma grafiği.....	42
Şekil 14. 0. saat baz alınarak hesaplanan 48. saate ait yara kapanma grafiği.....	43
Şekil 15. Zamana bağlı invaziv karakterdeki hücre yoğunluğu gösterilmiştir. Kontrol grubu normal hücre kültür ortamında büyütülen hücrelerden oluşmaktadır ve grafikte yeşil ile gösterilmiştir.....	45
Şekil 16. U87-MG hücrelerinin zamana bağlı alınan invazyon ölçümleri sonucu elde edilen 24-48-72-100. saatlerin sonuçlarına ait oluşturulan bar grafiği. İlaç uygulaması yapılan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırılarak non-parametrik bir test olan Mann Withney U testi uygulanmıştır. İstatiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ seçilmiştir.....	45
Şekil 17. U87-MG hücre hattı ile yapılan hücre iskeleti (phaloidin) boyama grafiği	48
Şekil 18. U87-MG hücre hattı ile yapılan Ki-67 hücre proliferasyon belirteç boyama grafiği.....	50
Şekil 19. U87-MG hücre hattı ile yapılan Phalloidin ve Ki-67 boyamalarının Dapi ile alınan görüntüleri. Ölçek 100 μm 'dir.	51
Şekil 20. A) Robotnikinin molekülünün molekül yapısı; B) Robotnikinin molekülüne ait biyo-uygunluk radarı. Pembe ile belirtilen aralık biyoygunluk özelliklerine göre optimal aralıkları göstermektedir, robotnikinin molekülünün tüm özelliklerinin değerleri optimal aralıktadır.	51
Şekil 21. A) Vismodegib molekülünün molekül yapısı; B) Vismodegib molekülüne ait biyo-uygunluk radarı. Pembe ile belirtilen aralık biyoygunluk özelliklerine göre optimal aralıkları göstermektedir, insaturation (doygunluk) değerinin optimal aralığını belirleyen parametre, sp3 hibridizasyonundaki karbon fraksiyon sayısı >0.25 olmasıdır. Vismodegib molekülünde bu değer 0.05 olması nedeniyle optimal aralıktadır.	

değildir. Vismodegib molekülü biyo-uygunluk radarında yer alan diğer özelliklerde optimal aralıklara girmiştir..... 52

Şekil 22. WLOGP-TPSA grafiği ile elde edilen BOILED-Egg tablosu, beyaz alan molekülün gastrointestinal sistemde absorpsiyonunun, sarı alan ise molekülün kan beyin bariyerinden geçiş yeteneğini belirtir. 52

Şekil 23. A) Robotnikinin molekülünün hedef tahmin sıralamaları, B) Vismodegib molekülünün hedef tahmin sıralamaları, C) Robotnikinin molekülüne ait hedef tahmin sınıflandırmaları, D) Vismodegib molekülüne ait hedef tahmin sınıflandırmaları.... 54



SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC: American Type Culture Collection

BCC: Bazal hücreli karsinom

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EMT: Epitelyal-mezenkimal dönüşüm

FBS: Fetal sığır serumu

GBM: Glioblastoma Multiforme

Gli: Glioma ilişkili onkogen ailesi çinko parmak proteini

Hh: Hedgehog

IC50 : İnhibitör konsantrasyon 50 (%50)

KBB: Kan beyin bariyeri

PBS: Phosphate Buffered Saline (Fostat dengeleme tamponu)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

pH: Power of hydrogen

PTCH: Patched

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

RNA: Ribonükleik asit

ROB: Robotnikinin

Shh: Sonic Hedgehog

Smo: Smoothened

Sufu: Hedgehog sinyali negatif regülatörü

TBE: Tris / Borat / EDTA tamponu

ViS: Vismodegib

WNT: Wingless

WST: 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum

%: Yüzde

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

mm: Milimetre

µm: Mikrometre

mM: Milimolar

µM: Mikromolar

Dk: Dakika

C°: Santigrat Derece

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman tecrübelerini paylaşarak bana farklı bakış açıları kazandıran, bizlere her daim örnek olan çok değerli danışmanım, Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr.Yasemin Başbınar'a;

Her zaman güler yüzüyle öğrencilerini karşılayan ve biyoistatistik alanında derya deniz bilgilerini bizimle paylaşarak hep daha iyi olmamızı isteyen, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü müdürümüz sayın Prof.Dr.Hülya Ellidokuz'a;

Her sorunumda nedenini tekrar tekrar düşünmeye iten değerli hocam Doç.Dr.Gizem Çalıbaşı Koçal'a;

Sayesinde Onkoloji Enstitüsü'nün bir parçası olmaktan gurur duyduğum Onkoloji Enstitüsü müdürümüz çok saygıdeğer Prof.Dr.Hatice Nur Olgun'a;

Her başım sıkıştığında bana hem bilimsel hem de manevi destekte bulunan, önce hücrelerime verdikleri değer ve sonra da bu uzun ve zorlu yolculukta benimle yürüdükleri için sevgili arkadaşlarım Hasan Kurter, Ezgi Daşkın, Tolga Sever ve diğer tüm Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarıma;

Hayatımda olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim, kalbimin bahar tarafı Gökay Gökkurt'a;

Ve tabii ki hayatım boyunca elde ettiğim tüm başarıları onların sayesinde kazandığıma inandığım, her zaman yanımda bana en büyük destekçi olan, başarımla gururlanıp, hatamda doğru yolu gösteren, biricik aile üyelerim; dualarıyla her zaman bizi koruyan güzel annem, dünyaya geldiğimiz günden beri bir an olsun elini omzumuzdan çekmeyen aslan babam, 8 senelik ev arkadaşım evimin hem annesi hem ablası canım ablam ve yüzümü hep en çok güldüren minik Elifim'e;

Sonsuz teşekkür ederim...

Aslıhan KARADAĞ

**HEDGEHOG YOLAĞINDA YER ALAN SMO İNHİBİTÖRLERİNİN PTCH1
İNHİBİTÖRLERİ İLE KOMBİNE KULLANIMININ İN VİTRO HÜCRE
PROLİFERASYON VE İNVAZYONUNA ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Aslıhan KARADAĞ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Sinyal yollarının netleştirilmesi kanser hakkında bilgi birikimini artıracak gibi kanser tanı ve tedavisinde yol gösterici olabilir. Hedgehog sinyal yolu insanda embriyogenez döneminde hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, doku rejenerasyonu, yara iyileşmesi ve homeostazda yer alır. Yetişkinlikte anormal Sonic Hedgehog (Shh) aktivasyonunun neoplastik büyüme, kanser kök hücrelerinin gelişimi ve metastaza yol açan epitelyal-mezenkimal geçiş süreçlerinde önemli bir rol oynadığı gösterilmektedir. Hedgehog sinyalinin yokluğunda, 12-transmembran reseptör ailesinin bir üyesi olan Patched 1 (Ptch1), hücre zarına lokalizasyonunu önlemek için 7-transmembran protein Smoothed (Smo) aktivitesini inhibe etmek için katalitik olarak hareket eder. Hedgehog sinyal yolu aktivasyonu, hücre zarındaki sillerde değişikliklere neden olur. Ptch, Smo üzerindeki inhibisyonu ortadan kaldırır ve Smo sırayla fosforile edilir. Fosforilasyonlar sonrasında aktiflenen Gli1 transkripsiyon faktörünün hücre çekirdeğine translokasyonu gerçekleşir ve hedgehog sinyaline cevap verecek hedef genlerin transkripsiyonu yapılır. Gli1'in bu ifadesi doğrudan ve dolaylı yollarla hücre proliferasyonu ile ilgilidir. Bu proje kapsamında yapılan çalışmalar ile ticari glioblastoma hücre hattı olan U87-MG'de hedgehog sinyal yolu varlığı gösterilmiş ve Ptch1 antagonisti olan Robotnikinin ve Smo inhibitörü olan Vismodegib'in kombine kullanımlarının hedgehog sinyal yolu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu etkinin gözlenebilmesi için hücrede proliferasyon, migrasyon, invazyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunlara ek olarak kullanılan antagonist ve inhibitörün *in silico* olarak karşılaştırmaları yapılmıştır ve robotnikininin ilaç benzeri molekül olabileceği sonucuna varılmıştır. *In vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlar kombine tedavi ile etkin sonuçlar kazanılabileceği yönündedir. Yapılan kombine tedavilerde ajanların

birlikte kullanımının tek başlarına kullanımlarından daha etkili olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışma literatürde, Hh sinyal yolunun önemli 2 proteinlerinin Smo'nun inhibitörü vismodegib ve Ptch1'in inhibitörü robotnikinin kombine kullanımlarını içeren ilk çalışmadır.

Anahtar sözcükler: Glioblastoma, hedgehog sinyal yolağı, robotnikinin, vismodegib

Tezin sayfa adedi: 92

Danışman: Prof.Dr.Yasemin BAŞBINAR



**EFFECT OF COMBINED USE OF SMO INHIBITORS IN THE HEDGEHOG
ROAD WITH PTCH1 INHIBITORS ON *IN VITRO* CELL PROLIFERATION
AND INVASION**

Master Thesis

Aslıhan KARADAĞ

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Translational Oncology

ABSTRACT

Clarifying the signaling pathways will increase the knowledge about cancer and can be a guide in the diagnosis and treatment of cancer. The Hedgehog signaling pathway is involved in cell proliferation, cell cycle, tissue regeneration, wound healing, and homeostasis during human embryogenesis. Abnormal Sonic Hedgehog (Shh) activation has been shown to play an important role in the neoplastic growth, development of cancer stem cells, and metastasis. In the absence of hedgehog signaling, Patched 1 (Ptch1), a member of the 12-transmembrane receptor family, acts catalytically to inhibit the activity of the 7-transmembrane protein Smoothened (Smo) to prevent its localization to the cell membrane. Ptch abrogates the inhibition on Smo and Smo is sequentially phosphorylated. In this project, the presence of hedgehog signaling pathway was demonstrated in commercial glioblastoma cell line U87-MG, and the effect of combined use of Ptch1 antagonist Robotnikinin and Smo inhibitor Vismodegib on hedgehog signaling pathway was investigated. In order to observe this effect, cell proliferation, migration and invasion analyzes were performed. In addition, in silico comparisons of the antagonist and inhibitor used were made and it was concluded that robotnikin could be a drug-like molecule. The results obtained from in vitro studies show that effective results can be obtained with combined treatment. It has been observed that the combined use of agents in combined treatments is more effective than their use alone. The study is the first in the literature to include the combined use of vismodegib, an inhibitor of two important proteins of the Hh signaling pathway, and robotnikin, an inhibitor of Ptch1.

Keywords: Glioblastoma, hedgehog signaling pathway, robotnikinin, vismodegib

Number of pages: 92

Advisor: Prof.Dr.Yasemin BAŞBINAR



1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Hücre içi ve hücreler arası sinyal yolları embriyonik dönemden başlayarak canlı gelişiminde büyük bir öneme sahip olduğu gibi kanser oluşum ve gelişiminde de rol oynar. Kanserde sinyal yolları karsinogenez, metastaz, ilaç direnci gibi süreçlere neden olur. Kanser gelişiminde açığa kavuşturulan birçok sinyal yolu vardır ve hedgehog sinyal yolu bunlardan biridir. hedgehog sinyal yolu özellikle hücreler arası iletişimde görev alan farklı sinyal yolları ile etkileşimdedir ve onları etkileyebildiği gibi farklı sinyal yolları tarafından da etkilenir.

Birçok kanser türünde olduğu gibi glioblastomanın da moleküler patogenezinde hala keşfedilmemiş noktalar vardır. Bu tür kanserler genellikle morfolojik olarak çok heterojendirler ve bu nedenle uygulanan farklı tedavi yöntemleri olsa da kişinin sağkalım süresi oldukça kısadır, bu nedenle kanserde doğru tedavi yöntemi için öncelikli olarak altta yatan moleküler değişiklikler açığa çıkarılmalıdır.

Hedgehog (Hh) sinyali birçok organizmada korunmuş bir mekanizma olup, embriyolojik gelişim sürecinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır, yetişkinlikte sinyal yolunun aktif olması karsinogeneze neden olur. Bu gen ailesi 1970 lerin sonunda Drosophila meyve sinekleri üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda, Christiane Nüsslein-Volhard ve Eric Wieschaus tarafından keşfedilmiştir.

Kanserde rol oynayan sinyal yollarının zaman içerisinde aydınlatılması ile birlikte hastalık tedavisinde de potansiyel hedefler haline gelmişlerdir.

Bu nedenle sinyal yollarının birbirleri ile ilişkisinin daha iyi anlaşılması ve inhibisyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

1.2 Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada hedgehog sinyal yolunun aktif olduğu bilinen kanser türlerinde klinik kullanımı mevcut olan ilaç ile yeni keşfedilen hedgehog sinyal yolu antagonist molekülünün kombine tedaviye verdikleri cevabın *in vitro* olarak incelenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda glioblastomada aktif olduğu bilinen

hedgehog sinyal yolunun aydınlatılması kombine tedavi ile sinyal yolu inhibisyon etkisinin artması hedeflenmiştir ve farklı hedgehog sinyal yolağı inhibitörlerinin kombine kullanımında tek tek kullanımlarına oranla daha fazla inhibisyon etkisi gözlenip gözlenemeyeğı sorusuna cevap aranmıştır.

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Bu çalışma, kanser gelişim sürecinde büyük oranda rol oynadığı bilinen hedgehog sinyal yolunun inhibisyonuna yönelik yapılan ve kombine tedavi yönteminin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmadır. Tedavide kullanılan ilaca karşı hücrede gerçekleşen direnç ya da etkin tedavi sürdürülememesi genellikle hücrede gerçekleşen aktif yolların kullanımı ile oluşur. Bu sinyal yollarının farklı basamaklarda inhibisyonu ile kanser gelişimi önlenabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hedgehog Sinyal Yolağı

Embriyogeneizde gözlenen kontrollü hücre bölünmesi, çoğalması, farklılaşması ve programlanmış hücre bölünmesi gibi karsinogeneizde de kontrolsüz hücre davranışları gözlemlenir. Embriyogeneiz ve karsinogeneiz hücre davranışları, göçü ve farklılaşmaları açısından benzerdir ve bu hücre davranışları bir takım sinyal yolları tarafından kontrol edilir ya da uyarılır.

Hedgehog (Hh) sinyal yolağı bu yollardan biridir ve son yıllarda yapılan araştırmalar ile embriyogeneiz döneminde hücre proliferasyonu, hücre döngüsünün belirlenmesi ve doku örtüsünün gelişimi dahil olmak üzere pek çok gelişim sürecini düzenlediği (1), aynı zamanda yetişkin omurgalılarıda olağan süreç içerisinde kök ve öncül hücrelerin Hh sinyal aktivitesi ile yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve homeostaz sağladığı bilinmektedir (2). Son yıllarda yapılan çalışmalarda yetişkinlikte anormal Sonic Hedgehog (Shh) aktivasyonunun neoplastik büyüme (3), kanser kök hücrelerinin sürecini ve metastaza yol açan epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) süreçlerinde anahtar rol oynadığı belirtilmiştir (4)(5).

Hedgehog (Hh) sinyal yolu ilk kez 1980'lerde 2 biyolog olan Nüsslein-Volhard ve Wieschaus tarafından sirke sineği olarak da bilinen *Drosophila melanogaster*'in embriyonik ölümcül mutantlarında keşfedilmiş ve adını mutant embriyolardaki kirpi dikenlerine benzeyen kıl benzeri yapılardan almıştır (6) ve 2000'li yılların başında omurgalılarıda aydınlatılmaya başlanmıştır (1).

2.2.1 Hedgehog Sinyal Yolağında Görev Alan Protein, Ligand Ve Genler

Memelilerde üç adet Hh sinyal proteini bulunur, bunlar; Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) ve Desert (Dhh) Hedgehogdur. Hh proteinleri post-translasyonel modifikasyonlar sonrası bir membran taşıyıcı proteinin yardımıyla hücre tarafından salgılanan yaklaşık 45 kDa'lık öncüler olarak sentezlenir ve hedef hücreye iletilmeleri sağlanır. Hedgehog ligandlarının üretimi, otoproteolitik bölünmeyi ve kolesterol ve palmitik asit gibi lipid parçalarının eklenmesini içerir. Ligandın salgılanması için birkaç özel protein gereklidir. Bu proteinler arasında omurgalılarıda en çok karşılaşılan Hh proteini Shh'dir (2). Hh molekülleri, C-terminalden kolesterole

bağlı bir N-terminal peptid oluşturmak amacıyla otoproteolitik bölünmeye uğrar. Hh'nin kolesterol modifikasyonu, plazma membranında tutulmasına yol açarak serbest hareketliliğini sınırlar ve hem kolesterol hem de palmitik asit, Hh'nin sterol bakımından zengin membran mikro bölgeleri ile ilişkisini destekler (7). Shh, embriyo gelişimi sırasında özellikle beyin ve ekstremité oluşumuna etkilidir. Shh sinyali erişkin dönemde ise yaralanma ve inflamasyon dışı durumlarda inaktif haldedir (8).

Shh, Patched 1 (Ptch1) ve Smoothened (Smo) transmembran proteinlerini etkileyerek glioma ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin (Gli) faaliyetine yol açan bir sinyal transdüksiyon kademesini etkinleştirir (3). Shh sinyal yokluğunda, 12-transmembran reseptörü olan Ptch1, G proteinine bağlı reseptör (GPCR) süper ailesinin bir üyesi olan 7-transmembran proteini Smo aktivitesini hücre yüzeyine lokalizasyonunu önleyerek bastırmak için katalitik olarak etki eder (9)(10).

Hh sinyal yolunun aktivasyonu hücre membranındaki sillerde değişikliğe neden olur. Ptch GPR161 sillerinden çıkar ve plazma membranından yanıl taşıma yoluyla veya doğrudan bir hücre içi vezikülden girerek Smo'nun, protein kinaz A (Pka), kazein kinaz la (CkIα), CkII ve Gpcr kinaz 2 (Gprk2) tarafından art arda fosforilasyonu ve seçici proteolizi gerçekleşir (11). Primer sillerin bu hareketi sonrası Gli transkripsiyon düzenleyicisini modifiye eden FUSED supresörünü (SUFU) de içeren bir sitoplazmik kompleksin modüle edilmesi sağlanır (10). Smo'nun bazal gövdenin hemen distalindeki bir bölgede birikmesiyle Hh sinyalizasyonu Gli2, Gli3 ve SUFU seviyelerini de artırır. Bu, Smo'nun bazal gövdenin hemen distalindeki bir bölgede birikmesine neden olur ve sinyallemeyle mümkün kılar. Dolayısıyla Shh'un Patch'e bağlanması Ptch'in Smo üzerindeki inhibisyonunu ortadan kaldırmaktadır. Aktifleşen SmoC silyum membranına bağlanmaktadır. SmoC, protein kinaz A (PKA)'yı baskılamakta, böylelikle Gli proteinleri yolak aktif değilken kompleks oluşturdıkları supresör SUFU kompleksinden ayrılmakta ve aktifleşmektedir.

Hh sinyalizasyonu, özellikle uç kısımdaki sillerde sinyal yolu aktivasyonunun nihai sonucu, Gli-SUFU kompleksinin siller içinde ayrışması ve yeni serbest bırakılan tam uzunlukta, aktive edilmiş Gli2 ve Gli3 proteinlerinin siliyadan çekirdeğe proteolitik işlemeyi atlayarak taşınmasıdır (12). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada SUFU kaybının, HH yolağının yapısal aktivasyonuna neden olduğu, ancak FUSED kaybının (STK36 olarak da bilinir) Hh sinyallemeyle üzerinde hiçbir etkisi olmadığı

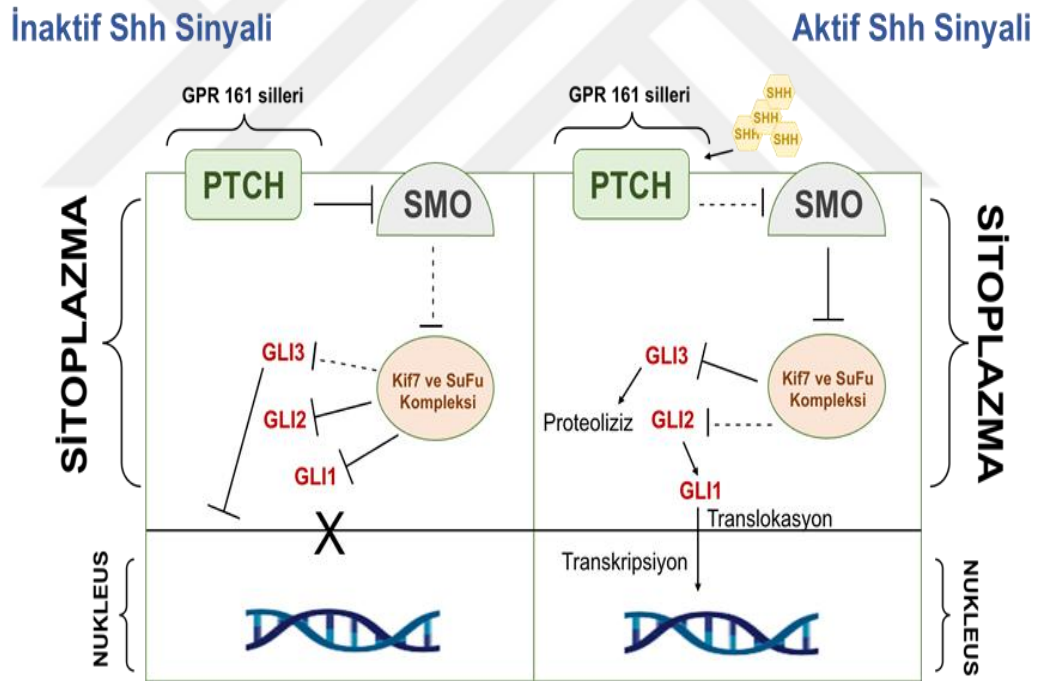
bildirilmiştir (1). Ptch tarafından yapılan baskılamanın ortadan kalkma mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da SUFU'nun modüle edilmesi ardından Gli1'in hedef Hh genlerini indüklediği bilinmektedir, bunlar; Gli2 transkripsiyon ve translasyon sonrası hücrel olaylara bağlı olarak indükleyici ya da baskılayıcı görevi görebilir, Gli3 ise baskılayıcı bir rol oynamaktadır (13). Aktive edilmiş Gli2 ve Gli3 proteinleri siliyadan çekirdeğe proteolitik işlemeyi atlayarak taşınırlar. HH sinyal iletimi, translasyon sonrası proteolitik işlemleri düzenleyerek Gli proteinlerinin aktivatör ve baskılayıcı formları arasındaki dengede bir değişikliğe neden olur (7). Gli aktivasyonu çeşitli düzeylerde SUFU, Ren, protein kinaz A (PKA) glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β) gibi inhibitörler ve Dyrk1, Ras ve Akt gibi aktivatörlerin oluşturduğu fosforilasyon aracılığıyla düzenlenmektedir (14).

Farklı bir görüş ise sitoplazmada aktivatör forma geçen Gli2'nin Gli1'in promotör bölgelerine doğrudan bağlanarak Gli1 ekspresyonunu uyarırken, Gli1'in de muhtemelen bir ara transkripsiyon faktörünün aktivasyonu yoluyla kendi ekspresyonunu ve Gli2 transkripsiyonunu indüklediği yönündedir (15). Sonuç olarak, Gli1 ve Gli2'nin konstitütif ekspresyonu, farklılaşma sinyallerini bastırarak ve hücre döngüsü ilerleme genlerini, anti-apoptotik faktörleri ve EMT-invaziv büyümeyi teşvik eden genleri aktive ederek tümör oluşumuna katkıda bulunur.

Tablo 1. Hedgehog sinyal yolunda nihai sonuç olarak elde edilen bir transkripsiyon faktörü olan Gli1 nukleusa geçerek proliferasyonla ilişkili olduğu bilinen bazı gen bölgelerine ait tablo

Transkripsiyonu Gerçekleşen Gen Bölgesi	Gen Bölgesinin Etkisi	Hücreye Gen Bölgesinin Hücredeki Görevi
CCND- Siklin D1	Proliferasyon	Hücrede bulunan siklin bağımlı kinazların düzenleyicileri olarak işlev görür. Hücre döngüsünün G1/S geçişi için gereklidir (16)
CCNE- Siklin E1	Proliferasyon	Hücre döngüsünde DNA duplikasyonunun başlamasını belirler ve Hücre döngüsü ilerlemesini inhibe eden TGF-yolağı Siklin E1/CDK2 tarafından inhibe edilir (17)
E2F	Proliferasyon	Hücre döngüsü regulasyonu ve DNA sentezinde yer alır (18)
CDK1- Siklin bağımlı kinaz 1	Proliferasyon	Ökaryotlarda hücre döngüsünün ana denetleyicisidir (19)

CCNA- Siklin A2	Proliferasyon	Somatik hücrelerin bölünmesinde ifade edilir. Hücre bölünmesinin S fazında ve G2'den M fazına geçişte görev alır (20)
CCNB- Siklin B1	Proliferasyon	Hücrenin mitoz bölünme karar mekanizmasında yer alır. Kromozom yoğunlaşması gibi erken mitoz evrelerinde rol oynar (21)
BCL2	Hücre hayatta kalımı	Hücrede apoptozu inhibe ederek veya indükleyerek hücre ölümünü düzenler (22)(23)
SNAIL1	EMT	Embriyonik gelişim sırasında epitel mezenkimal geçişi (EMT) düzenlemek için E-kaderin'in baskılanmasını destekleyen bir transkripsiyon faktörleri ailesidir (24)



Şekil 1. Hedgehog sinyal yolu şematik gösterimi

2.1.2 Non-Kanonik Hedgehog Sinyal Yolu

Buraya kadar anlatılan Hh sinyali yolağı kanonik Hh sinyali yolu olarak da bilinmektedir. Hh sinyali yolunun bir diğeri türü ise non-kanonik Hh sinyali yoludur. Non-kanonik Hh sinyali yolunda, Shh, Gli'nin Shh'nin kendisinden, Ptch transmembran proteininden veya SMO'dan bağımsız olarak aktivasyonunu içerir. Örneğin, Gli1 ve Gli2, melanomda TGF β / Smad3'ün transkripsiyonel hedefleridir (25). Non-kanonik Hh sinyali yolu da kendi içinde ikiye ayrılmaktadır. Bunlar non-kanonik tip 1 ve non-kanonik tip 2 Hh sinyali yollarıdır. Tip 1, SMO bağımsız ancak Gli bağımlı bir aktivasyon gösterirken; tip 2, Smo bağımlı ancak Gli bağımsız bir aktivasyon göstermektedir. Non-kanonik tip 1 Hh, PI3K / AKT / mTOR, TGF gibi diğeri sinyali yolları ile aktive edilebilir (26) ve SMAD3, RAF / MEK / MAPK ve KRAS / AR yollarını aktive edebilir (27). Non-kanonik tip 2 Hh'ye verilecek bir örnek ise Hh sinyali aktivasyonunun kolon kanseri kök hücrelerinde WNT yolunu pozitif olarak düzenlediği ve cAMP hücre içi seviyelerini düşürdüğüdür (28).

2.1.3 Hedgehog Sinyal Yolağının DNA Tamir Mekanizmasındaki Rolü

Hh sinyali yolunun yetişkinlerde anormal aktivitesinin medulloblastoma, bazal hücreli karsinom, glioblastoma gibi kanserler ile ilişkili olduğu (29) ve Hh/GLI sinyalleşmesinin çeşitli kanser türlerinde birden fazla DNA onarımı mekanizmasında görev aldığı bilinmektedir. DNA yanlış eşleşme mekanizması (mismatch repair-MMR) DNA replikasyonunda meydana gelen bozulmaların tamiri sırasında önemli bir role sahiptir. Bu mekanizmada oluşan aksaklıklar başta kanser olmak üzere birçok hastalığa neden olmaktadır (4). Son yıllardan yapılan çalışmalar ile DNA tamir mekanizmalarından biri olan mismatch repair (MMR) mekanizmalarının Gli ile ilişkisi ortaya konmuştur (30). Mazumdar ve ark. tarafından insan kolon karsinomu hücre hattı HT29'da cDNA mikrodizi gen profillemesini yapılan çalışmada Gli1 ve GLI2'nin inhibisyonunun MMR'de yer alan iki genin (MSH6 ve EXO1) ekspresyonlarını aşağı regüle ettiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada yer verilen bir başka durum ise GLI1 ve Gli2'nin inhibisyonu veya baskılayıcı Gli3'ün ekspresyonu, HT29 hücre hattında nükleotid eksizyon onarımı (NER) ve baz eksizyon onarımı (BER) ile ilgili genlerin ekspresyonunu aşağı regüle ettiği yönündedir (31).

DNA'da oluşan hasarların onarılmaması durumunda hücre planlı hücre ölümü için hücresel sinyaller gerçekleşir daha fazla kalıcı hasarı önlemek için hücre apoptoza gider. Yapılan bazı çalışmalarda Hh sinyal yolu proteinlerinden biri olan SMO'nun inhibisyonunun kaspaz 3'ü yukarı regüle ederek apoptoza artırdığı gösterilmiştir (32). Bir başka çalışmada ise gliomablastom kanserinde Gli1'in susturulmasının apoptozdan sorumlu Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı ve apoptoza artırdığı bildirilmiştir (33).

2.2. Hedgehog Sinyal Yolağı Ve Etkileşimde Olduğu Sinyal Yolakları

Hh sinyalinin kanserdeki DNA onarım mekanizmasını değiştirme yeteneğine ek olarak, aynı zamanda kanser hücrelerinin DNA onarımının başarısız olması durumunda yedekleme mekanizması olan apoptozdan kaçmasına da izin verir. Böylelikle, hücrelerin apoptozdan kaçmasını sağlayarak Hh sinyali kanser gelişimi, ilerlemesi ve metastazı için çok önemli bir yol oluşturur.

Hh sinyal yolağının DNA doğrudan onarım mekanizması üzerindeki etkisi hakkında kesin ve işlevsel bir rapor bulunmamakla birlikte, Cui ve ark. tarafından yapılan çalışmada O6-Metilguanin-DNA metiltransferazın (MGMT), gliomada Hh sinyalinin bloke etmesi üzerine MDR1, MRP1, MVP, MGMT, Bcl-2 ve Survivin genlerinin ekspresyonlarını aşağı regüle ederek glioma hücrelerinde kemoterapötik ajanların sitotoksitesini artırdığı ve Gli1'in aşırı ekspresyonunun kemoterapiden sonra glioma nüksü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (34). Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar Gli1'in glioma hücrelerinin kemoterapötik ajanlara direncinde baskın bir rol oynadığını ve Hh / Gli1 sinyalleme sisteminin engellenmesinin neredeyse tüm DNA onarım mekanizmalarını bastırabileceğini göstermektedir. Bu durum Hh sinyal yolunun alt ve üst regülasyonlarının farklı sinyal yolları ile etkileştiğine kanıt olmuştur. Gli, Ptch ve HHIP'in yanı sıra, Gli1 ve Gli2 proteinleri, hücresel proliferasyonda yer alan (CCND1/2, MYCN, SPP1, BMI-1, IGFBP6, FOXM1), sağ kalım (BCL2, MDM2), anjiyogenez (VEGF, ANGTL, ANGL, CYR61) ve epitelyal mezenkimal geçiş (BMP1, MUC5AC, SNAI1, JAG2) ilişkili genleri aktive eder.

Literatüre Hh sinyal yolağı ve WNT yolağının benzerliklerine dair birçok makale sunulmuştur (35). Her iki yolak da membran proteinleri ile aktive olur ve

ligand yokluğunda her iki yolak da glikojen sentaz kinaz 3 (GSK-3 β) ve kazein kinaz (CK1) tarafından susturulur, GSK-3 β 'nın SUFU'yu fosforilleyerek stabilize ettiği ve bu sayede Hh yolağının aktivasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (36). Bunlarla birlikte hücrede salgılanan frizzled-ilişkili protein 1'in yukarı regülasyonu ile Gli1 indüksiyonunun bir sonucu olarak Wnt sinyallenmesinin inhibe edildiği de bildirilmiştir (37).

Notch sinyal yolu ise yine Hh sinyal yolu gibi embriyogenez, hücresel homeostaz ve kök hücre yenilenmesinde rol oynayan bir sinyal yoludur (38). Notch reseptörlerinin aktivasyonu serin / treonin kinaz Akt, transkripsiyon faktörü STAT3 ve rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) yolları ile ilişkisine ek olarak Shh arttırıcısının ekspresyonunu da indükler. Yapılan çalışmalar ile Shh ve Notch inhibisyonunun, CD133 + glioblastoma kök hücrelerinde ilaca karşı duyarlılığı arttırdığı (39) ve Shh, Notch ve Wnt yollarının birlikte meme kanseri kök hücrelerinin ve progenitör hücrelerin kendi kendini yenilemesini ve farklılaşmasını düzenleyebildikleri (40) bildirilmiştir.

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'nün RAS / RAF / MEK / ERK sinyallenmesinin uyarılması yoluyla Gli hedef genlerinin transkripsiyonunu seçici olarak etkinleştirmek için Gli1 ve Gli2 ile etkileşime girer. Bunun yanı sıra literatürde EGF'nin kök hücreler üzerindeki Shh'nin proliferatif aktivitesini uyarma ve Shh ifade eden epidermal hücrelerin invazif özelliklerini geliştirme kabiliyetine sahip olduğu ile ilgili çalışmalar yer almaktadır (41)(42).

Hh sinyalizasyonu, büyüme faktörü- β (TGF- β) ve AKT sinyalinin dönüştürülmesi gibi diğer yollarla da çapraz etkileşimde yer alabilir. Johnson ve ark. tarafından MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada TGF- β 'nın paratiroid hormonu ile ilişkili proteinin Gli2 aracılı ekspresyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (43). Ju ve ark. ise Hh ve AKT yollarının etkileşimlerini incelemek üzere zebra balıkları kullanarak yaptıkları çalışmada iki yolun birlikte aktivasyonunun tümör oluşumunu desteklediğini bulmuşlardır (44).

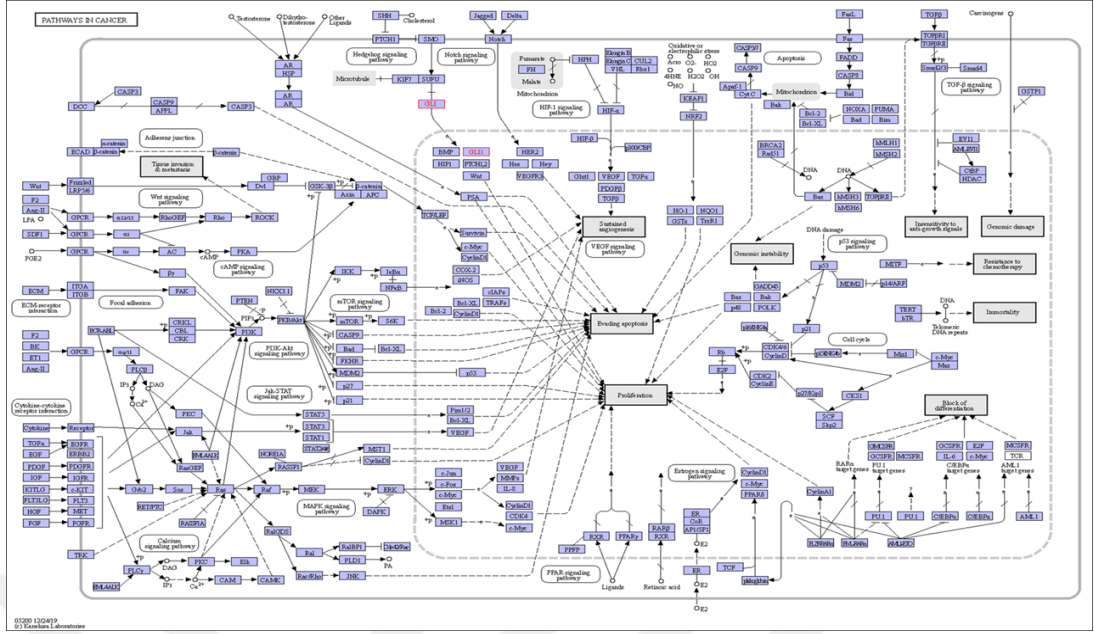
Kanserin başlaması sırasında, ekspresyonu CD15 veya CD133 ile paylaşan kanser kök hücre markeri BMI1'in Shh/Gli'ye bağlı bir yukarı regülasyonu vardır. Shh, tümörün başlamasından sorumlu olan kök hücre nişinin korunmasında da rol oynar. Daha sonra, tümör büyümesi sırasında Shh/Gli, hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü

ilerlemesinde rol oynayan Siklin D, Siklin E ve NMYC genlerinin transkripsiyonunu kontrol eder. Bunun yanısıra yapılan çalışmalar ile Hh sinyal yolu ile transkripsiyon faktörü Nanog, onkopresör p53'ün kaybıyla uyumlu olarak hem embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesinin hem de pluripotensi yeniden programlayan farklılaşmış somatik hücrelerin önemli bir belirleyicisi olarak hareket ettiği gösterilmiştir (45).

Tümör boyutunu korumak ve pro-invazif süreçleri desteklemek için Shh yolu, kapsamlı doğrudan gen regülasyonu yoluyla hücre hayatta kalmasını, EMT geçişini, anjiyogenezi ve metastatik mekanizmaları CFLAR ve apoptoz ve proto-onkogen düzenleyicisi olan Bcl2 genlerinin ekspresyonunun pozitif kontrolünü sağlar (46). Başka bir çalışmada glioblastoma kanserinde Gli1'in susturulmasının apoptozdan sorumlu Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı ve apoptozu arttırdığı bildirilmiştir (33). Aynı zamanda, aynı kökenli ölüm reseptörü-4 (DR4) promotörünü bağlayarak, Gli3 tarafından bastırma yoluyla tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligandın (TRAIL) indüklediği apoptozu modüle eder (47). Shh ayrıca diğer sinyal yollarıyla dolaylı olarak ilgili hareket eder. Bununla birlikte, kanser kök hücrelerinin hücrel mekanizmaları tam olarak anlaşılmamış olsa da, artan kanıtlar, embriyonik ve yetişkin kök ve progenitor hücrelerin düzenlenmesinde Hh sinyal yolunun yanı sıra Wnt ve Notch gibi temel gelişimsel sinyal yollarının görev aldığı bilinmektedir (48).

Shh'nin, besinleri geri dönüştürmenin, hücrelerin hayatta kalmasını ve olumsuz ortamlara karşı direncini arttırmanın bir yolu olarak otofajik sürece dâhil olabileceği düşünülmektedir. Tüm bu işlevler, Shh yolağının kanser biyolojisindeki önemini vurgulamakta ve kombine farmakolojik tedaviler için stratejik bir hedef olarak kullanımını haklı göstermektedir (46).

Evrimsel süreçte Hh sinyalleme ağırlıklı olarak Hh ligandlarının komşu mezenkimal hücrelere etki etmek üzere epitel tarafından üretildiği ve salgılandığı parakrin sinyalleşmeyi kullandığı açıklanmıştır. Yapılan araştırmalar ile otokrin sinyalleşme yolu kullanan kanser hücrelerinde buna ek olarak parakrin sinyalleşmenin de olması tümör oluşumunu hızlandırdığını ortaya koymaktadır (49). Bu nedenle bu sinyalleşmenin tümör oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2. Kanserde yol alan yolların tümünün gösterimi (50)

Şekil 2’de de gösterildiği gibi Hh sinyal yolağı Gli1 proteininin üretimi ile doğrudan hücre proliferasyonunda etkilidir. Ayrıca yukarı ve aşağı regülasyonlar ile diğer yollardan etkilenebilir ve onları etkileyebilir. Burada da belirtildiği gibi hücreler arası etkileşim gerek sinyalleşme gerekse aşağı ve yukarı regülasyonlar ile kontrol edilmektedir.

Bazı çalışmalar, Hh sinyal yolu proteinlerinden biri olan Smo’nun inhibisyonunun, kaspaz 3’ü yukarı regüle ettiğini ve ardından apoptozu indüklediğini açıklamıştır (32). Hh sinyali ayrıca kanser hücrelerine, DNA onarımının başarısız olması durumunda ikame mekanizma olan apoptozu önlemesini sağlar. Hh sinyali, hücrelerin apoptozdan kaçınmasına izin vererek, kanser gelişimi, ilerlemesi ve metastaz için çok önemli bir yol oluşturur.

2.3 Hedgehog Yolak İnhibitör ve Antagonistleri

Bir önceki bölümde bahsedildiği gibi Hh sinyal yolu birçok farklı hücre içi ve hücreler arası yollar ile ilişkilidir. Bu nedenle hem Hh hem de diğer yolları hedefleyen tedaviler ve hatta mümkünse kombine tedavilerin uygulanmasının klinikte hastaya daha fazla yardımı olacağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar ile Hh sinyalleşmesinin inhibisyonunun tümör büyümesini engellediğini ve hem proliferasyonu hem de maligniteyi etkilediğini gösterilmiştir (51).

Bu nedenle Hh sinyal yolunun son yıllarda kanser tedavisinde hedef bir yol olması ardından gerek doğal gerekse sentezlenmiş bir çok inhibitör küçük moleküller keşfedilmiştir ve farklı hedeflere sahip doğal ürünler ve kemoterapötiklerin bir kombinasyonunu kullanan stratejiler, gliomalı hastaların genel sağkalımını artırabileceği düşünülmektedir.

Son 15 yılında birçok farklı Hh sinyal yolu inhibitör ve antagonisti *in vivo* ve *in vitro* kanser tedavisi araştırmalarında kullanım amacıyla keşfedilmiştir.

Örneğin GANT61, Gli1 ve Gli2'yi hedefleyen bir Hh yolu inhibitörüdür. GANT61'in Gli ekspresyonunu verimli bir şekilde aşağı regüle ettiği, göçü ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve G1 tutulmasına ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (49). GANT61 ayrıca insan mesane geçiş hücreli karsinomunda Gli2'yi inhibe ederek hücre istilasını azaltabilir (52). Hh yolunu hedefleyen inhibitörlerden bazılarının listesi tablo 2’de verilmiştir (53).

Tablo 2. Hh yolu inhibitörleri

İnhibitor	Hedef	İnhibisyon Şekli
Vismodegib Sonidegib Saridegib Siklopamin Taladegib TAK-441 IPI-926 XL139 PF-0449913 CUR61414	Smo	Doğrudan Smo’ya bağlanır
HPI-1 Imiquimod	Gli	Gli degradasyonu sağlar
HPI-2 HPI-3	Gli	Gli aktivasyonunu engeller
HPI-4 Arsenik3Oksit	Gli	Birincil silyumlarda oluşan hareketi engeller
Gant58 Gant61 Glabrescione B	Gli	Doğrudan Gli’ye bağlanarak nükleus translokasyonunu ve DNA’ya bağlanmasını engeller
Robotnikinin 5E1 Ab	Ptch	Shh ligandı ile etkileşime girerek ligandın Ptch1’e bağlanmasını engeller
Kurkumin	Ptch	Doğrudan Ptch1 proteinine bağlanarak Hh yolu inhibisyonu sağlar

2.3.1 Vismodegib

Gupta ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada hücre bazlı fenotipik veriler kullanılarak, doğal küçük moleküller ve G protein-bağlı reseptörler (GPCR'ler) ailesinin görünür bir üyesi olan Smo'nun birkaç sentetik düzenleyicisi keşfedildiği ve bu keşiflerin devamının Hh sinyal yolunun inhibisyonu ile kanser tedavisinde etkili çözümlere ulaşılabileceği bildirilmiştir (54). Bu inhibitörlerden en önemli ve yaygın kullanımı olan Vismodegib Hh sinyal yolu inhibitör ajanı olarak ilk klinikte kullanıma sunulan moleküldür. 2000'li yılların başında Vismodegib'in yapılan *in vitro* ve *in vivo* deneylerde, Hh yolağının aktivasyonunu inhibe ederek, Ptch mutasyonları veya artan Hh ligand seviyeleri ile başlatılan tümör büyümesinin inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte devam eden çalışmalar ile 2012 yılında FDA (Food and Drug Administration) (71) ve 2013 yılında EMA (European Medicines Agency) tarafından onay almıştır. GDC-0449 kodu ve Erivedge ticari ismi ile antineoplastik bir ajan olarak kullanılmaktadır.

Benzanilidler olarak bilinen organik bileşikler sınıfına ait olan (55) Vismodegib'in molekül formülü şu şekildedir; $C_{19}H_{14}Cl_2N_2O_3S$ (56). Clinicaltrials.gov veritabanında yapılan bir araştırmada, vismodegibin otuz sekiz klinik çalışmasının, birbiriyle çelişen malignitelerin tedavisine kullanıldığını bildirilmiştir. Örneğin bir denemede vismodegib, metastatik kolon kanserinde Avastin (bevacizumab) kombinasyonu ile birlikte klasik kolon kanseri kemoterapisinde kullanılmıştır. Yapılan denemede vismodegib ile tedavinin, semptomların azalmasıyla sonuçlandığı verileri elde edilmiş ve vismodegibin klasik kemotörapatik ajanlar ile kombinasyonunda zararsız bir şekilde kullanılabileceğini önerilmiştir (57).

Şu anda, Hh yolu için birçok ilaç, Smo'yu bloke ederek ve hücre proliferasyonunun baskılanmasına neden olarak hareket eder. Bununla birlikte, Hh sinyali, Smo'nun akış aşağısına yerleştirilmiş bileşenleri hedefleyerek de değişebilir. Buna göre, birkaç grup bu yoldaki Gli veya diğer proteinleri hedef alan ajanlar geliştirmeye çalışmaktadır. Örneğin GANT61, Gli1 ve Gli2'yi hedefleyen bir Hh yolu inhibitörüdür. GANT61'in Gli ekspresyonunu verimli bir şekilde aşağı regüle ettiği, göçü ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve G1 tutulmasına ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (58). GANT61 ayrıca insan mesane geçiş hücreli karsinomunda Gli2'yi inhibe ederek hücre istilasını azaltabilir (52).

Vimodegibin Hh yolu inhibitörü olarak klinikte kullanımı ilk kez BCC hastalarında yapılmıştır. Yapılan bir takım çalışmalar BCC hastalarında vismodegibe karşı direnç kazanıldığı bilgisini sunmaktadır. Bu süre klinikte 3-6 ay olarak belirtilmiş ve hastaların %40-50sinde gözlenmektedir. Aynı oran yapılan *in vitro* çalışmalarda da karşımıza çıkmaktadır (59)(60). Sinyal yolunun *in vitro* çalışmalar ile aydınlatılması sonunda kazanılan direnç mekanizması da aydınlatılmıştır. Smo inhibisyonu sağlanan hücrede kazanılan ya da sonradan gelişen Ptch1 mutasyonu sinyal yolunu sürekli aktif tutmaktadır. Bu nedenle sinyal yolunun farklı yollardan inhibisyonunu sağlamak için çalışmalar yapılmalı ve bunların kliniğe translasyonu sağlanmalıdır.

2.3.2 Robotnikinin

Hedgehog homologlarının en yaygın olarak karakterize edileni Sonic Hedgehog (Shh), yolu, tam uzunlukta Shh'nin aktif bir 20 kD N-terminal fragmanına (ShhN) otomatik bölünmesini içerir. 12 geçişli transmembran reseptörü Ptc1'e bağlanır ve Smo üzerindeki inhibitör etkisini tersine çevirir. Bu de-represyonun bir etkisi, Gli1 ve Ptc1'i içeren hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyen Gli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonudur. Dijkgraaf ve ark. tarafından yapılan çalışmada ne yazık ki, Smo'daki ve aşağı regülasyonunda yer alan yolaklardaki mutasyonların tedavisinde kullanılan hedeflerin zaman içerisinde vismodegib direncine neden olabileceği düşünülmektedir (57). Bu nedenle zaman içerisinde Hh yolu inhibisyonu sağlayan farklı ajanlar üzerine gidilmiştir. 2009 yılında keşfedilen robotnikinin isimli ajan bunlardan biridir.

Robotnikinin 2009 yılında Stanton ve ark. tarafından keşfedilen Shh bağlı Hh yolu inhibisyonunu hedefleyen, $C_{25}H_{27}ClN_2O_4$ molekül formüllü küçük moleküldür. Shh-LIGHT2 hücreleri ile yapılan bu çalışmada robotnikinin aktivitesi laboartuvar ortamında sentezlenen farklı moleküllere göre daha üstün çıkmıştır. Robotnikinin Ptch1'e bağlanarak Hh yolu aktivasyonunu sağlayan Shh ligandına bağlanır ve böylece Shh yolunun inhibisyonunu sağlar. Smo üzerindeki baskının kalkmaması durumunda Gli1 transkripsiyon faktörünün ekspresyonu gerçekleşemez.

Mateska ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Shh üreten hücrelerin, zara bağlı Shh aracılığıyla kısa bir mesafede sadece birincil siliyerleri olan hücrelere sinyal gönderdiği bildirilmiştir. Bu da Shh aracılı Hh sinyal yolu inhibisyonunu kanser

tedavisinde daha etkin olabileceği sonucuna varmaktadır (61). Benzer şekilde Atwood ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise Smo'nun aşağı akışında çalışan aPKC-1/λ veya Gli2 inhibitörlerine yanıt verdiğini ve Gli antagonistlerinin klinik kullanımı için zemin oluşturduğunu gösterilmiştir (62).

2.4 Glioblastoma

Glioma beyindeki nöronları çevreleyen ve destekleyen glial hücrelerden kaynaklanan tümördür. Astrositomlar ise beyinde astrosit adı verilen bağ dokusu hücrelerinden gelişen glial hücreli tümördür ve tüm birincil beyin tümörlerinin neredeyse yarısını oluşturan en yaygın birincil eksen içi beyin tümörüdür. Glioblastoma multiforme (GBM) adı verilen yüksek dereceli astrositomlar, tüm beyin tümörlerinin en kötü huylularıdır. Glioblastoma erişkinlerde en sık görülen ve agresif primer beyin tümörüdür (72). Cerrahi rezeksiyon, radyasyon ve kemoterapi genel olarak kullanılan tedaviler olsa da tedaviyi takiben hastalığın nüksü yaygındır ve sağkalım oranı oldukça düşüktür. Sıklıkla kullanılan tedavi yöntemi vasküler endotelial büyüme faktörüne karşı antiangiyojenik tedavidir ancak bu tedavi yönteminde de ilaca karşı direnç ile karşılaşmaktadır.

Literatürde CD133+ glioblastoma hücrelerinde ilaç direncinin daha yüksek oranda görüldüğüne yer verilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar ile CD133'ün hücrelerde Uchida ve ark. tarafından yapılan çalışmada Shh yolunun, CD133- glioblastoma hücrelerinin göç etme kabiliyetinde önemli bir rol oynadıkları bildirilmiştir (62). Glioblastomada ilaç direncine neden olduğu düşünülen CD133'ün klinikte hastaya uygulanan iyonlaştırıcı radyasyon ile çeşitliliğinin arttığı da bilinmektedir. Yapılan çalışmalar ile CD133+ hücrelerin, DNA hasar kontrol noktalarının tercihli aktivasyonu yoluyla glioma radyo-direncine katkıda bulunduğunu gösterilmiştir (73).

Glioblastomada sıklıkla görülen mutasyonlar; siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A), fosfataz ve tensin homologu (PTEN), reseptör tirozin kinaz (RTK)/ rat sarkoma (RAS)/PI3K, p53 ve Hedgehog sinyalleşme mutasyonudur. Fosfataz ve tensin homologu (PTEN), PI3K aktivitesini aşağı regüle eden bir lipid fosfataz proteinini kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir. PTEN'in fosfataz aktivitesi, AKT sinyal yolunu inhibe eder ve hücre döngüsünün düzenlenmesini etkiler. Bu gendeki

mutasyonlar, prostat, beyin, deri ve meme dahil olmak üzere çeşitli kanserlerle ilişkilidir.

CDKN2A, ikisi CDK4 kinazının inhibitörleri olarak görev yapan ve hücre döngüsünün G1 fazında tutuklamayı indükleyebilen üç ekleme varyantını kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir.

Glioblastomanın regülasyonunu sağlayan yollardan birinin de Hh-Gli1 yolu olduğu bildirilmiştir (63). TCGA-GBM veri tabanının (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) 149 klinik vakasına ilişkin RNA dizilimine dayalı transkriptomik verileri analiz edildiğinde Gli1 ve Ptch1 mRNA ifadesi arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Referans olarak medullablastoma ile karşılaştırıldığında, GBM'deki Gli1 mRNA ifadesi, MB'nin "yüksek-Hh" kümesinden 14,8 kat daha düşük, ancak "düşük-Hh" MB kümesinden 5,6 kat daha yüksektir.

Chandra ve ark. tarafından yapılan çalışmada GBM hastalarından elde edilen hücrelerde Gli1 mRNA ifadelerinin *in vitro* olarak Shh ligandla zenginleştirilmiş ortamda (shh-CM) kültüre edilmesi ve Hh inhibitörü olan vismodegib tedavisi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı sırasıyla yukarı ve aşağı regülasyon olduğu gösterilmiştir (33).

Fosfataz ve tensin homologu (PTEN), PI3K aktivitesini aşağı regüle eden bir lipid fosfataz proteinini kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir. PTEN'in fosfataz aktivitesi, AKT sinyal yolunu inhibe eder ve hücre döngüsünün düzenlenmesini etkiler. Bu gendeki mutasyonlar, prostat, beyin, deri ve meme dahil olmak üzere çeşitli kanserlerle ilişkilidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu çalışma tanımlayıcı bir araştırma olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma Temmuz 2019- Haziran 2021 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Translasyonel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.3 Araştırmanın Örneklemi

Çalışma, ticari hücre hatlarının kullanıldığı *in vitro* bir araştırma olarak gerçekleştirilmiştir. İnsan ya da hayvan materyali kullanılmamıştır.

3.4 Çalışma Materyali

Bu çalışmada, glioblastoma kanser hücre hattı kullanılmıştır. U87-MG (ATCC® HTB-14) hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)'den satın alındı.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmada kullanılan ticari glioblastoma hücre hattında inhibitör etkisiyle değişen proliferasyon ve invazyon davranışları bağımlı değişken; inhibitör konsantrasyonları ve kullanılan alternatif yollar bağımsız değişkenlerdir.

3.6 Veri Toplama Araçları

Tablo 3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
U87-MG glioblastoma hücre hattı	ATCC- HTB-14	<i>İn vitro</i> çalışmalar gerçekleştirildi
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (4.5 g/l)	Cegrogen Biotech GmbH- E0500-140	U87-MG hücrelerinin kültüre edilmesi

Esansiyel olmayan aminoacid	Cegrogen Biotech GmbH- K0100-690	U87-MG hücrelerinin kültür ortamına eklendi
Penisilin- Streptomisin (10,000U/ml)	Cegrogen Biotech GmbH- P0100-790	U87-MG hücrelerinin kültür ortamına eklenen antibiyotik
Fetal sığır serum (FBS)	Cegrogen Biotech GmbH- A0500-3030	U87-MG hücrelerinin kültür ortamına eklendi
Robotnikinin	Biovision- 1923-1	Ptch1 inhibitörü
Vismodegib (GDC-0449)	Selleckchem - S1082	Smo inhibitörü
AlexaFluor647 phalloidin	Thermofisher- A22287	Immunfloresan boyamada aktin biyobelirteci
poliklonal Ki-67 antikor	Abcam- ab15580	Immunfloresan boyamada proliferasyon biyobelirteci
DAPI	PanReac AppliChem- A4099,0010	Hücrelerin çekirdekleri boyandı
Paraformaldehit solüsyonu%4	ChemCruz- sc281692	Immunfloresans boyama öncesi hücrelerin fiksasyonunda kullanıldı
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (10X) (PBS)	Cegrogen Biotech GmbH- H0500-550	Hücre kültürü solüsyonları hazırlandı
Tripan mavisi	Sigma Aldrich- T8154	Hücre sayımında kullanıldı
Dimetil sülfoksit (DMSO)	PanReac AppliChem- A3672,0250	Inhibitörlerin çözgeni ve hücre dondurma çözeltisinde kullanıldı
WST-1 reaktifi	Roche- 05015944001	Hücre proliferasyon analiz reaktifi
FastStart Essential DNA Green Master	Roche-06402712001	PCR reaksiyonları için gerekli enzim ve belirteç karışımı

EvoScript Universal cDNA Master	Roche- 07912374001	cDNA sentez kiti
NucleoSpin RNA Mini Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH- 740955.50	RNA izolasyon kiti
Primer Universal Optimize	Roche- 330001	PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere primerler
Trypsin-EDTA (0.05 %) in DPBS (1x)	Cegrogen Biotech GmbH- N0100-720	Hücrelerin pasajlanmasında kullanıldı

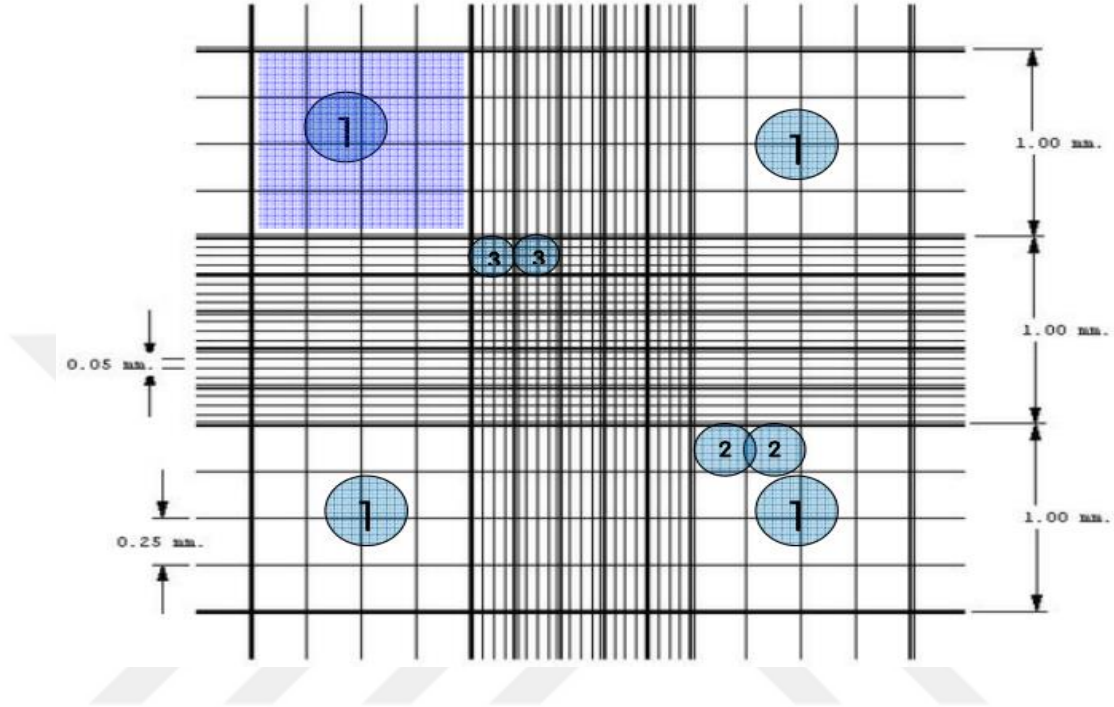
3.6.1 Hücre Kültürü

Deneyisel glioblastoma hücre hattı olan U87-MG (ATCC® HTB-14), American Type Culture Collection (ATCC)’den satın alındı. U87-MG hücre hattı, glioblastoma hastası erkekten izole edilen, epitelyal- astrosit morfolojiye sahip hücredir. CDKN2A (c.1_471del471) ve PTEN (c.209+1G>T) tumor baskılayıcı genlerinde mutasyon gözlenir (64).

U87-MG hücreleri deneyde kullanılmak üzere hücre kültür flasklarında çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltılması için ve deneylerde %10 fetal sığır serumu (Fetal bovine serum- FBS), %1 Penisilin-streptomisin, %1 esansiyel-olmayan amino asit (Non-essential aminoacid- nea) ve %1 L-glutamin ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 4,5 g/L glucose)’den oluşan kültür ortamı kullanıldı. Hücreler 37°C’de 5% CO₂ içeren inkübatör ortamında haftada 2-3 kez hücre kültür ortamı yenisi ile değiştirilerek çoğaltıldı. Hücreler %80-90 konfluensiye ulaştıklarında pasajlama yapıldı. Pasajlama için 25 cm²’lik flaskta bulunan hücrelerin üzerine 1 ml %0.05’lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37°C %5 CO₂’li inkübatörde 2-3 dakika bekletildi. Tripsin-EDTA ile hücrelerin yüzeye yapışma proteinleri kesilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Tripsin-EDTA aktivitesinin kesmek için flaska 2 ml kadar hücre kültür ortamı eklendi ve tüplere alınan hücreler 1500 rpm +4°C’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj ardından, hücre pelleti taze kültür ortamı ile çözdürüldü ve bir kısmı yeni flaska ekildi. Bir kısmı deneylerde kullanabilmek üzere %10 DMSO içeren FBS çözeltisinde çözdürüldü ve -145 derin dondurucuda saklandı.

Hücrelerin sayımı tripan mavisi ile seyreltilen hücre süspansiyonunun hemocytometer ile şemada gösterilen şekilde sayılarak aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı:

$$1\text{ml'deki hücre sayısı} = \text{sayılan bölgelerin ortalama sayısı} \times \text{seyreltme katsayısı} \times 10^4$$



Şekil 3. Hemocytometer sayım yapılan kareleri (Toplam görüş sahası) (65)

3.6.2 Hücrelerin Robotnikinin ve Vismodegib ile Muamelesi

C25H27ClN2O4 molekül formüllü Robotnikinin (1923-1) (Biovision, Milpitas, USA) DMSO içinde ana stok konsantrasyonu 7,5 mM olacak şekilde, C19H14Cl2N2O3S molekül formüllü Vismodegib (GDC-0449) (Selleckchem, Texas, USA) DMSO içinde ana stok konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde çözüldü. Hücreler farklı konsantrasyonlarda robotnikinin (2-10-25-50-75 μM) ve vismodegib (10-25-50-75-100 μM) ile 48 saat muamele edildi.

3.6.3 WST-1 Spektrofotometrik Hücre Proliferasyon/Canlılık Testi

Hücrelerin proliferasyon/canlılık oranını analiz etmek için tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliğine dayalı spektrofotometrik analiz WST-1 hücre proliferasyon reaktifi [2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-

tetrazolyum] kullanılarak yapıldı. WST-1 (stabil tetrazolyum tuzu) canlı hücrelerden glikolitik yolla üretilen NAD(P)H'ın mitokondrinin solunum zincirine ait olan ve sadece metabolik olarak bozulmamış hücrelerde aktif olan süksinat-tetrazolyum redüktaz sistemi (EC 1.3.99.1) tarafından formazana bölünmesi sonucu renk değişimi gerçekleşir. Gerçekleşen bu renk değişiminin spektrofotometreler ile absorbans ölçümü sonucu hücre proliferasyon ve canlılığı hakkında bilgi alınır.

Bu analiz için çalışmada kullanılan U87-MG hücreleri 96 kuyucuklu platelere 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve hücrelerin yüzeye tutunması için 37°C'de CO₂ etüvde inkübe edildi. Hücreler yüzeye tutunduktan sonra yüzde 50 öldürme oranını (IC₅₀) tespit edebilmek için hücrelerin üzerindeki büyüme ortamı çekildi ve farklı dozlarda robotnikinin ve vismodegib içeren taze büyüme ortamları eklendi. Bu süreçte kontrol grubu olarak kullanılan hücrelerin bir kısmına DMSO eklendi, bir kısmına ise hiçbir işlem yapılmadı. 48 saat sonunda hücrelerin üzerine 1:10 oranında WST-1 reaktifi eklendi ve 2 saat boyunca inkübe edildi. Bu inkübasyon süresinden sonra, oluşan formazan boyası Varioskan™ LUX multimode microplate okuyucuda 430/650 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.6.4 Gen Ekspresyon Analizi [Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time qPCR)]

48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda robotnikinin (2-10-25-50-75 µM) ve vismodegib (10-25-50-75-100 µM) ile muamele edilen hücreler hedgehog sinyal yolu proteinlerinde gerçekleşen mRNA düzeyinde ekspresyon farklılıklarının incelenebilmesi için gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda elde edilen Ct değerleri ile karşılaştırma grafikleri oluşturuldu.

qPCR analizleri için öncelikli olarak deney gruplarındaki hücrelerden RNA izolasyonu NucleoSpin RNA Mini Kit ile gerçekleştirildi. Hücreler 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda robotnikinin ve vismodegib ile muamele edildikten sonra Tripsin-EDTA ile tutundukları yüzeylerden kaldırıldı. Elde edilen hücre pelleti 1 ml PBS içinde çözülerek santrifüjlendi ve bu şekilde pellet hücre kültür ortamından tamamen arındırıldı. Elde edilen pellet 1:10 oranında liziz tamponu içinde çözünmüş β-merkaptoetanol ile tekrar çözülerek hücre lizat çemberinde 1 dakika boyunca

11000xg'de santrifüjlendi. Lizat çemberi ortamdan uzaklaştırıldı, çöken sıvı içine 350 µL %70 etanol çözeltisi eklendi ve membranlı RNA izolasyon tüplerine konularak tekrar santrifüjlendi. Altta kalan sıvı ortamdan uzaklaştırıldı ve membran üzerine MDB 350 µl tamponu eklenerek tekrar santrifüjlendi. Tekrar altta kalan sıvı ortamdan uzaklaştırıldı ve 1:10 oranında reaksiyon tamponu içinde çözünmüş rDNase enzimi RNA izolasyon tüpündeki membran üzerine doğrudan konuldu ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon ardından reaksiyon sonlandırma tamponu ile sonlandırıldı ve yıkama tamponları ile membran yıkamaları yapıldı. Yıkamalar sonunda izole edilen RNA RNase-free su eklenerek membranda elüe edildi. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflık oranı (OD A260/A280) NanoDrop200C cihazında hesaplandı.

Konsantrasyonu belirlenen RNA örneklerinden 1000 ng RNA alındı ve Evoscript universal cDNA sentez kiti (Roche, Basel, Swiss) kullanılarak cDNA elde edildi. 1000 ng RNAnın üzerine kit içinde bulunan tampon 1:4 oranında DNase free su ile seyreltilerek 5 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda cDNA sentez enzimi 1:10 oranında seyreltilmiş olacak şekilde reaksiyon tüpüne eklendi. Reaksiyon tüpleri ısı döngüsü cihazında (Thermal Cycler-EuroClone, Pero MI, Italy) 15 dk 42, 5 dk 85 oC, 15 dk 65 oC ve en son 4oC'de reaksiyon gerçekleştirildi. Elde edilen 20 µL cDNA solüsyonu DNase/Rnase içermeyen su ile 5 kat seyreltilerek vorteks ve spin ardından qPCR reaksiyonuna hazırlandı. Reaksiyonda kullanılmayan cDNA'lar -20 derin dondurucu da gelecek reaksiyonlar ve tekrarlar için saklandı.

PCRda kullanılmak üzere satın alınan hedgehog sinyal yolu primerleri (Gli1, Smo, Ptch1) ve housekeeping gen primeri Gapdh son konsantrasyon 100 µM olacak şekilde DNase/Rnase içermeyen su içinde çözüldü. Çözülen her bir gen bölgesine ait reverse ve forward primerler 1:1 oranında karıştırılıp DNase/Rnase içermeyen su ile 1:5 oranında seyreltilti. Elde edilen primer karışımlarının her biri 20 µl olacak şekilde porsiyonlandı.

PRC reaksiyonu yeşil floresans tabanlı enzim karışımı ile oluşturuldu, bunun için 10:1:6,5:2,5 oranında sırasıyla green master karışım, primer karışımı, PCR grade su ve cDNA eklenen PCR tüpleri primerlere göre optimize belirlenen döngü sayısı ve ısı tablosuna göre PCR cihazında (Qiagen-Rotor Gene Q, Hilden, Germany)

deteksiyon format olarak SYBR Green /HRM seçilerek 40 döngü şeklinde çalıştırıldı. Negatif kontrol olarak cDNA eklenmeyen örnek grubu kullanıldı. Örnekler cihaz yazılımına girildikten sonra referans gen Gapdh seçilerek relatif kantitasyon yapabilmek için Δ/Δ Ct metodu kullanıldı.

Tablo 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ısı döngüsü

	Denaturasyon	Amplifikasyon	Erime Eğrisi	Soğutma
Sıcaklık (°C)	95	95-60-72	95-60-95	40
Süre (dak:sn)	10:00	00:15-00:20-00:30	00:30-02:00-:00:30	00:30

Reaksiyon sonunda amplifiye edilen örneklerin saflıkları agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. Elektroforez için TBE (1x) tamponu içinde %1,5 agaroz jel karışımı hazırlandı ve GelRed® (1x) eklenerek elektroforez kalıbına döküldü. Yaklaşık 1 saat donması beklenen jel 1 saat sonunda TBE (1x) ile dolu elektroforez tankına alındı ve yükleme boyası (1x) ile karıştırılan örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez cihazı (BURAYA MARKA YAZILACAK) 100 volt, 300 miliamper ve 300 watt gücünde 2 saat çalıştırıldı. Elektroforez bittikten sonra agaroz jel ultraviyole ışınları altında görüntülenerek safsızlık değerlendirilmesi yapıldı ve örneklerin büyüklükleri (bp cinsinden) DNA ladder ile kıyaslanarak kontrol edildi.

Tablo 5. Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan RT-qPCR’da kullanılan primer listesi

Primer Adı	5'→3'
GLI1	F: CCA CCA AGC TAA CCT CAT GTC RTM: CCC GCT TCT TGG TCA ACT T
SMO	F: CAA GCT CGT GCT CTG GTC RTM: ATT CTC ACA CTT GGG CAT GTA
PTCH1	F: AGC TGT GGG TGG AAG TTG RTM: AGG ATT AAA CAT AGC CTC TTC TCC
GAPDH	F: CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC A RTM: ATG ACA AGC TTC CCG TTC TC

3.6.5 Yara İyileşmesi

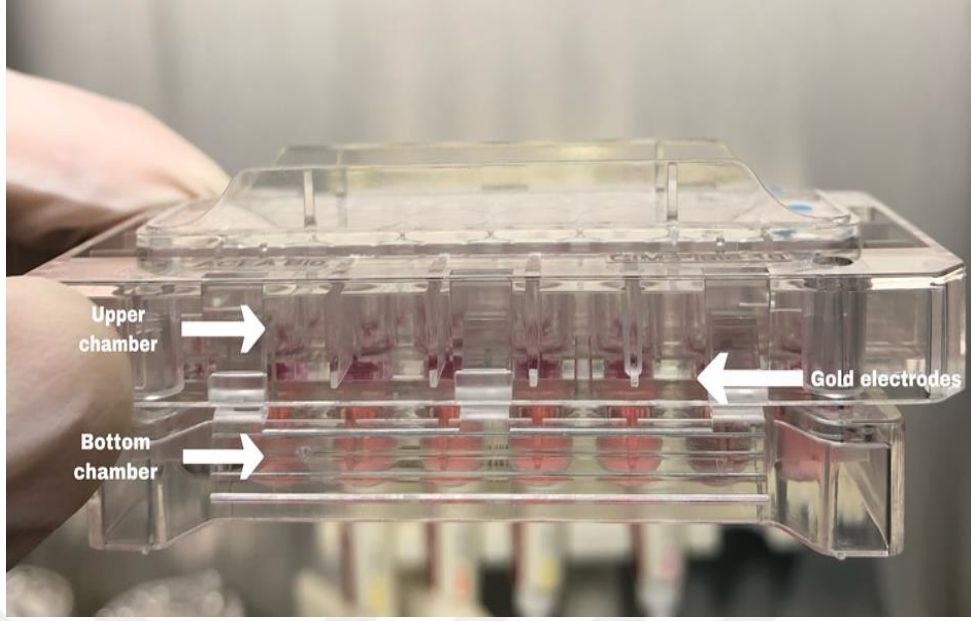
Kanser hücrelerinin migrasyon düzeyini belirlemek için yara iyileşmedi modeli çalışıldı. Bu modelde öncelikli olarak hücreler 6 kuyucuklu platelere 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve hücre konfluensi durumunun %80-90 olması için 3 gün boyunca 37°C’de CO₂ etüvde inkübe edildi. Yeterli konfluensiye ulaşıldıktan sonra her bir kuyucuk tam ortasına denk gelecek şekilde steril pipet ucu ile kuyucuk çapı boyunca çizilerek yara oluşturuldu. Kuyucuklar PBS ile yıkandı ve ardından farklı konsantrasyonlarda robotnikinin ve vismodegib içeren hücre kültür ortamları eklendi, kontrol grubu olarak kullanılan hücrelere hiçbir işlem uygulanmadı. 48 saat boyunca 6 saatte bir inverted mikroskop (Zeiss- Vert.A1, Jena, Germany) ile görüntü alınarak yara kapanması izlendi. Görüntüler LSM Software Zen 2 (Blue Edition) yazılımı kullanılarak analizlendi. Analizden elde edilen verilerin aşağıdaki eşitliğe yazılması ile yara kapanması bulundu:

$$\% \text{ Yara kapanması} = [\text{Yara açıklığı (0.saat)} - \text{Yara açıklığı (x.saat)}] / \text{Yara açıklığı (0.saat)} \times 100$$

3.6.6. Gerçek Zamanlı Hücre İnvazyon Analizi

U87-MG hücre hattında ilaç tedavilerine bağlı hücrede gerçekleşen invaziv farklılıkları analizlemek amacıyla Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi-xCELLigence RTCA DP cihazında (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ve bu sisteme uyumlu 16 kuyucuklu CIM-16 plate kullanılarak hücre invazyon deneyleri gerçekleştirildi. Kullanılan CIM-16 plateler 2 farklı bölümden oluşur. Platein üst kısmına 20 µL 1:40 oranında serumsuz hücre kültür ortamı içinde seyreltilmiş matrijel matriks koyuldu ve 4 saat boyunca 37°C etüvde tamamen jel formuna gelmesi için bekledi. Matrijel -20°C’de donmuş, +4°C’de sıvı ve 37°C’de jel formundadır, bu nedenle matrijel ile deney yapılırken bu sıcaklık aralıklarına uygun çalışıldı. Matrijel tamamen jelleştikten sonra platein alt kısmına 160 µL hücre kültür ortamı eklendi, alt ve üst kısım birleştirildi ve 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonunda üst kısma 30 µL serumsuz kültür ortamı eklendi ve cihaza koyulup background ölçümü alındı. Ölçüm sonrasında kuyucukların üst kısmına 30 µL (10.000 hücre/kuyucuk) serumsuz kültür ortamında hazırlanmış hücre süspansiyonu ve 80 µL serumsuz kültür ortamında hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda robotnikinin ve vismodegib çözeltileri eklendi. Plateler 30 dakika boyunca laminar hücre kültürü kabininde bekletildi ve ardından cihaza konularak 100 saat boyunca 15 dakikada bir ölçümler alınarak analiz tamamlandı.

16 kuyucuklu CIM platelerde alt ve üst kısmın birleşim katmanında altın elektrotlar bulunur, plate Şekil 4’te verilmiştir. Hücre invazyon analizi için elektrotların bulunduğu katmanın hemen üstüne ekstraselüler matriks (ECM)-matrigel eklenir. Cihaz, hücrelerin invaziv karakterlerini hücrelerin ekstraselüler matriks (ECM)’ten geçiş esnasında altın elektrotlardan alınan sinyallere dayalı olarak verir.



Şekil 4. Üst kuyucukların tabanına (upper chamber) serumsuz kültür ortamı içinde seyreltilen matrijel ve yine serumsuz kültür ortamında hazırlanan hücreler ve ilaç eklenir, alt kuyucuklara (bottom chamber) %10 FBS içeren kültür ortamı koyulur. Hücrelerin kemoatraktana karşı göçü iki kısım arasında bulunan altın elektrotlarda oluşan empedans değişimine göre ölçülür.

3.6.7 Proliferasyon İmmünfloresan Boyama (Ki-67 Boyama)

Ki-67 hücre siklusunda G0 fazı dışında eksprese edilen nükleer bir proteindir ve proliferen olan hücreleri gösteren belirteç olarak kullanılmaktadır.

Hücrelerde immünfloresan tabanlı proliferasyon ölçümü yapabilmek amacıyla poliklonal Ki-67 antikoru (abcam, Cambridge, United Kingdom) ve antikora uygun sekonder alındı. İmmünfloresan boyama yapılabilmesi için hücreler bölünmüş 8 kuyucuklu lam tabakalara (Chambered Cell Culture Slides) (Falcon, ABD) 15.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 2 gün boyunca 37°C'de CO₂ etüvde yüzeye tutunmaları beklendi. 2 gün sonunda hücrelere farklı konsantrasyonlar robotnikinin ve vismodegib molekül çözeltileri verildi ve hücreler 48 saat boyunca bu ilaç çözeltileri ile muamele edildi, kontrol grubu olarak kullanılan gruba sadece taze hücre kültür ortamı verildi. 48 saat sonunda hücrelerin üzerinden ilaçlı-ilaçsız kültür ortamları çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. PBS içinde son konsantrasyonu %4 olan

paraformaldehit çözeltisi kuyucuklara konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek hücrelerin lam yüzeyine fiksasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi bitince kuyucuklar 3*5 dakika soğuk PBS ile yıkandı. Yıkamaların ardından permeabilizasyon için kuyucuklara PBS içinde son konsantrasyonu %0.1 olan Triton X-100 çözeltisi eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklar 3*5 dakika PBS ile yıkandı. İstenmeyen-hedeflenmeyen proteinlerin boyama sırasında bloke edilebilmesi için kuyucuklara %0.1 Tween 20 içeren PBS içinde son konsantrasyonu %1 olan sığır albümini çözeltisi (BSA) içeren bloklama tamponu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bloklama tamponu içinde Ki-67 primer antikoru son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde çözüldü ve kuyucuklara eklendi. 1 gece boyunca +4°C’de inkübe edildi. Ertesi gün kuyucuklar 3*5 dakika PBS ile yıkandı. Kullanılan Ki-67 antikorunun tavşan olması nedeniyle, sekonder antikor seçimi anti-tavşan olmasına göre yapıldı bunun için AlexaFluor568 sekonder antikoru bloklama tamponu içinde 1:1000 seyreltme ile çözdürüldü ve kuyucuklara eklendi. 2 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklar 3*5 dakika PBS ile yıkandı ve LSM 800 konfokal mikroskopta (Zeiss, Jena, Germany) uygun dalga boyu seçilerek görüntüler alındı. Alınan görüntüler LSM Software Zen 2 (Blue Edition) yazılımında floresan ışık yoğunluklarına göre analizlendi.

3.6.8 Sitoiskelet Elemanları İmmunfloresan Boyama (Phalloidin Boyama)

Ki-67 proliferasyon boyaması gerçekleştirilen plakalar görüntüler alındıktan sonra sitoskelet elemanlarının boyaması için phalloidin kullanıldı. Hazırlanan plakalarda her bir kuyucuğa PBS içinde 1:40 oranında seyreltilen AlexaFluor647 phalloidin boyası eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklar 3*5 dakika PBS ile yıkandı ve LSM 800 konfokal mikroskopta (Zeiss, Jena, Germany) uygun dalga boyu seçilerek hem sadece aktin hem de proliferasyon ve aktin görüntülerinin birleştirilmiş şekilde görüntüleri alındı. Alınan görüntüler LSM Software Zen 2 (Blue Edition) yazılımında floresan ışık yoğunluklarına göre analizlendi.

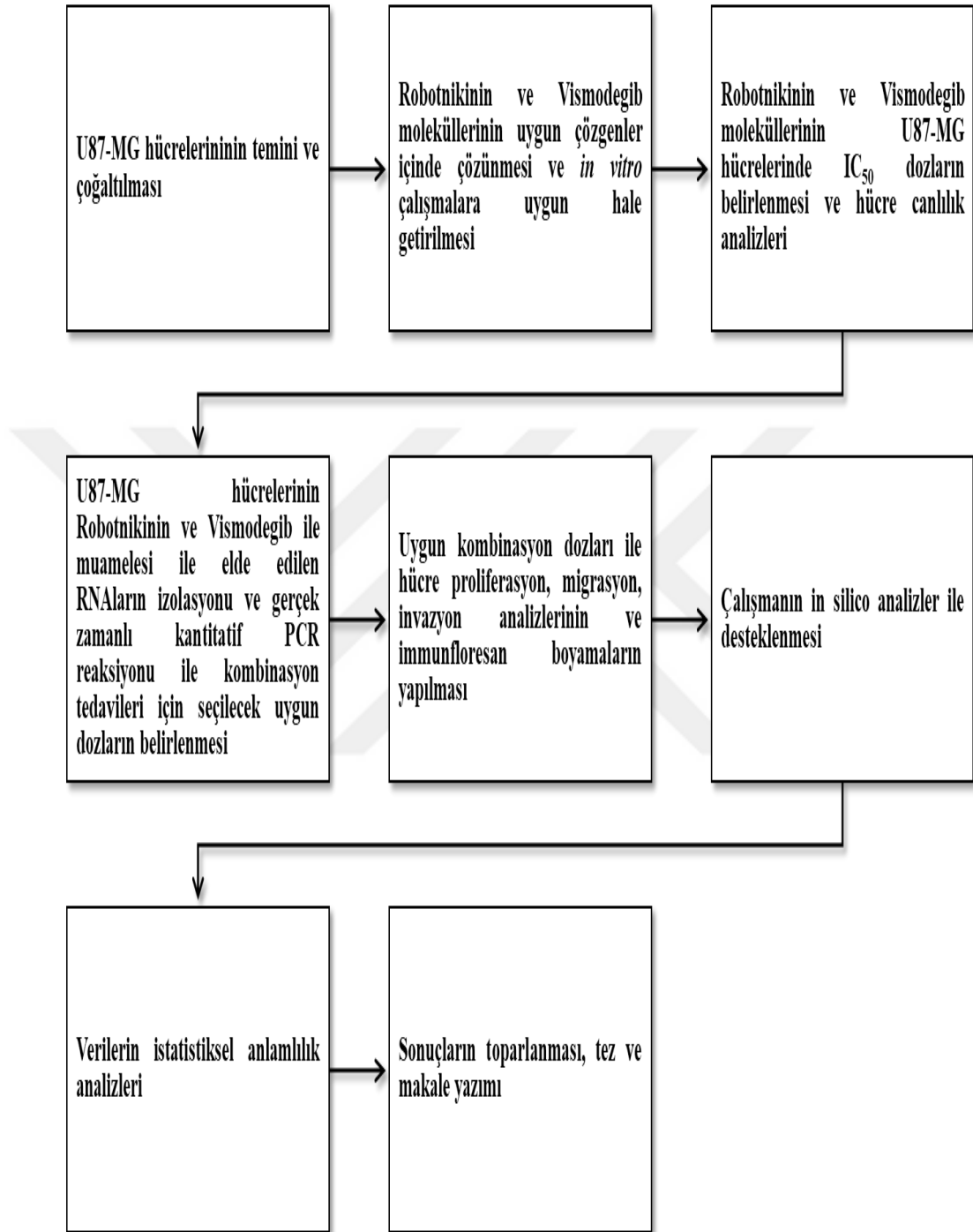
3.6.9 In Silico İlaç Benzerlik Analizleri

Robotnikinin ve vismodegib moleküllerine ait moleküler ‘Canonical SMILES’ formül şeklinde PubChem (56) veritabanından çekildi. Elde edilen sonuçlar İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü'nün Moleküler Modelleme Grubu tarafından geliştirilen Swiss ADME web aracında biyo uygunluk ve farmakokinetik özelliklerinin değerlendirilmesi ve Swiss Target Prediction web aracında potansiyel hedef tahmini analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanıldı.

Swiss ADME web aracında moleküllere ait molekül ağırlığı, polaritesi, çözünübilirliği, esnekliği, kan beyin bariyerinden geçişi ve gastrointestinal sistemde absorpsiyonu gibi kavramları incelenerek molekülün ilaç benzerliği konusunda analizler gerçekleştirildi.

Swiss Target Prediction web aracında ise moleküllerin 2 boyutlu ve 3 boyutlu protein hedef dizilerine karşı yüksek etkinliğinin olacağı, bilinen olası hedeflerinin analizleri Tanimoto katsayısının belirlenmesi ile gerçekleştirildi.

3.7 Araştırma Planı



3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

IBM SPSS 25.0 (Armonk, NY) paket programı ile verilerin istatistiksel analizi değerlendirildi. Ölçümle belirtilen değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma, median (ortanca), minimum-maksimum ile sayımla belirtilen değişkenler yüzde dağılım ile özetlendi. Hücre kültüründe bağımsız 2 deney grubu arasındaki anlamlılığın değerlendirilmesi için non-parametrik Mann Whitney U testi; bağımlı 2 değişken arasındaki anlamlılığın değerlendirilebilmesi için non-parametrik Wilcoxon testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ kullanıldı.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

İn vitro olarak yapılan bu çalışmada Hh yolunun inhibisyonunun robotnikinin ve vismodegib ajanları ile sağlanabildiği gösterilmekle birlikte çalışmanın kliniğe translasyonu için gerekli gen analizlerinin tamamı yapılamamıştır. Benzer şekilde çalışmanın translasyonu için *in silico* araştırmalar genişletilmeli ve çalışma *in vivo* olarak da denenmelidir.

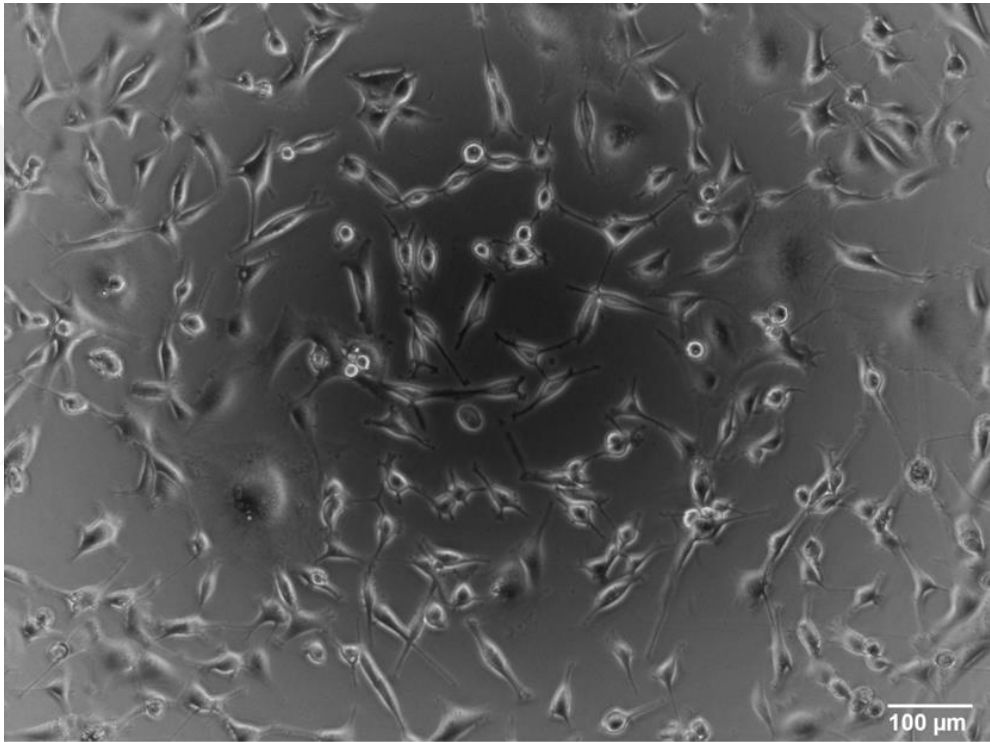
3.10 Etik Kurul Onayı

09.11.2020 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulundan 4918-GOA protokol numaralı 2020/27-41 karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır (Ek 1).

4. BULGULAR

4.1 U87-MG Glioblastoma Hücrelerinin Kültür Edilmesi ve Morfolojilerinin Gözlemlenmesi

U87-MG hücre hattı üretici olan firmanın yönergesi doğrultusunda kültür edildi. Hücrelerin kültür edilmesi süresince her 4 günde bir kültür ortamı indikatör değişimi gözlenerek değiştirildi. Elde edilen hücreler tez çalışması süresince kullanılmak üzere uygun koşullarda saklandı.



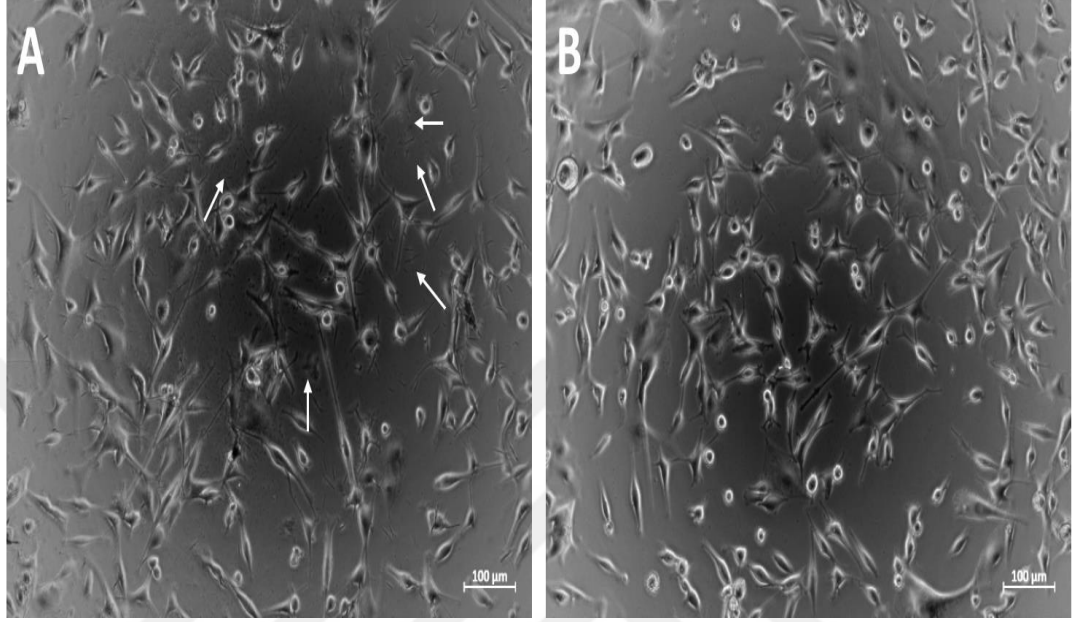
Şekil 5. U87-MG hücrelerinin yüzeye tutunduktan sonra alınan görüntü (10x), Ölçek 100 µm'dir.

4.2. U87-MG Glioblastoma Hücrelerinin Robotnikinin ve Vismodegib ile Kültür Edilmesi ve Morfolojilerinin Gözlenmesi

Robotnikinin molekülü ürün reçetesinde yazdığı gibi ana stok konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde DMSO içinde çözüldü. Şekil 6'da verildiği gibi molekül belirtilen konsantrasyonda DMSO içinde tam çözünmedi. Bu nedenle ana stok

konsantrasyonu 7,5 mM olacak şekilde düzenlenen ve ısı ile çözünme kapasitesi artmış robotnikinin hücre kültürü deneylerinde kullanıldı.

Vismodegib molekülünde ise herhangi bir çözünme problemi yaşanmadı.



Şekil 6. A) 100 µM Robotnikinin ile muamele edilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü, molekülün çözünme problemi oklarla gösterilmiştir, artan dozlarda artan çözelti kalıntıları tespit edilmiştir. B) 100 µM Vismodegib ile muamele edilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü, molekülde çözünme problemi olmadığı mikroskopik görüntü ile gösterilmiştir. Ölçek 100 µm'dir.

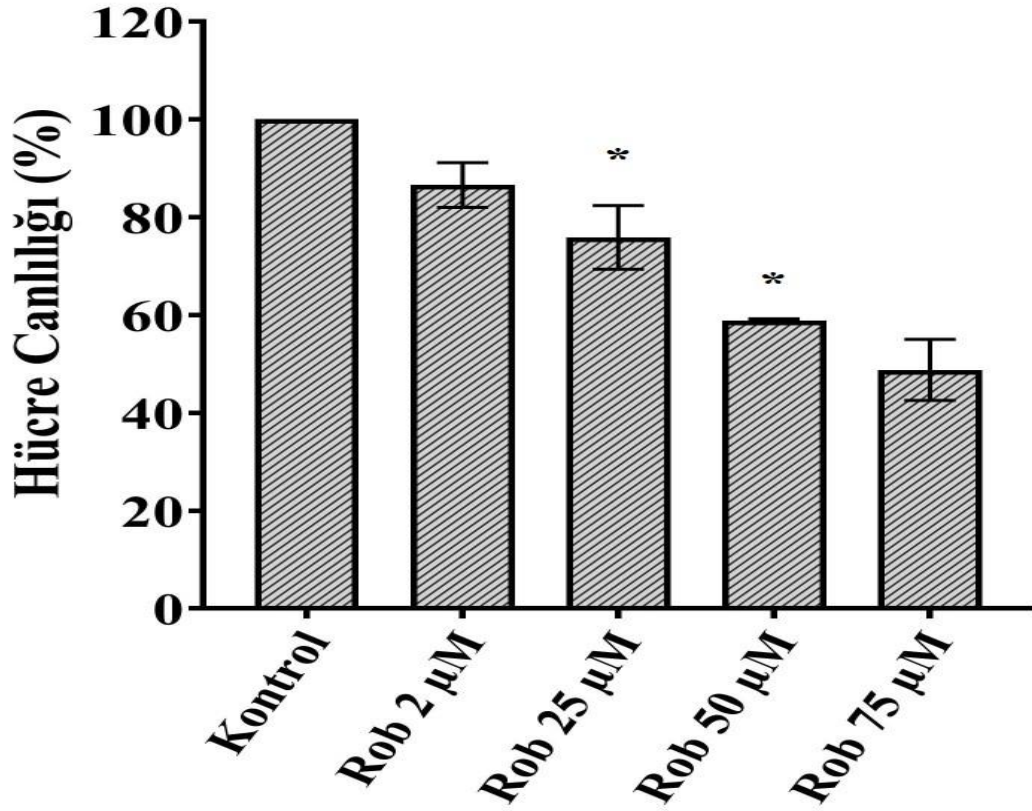
4.3. İnhibitör Uygulamaları Sonucu Hücre Proliferasyon Analizleri ve Canlılıklarının Değerlendirilmesi

Hh sinyal yolağı nihai son proteini olarak hücrede çekirdeğe translokasyonu sağlanan Gli1 gen bölgesi hücrede doğrudan proliferasyonu hedef alan bir proteindir. Bu nedenle Hh yolunu hedefleyen inhibitör ve antagonistlerde etkinliğin ölçülebilmesi için öncelikli olarak hücrenin proliferasyon ve canlılığı değerlendirildi.

İlaç uygulamalarının yapılabilmesi için, ilaçların ve kullanılacak kimyasal maddelerin IC₅₀ dozu (half maximal inhibitory concentration-hücre canlılığını %50 oranında azaltan ilaç konsantrasyonu) belirlenmesi amacıyla U87-MG hücreleri kültür

edilmesi ardından farklı konsantrasyonlarda robotnikinin ve vismodegib ile 48 saat muamele edildi. 4 tekrarlı yapılan deneylerde 48 saat sonrası artan dozlarda azalan hücre canlılığı (doza bağlı) gözlemlendi. Robotnikinin etkinlik gösterdiği doz 25 μM ve sonrası olarak bulunmuştur ve hücre canlılığında 25 μM ve 50 μM dozlarında sırasıyla kontrole göre %25 ve %42 azalma gözlenmiştir. Robotnikinin için IC_{50} değeri yüksek dozlarda DMSO kaynaklı ölüm olması nedeniyle ($>\%1$) *in vitro* koşullarda bulunamamış ve matematiksel eşitlikler ile hesaplanmıştır, robotnikinin için IC_{50} dozu 82 μM olması beklenmektedir.

Tüm verilerde yapılan istatistiksel anlamlılık testinde $p<0,05$ anlamlılık düzeyi seçilmiştir ve tüm veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

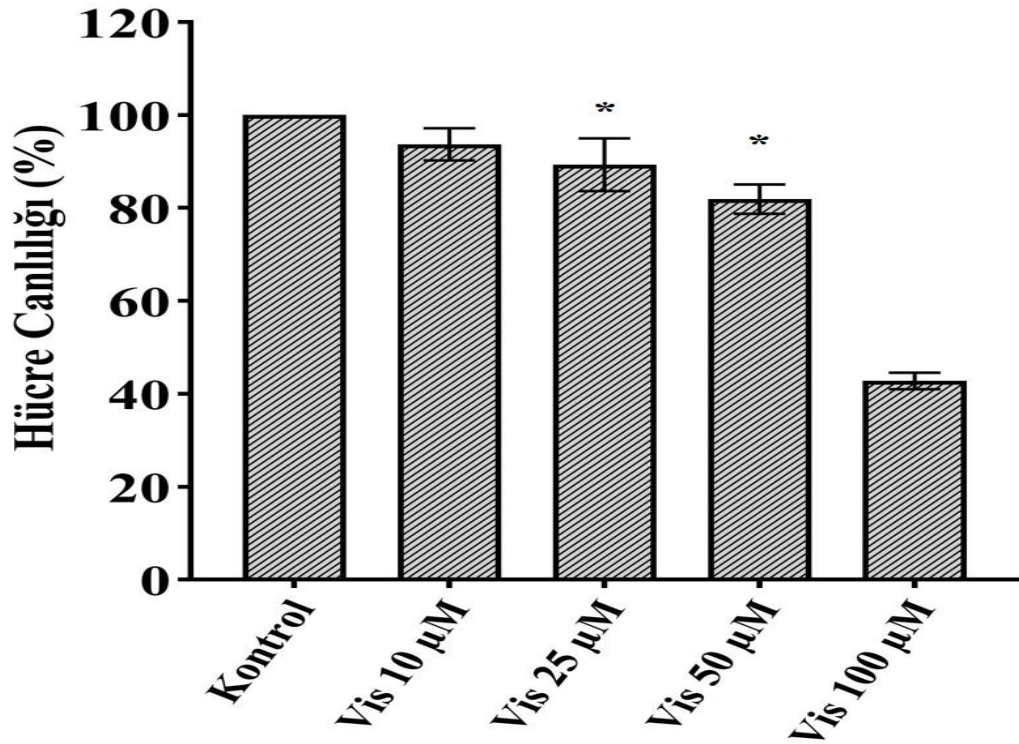


Şekil 7. 48 saat boyunca U87-MG hücre hattı üzerinde 2-25-50-75 μM dozlarda uygulanan robotnikinin molekülünün WST-1 analizi sonrası alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı grafiği. İstatistiksel anlamlılık testleri non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. $p<0,05$ olarak seçilmiştir.

Tablo 6. WST-1 analizi sonrası robotnikinin molekülüne ait alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı istatistik verileri.

Gruplar	Ort.	SD	Median	Min	Max	p
Kontrol	100	0	100	100,000	100,000	-
Robotnikinin 2 μM	84,0826	6,46970	83,1764	77,211	92,76	0,014
Robotnikinin 25 μM	75,8509	6,50471	77,5787	66,55	81,70	0,014
Robotnikinin 50 μM	58,8854	0,28658	58,9078	58,54	59,18	0,014
Robotnikinin 75 μM	48,7406	6,23587	48,9549	40,93	56,12	0,014

U87-MG hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda vismodegib ile 48 saat muamelesi sonrasında elde edilen hücre canlılık verilerine göre vismodegibin etkinlik gösterdiği doz 25 μ M ve sonrası olarak bulunmuştur ve hücre canlılığında 25 μ M ve 50 μ M dozlarında sırasıyla kontrole göre %11 ve %20 azalma gözlenmiştir. Vismodegib için IC50 değeri 75 μ M bulunmuştur.

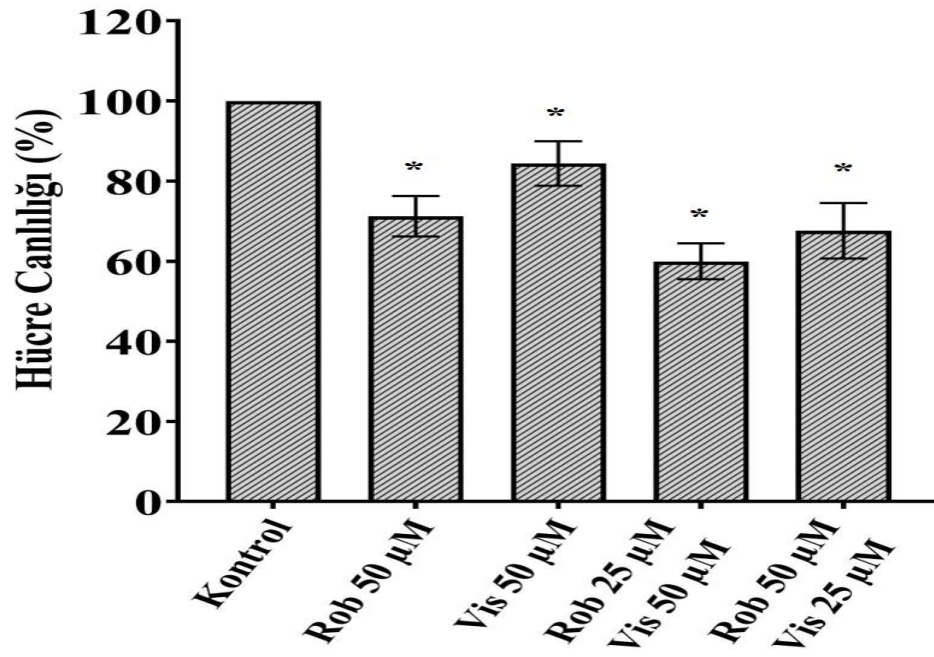


Şekil 8. 48 saat boyunca U87-MG hücre hattı üzerinde 10-25-50-100 μ M dozlarda uygulanan vismodegib molekülünün WST-1 analizi sonrası alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı grafiği. İstatistiksel anlamlılık testleri non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. $p < 0,05$ olarak seçilmiştir.

Tablo 7. WST-1 analizi sonrası vismodegib molekülüne ait alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı istatistik verileri.

Gruplar	Ort.	SD	Median	Min	Max	p
Kontrol	100	0	100	100,000	100,000	-
Vismodegib 10 µM	93,6868	3,48281	92,8898	90,55	98,42	0,014
Vismodegib 25 µM	89,2971	5,66828	90,9940	81,43	93,77	0,014
Vismodegib 50 µM	81,8956	3,14729	81,4258	78,57	86,16	0,014
Vismodegib 100 µM	42,7587	1,79340	43,3176	40,18	44,22	0,014

Hücre canlılığının sabit kaldığı dozlarda kombine uygulama yapıldığında ise ilaçların birbirleri ile inhibisyon etkilerini arttırarak tek başına her iki dozdan daha yüksek inhibitör etki sağladığı görülmüştür. Kombinasyon 1 olarak 25 µM robotnikinin ve 50 µM vismodegib birlikte kullanılmıştır. Kombinasyon 2 olarak 50 µM robotnikinin ve 25 µM vismodegib kullanılmıştır. Kombinasyon 1 kullanıldığında hücre canlılığında anlamlı bir düşüş gözlenirken kombinasyon kullanıldığında sadece 50 µM robotnikinin kullanımına göre hücre canlılığında anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir. Kombinasyon uygulamalarında hücre canlılığında kombinasyon 1 ve kombinasyon 2de sırasıyla kontrole göre %40 ve %33 azalma gözlenmiştir.



Şekil 9. 48 saat boyunca U87-MG hücre hattı üzerinde farklı dozlarda uygulanan robotnikinin ve vismodegib moleküllerinin WST-1 analizi sonrası alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı grafiği. Kombinasyon 1: Robotnikinin 25 µM+Vismodegib 50 µM, Kombinasyon 2: Robotnikinin 50 µM+Vismodegib 25 µM. İstatistiksel anlamlılık testleri non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. $p < 0,05$ olarak seçilmiştir.

Tablo 8. WST-1 analizi sonrası farklı dozlarda uygulanan robotnikinin ve vismodegib moleküllerinin kombinasyon uygulamalarına ait alınan sonuçlara göre yapılan hücre canlılığı istatistik verileri.

Gruplar	Ort.	SD	Median	Min	Max	p
Kontrol	100	0	100	100,000	100,000	-
Kombinasyon 1	59,9649	4,48096	61,4879	53,62	63,27	0,014 0,021**
Kombinasyon 2	67,6073	6,92816	69,2725	58,18	73,70	0,014 0,7**

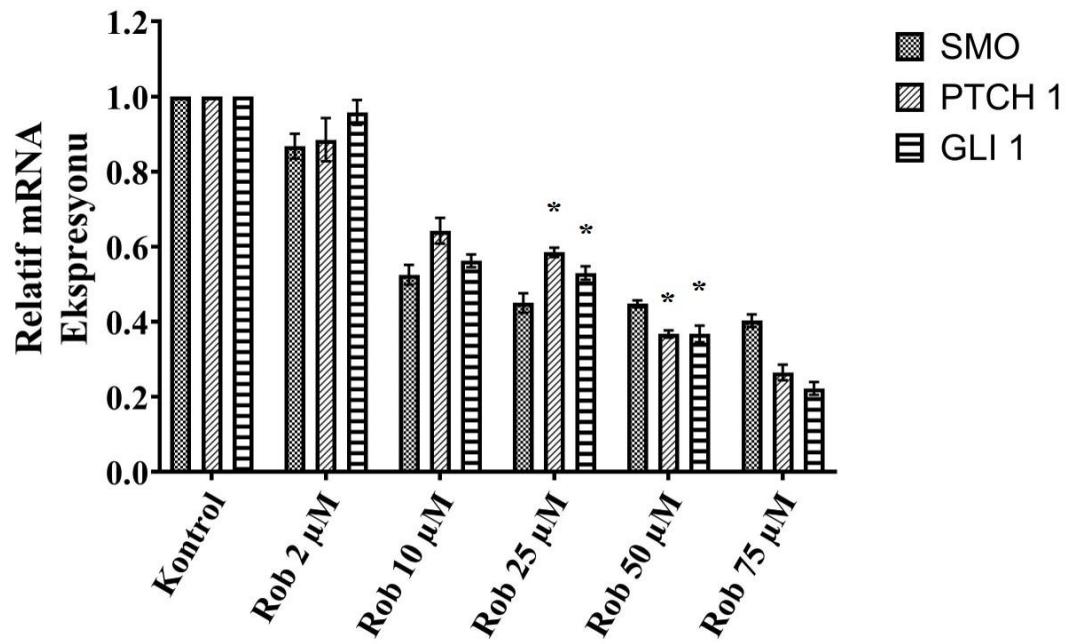
4.4 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizlerinin Sonuçları

Kullanılan kit protokolüne uygun bir şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Nanodrop ile A260/280 oranı uygun safsızlık aralığında bulundu. Safsızlık ölçümü ardından konsantrasyonu hesaplanan RNAlardan 1000ng alınarak cDNA sentez kitine uygun seyreltmeler yapıldı ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sentezi gerçekleştirilen cDNAlar 1/5 oranında DNase/RNase içermeyen PCR Grade su ile seyreltilerek -20°C’de saklandı.

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonları için 10:1:6,5:2,5 oranında sırasıyla green master karışım, primer karışımı, PCR grade su ve cDNA PCR tüplerine alındı ve reaksiyon öncesi uygun döngü sayısına göre ayarlanan gerçek zamanlı kantitatif PCR cihazında 101 dakika boyunca reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda elde edilen Ct değerleri kontrol geni olan GAPDH baz alınarak $\Delta/\Delta Ct$ analizleri gerçekleştirildi.

Robotnikinin uygulanan hücelere ait analizler sonucunda elde edilen relatif mRNA ekspresyon grafiği şekil 10’da verilmiştir. Elde edilen verilere göre etkin robotnikinin ajan dozu Ptch1 geninde oluşan ekspresyon azalmasına göre belirlenmiştir.

Tüm verilerde yapılan istatistiksel anlamlılık testinde $p<0,05$ anlamlılık düzeyi seçilmiştir ve tüm veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



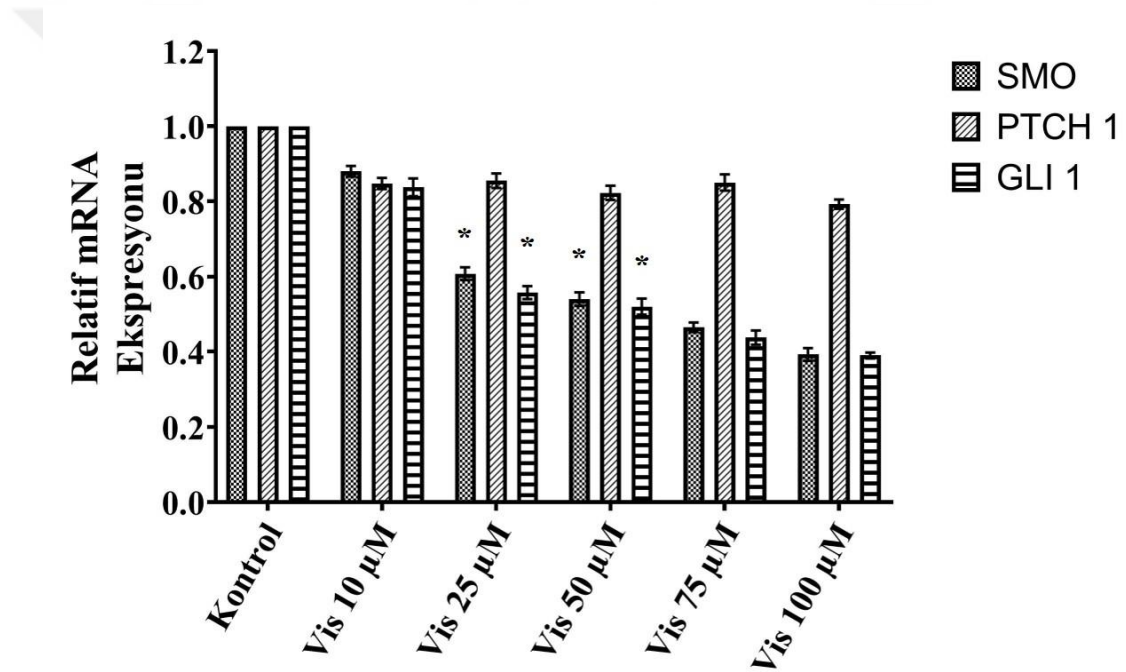
Şekil 10. Farklı dozlarda robotnikinin uygulanan U87-MG hücre hattında kontrol geni olan GAPDH baz alınarak $\Delta/\Delta C_t$ değerine bağlı olarak bulunan relatif mRNA ekspresyon grafiği

Tablo 9. Robotnikinin ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin gerçek zamanlı qPCR analizi sonrası elde edilen verilerin verilerin kontrol geni olan GAPDH baz alınarak $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ değerlerinin oluşturulduğu relatif mRNA ekspresyon istatistik verileri.

Gruplar	Ort.	SD	Median	Min	Max	p
Kontrol	1,00	0	1,00	1,00	1,00	-
Robotnikinin 2 µM						
<i>PTHC1</i>	0,8852	0,05740	0,8807	0,82	0,91	0,014
<i>SMO</i>	0,8649	0,03304	0,8624	0,83	0,96	0,014
<i>GLI1</i>	0,9542	0,03304	0,9517	0,92	1,00	0,014
Robotnikinin 10 µM						
<i>PTHC1</i>	0,6461	0,03403	0,6386	0,61	0,69	0,014
<i>SMO</i>	0,5298	0,02646	0,5248	0,50	0,56	0,014
<i>GLI1</i>	0,5646	0,01708	0,5671	0,54	0,58	0,014
Robotnikinin 25 µM						
<i>PTHC1</i>	0,5816	0,01330	0,5813	0,57	0,60	0,014
<i>SMO</i>	0,4487	0,02582	0,4487	0,42	0,48	0,014
<i>GLI1</i>	0,5336	0,01826	0,5336	0,51	0,55	0,014

Robotnikinin 50 μM							
<i>PTHC1</i>	0,3667	0,00830	0,3660	0,36	0,38	0,014	
<i>SMO</i>	0,4459	0,00957	0,4434	0,44	0,46	0,013	
<i>GLI1</i>	0,3634	0,02217	0,3659	0,34	0,39	0,014	
Robotnikinin 75 μM							
<i>PTHC1</i>	0,2626	0,02082	0,2626	0,24	0,29	0,014	
<i>SMO</i>	0,4034	0,01641	0,4042	0,38	0,42	0,014	
<i>GLI1</i>	0,2265	0,01708	0,2290	0,20	0,24	0,014	

Vismodegib uygulanan hücrelere ait analizler sonucunda elde edilen relatif mRNA ekspresyon grafiği şekil 11’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre etkin vismodegib ajan dozu Smo geninde oluşan ekspresyon azalmasına göre belirlenmiştir.



Şekil 11. Farklı dozlarda vismodegib uygulanan U87-MG hücre hattında kontrol geni olan GAPDH baz alınarak $\Delta/\Delta C_t$ değerine bağlı olarak bulunan relatif mRNA ekspresyon grafiği

Tablo 10. Vismodegib ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin gerçek zamanlı qPCR analizi sonrası elde edilen verilerin kontrol geni olan GAPDH baz alınarak $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ değerlerinin oluşturulduğu relatif mRNA ekspresyon istatistik verileri.

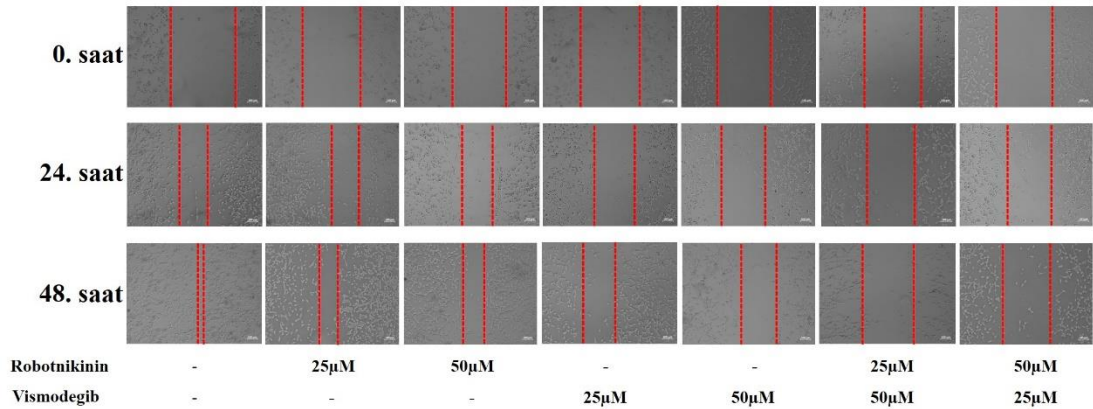
Gruplar	Ort.	SD	Median	Min	Max	p
Kontrol	1,00	0	1,00	1,00	1,00	-
Vismodegib 10 μM						
<i>PTHC1</i>	0,8482	0,01353	0,8495	0,83	0,86	0,014
<i>SMO</i>	0,8801	0,01407	0,8819	0,86	0,89	0,014
<i>GLI1</i>	0,8384	0,02523	0,8322	0,82	0,87	0,014
Vismodegib 25 μM						
<i>PTHC1</i>	0,8547	0,01670	0,8597	0,83	0,87	0,014
<i>SMO</i>	0,6091	0,01938	0,6063	0,59	0,63	0,013
<i>GLI1</i>	0,5601	0,01672	0,5583	0,54	0,58	0,014
Vismodegib 50 μM						
<i>PTHC1</i>	0,8226	0,01654	0,8180	0,81	0,85	0,014
<i>SMO</i>	0,5407	0,01906	0,5401	0,52	0,56	0,014
<i>GLI1</i>	0,5192	0,02101	0,5157	0,50	0,55	0,014
Vismodegib 75 μM						
<i>PTHC1</i>	0,8479	0,01919	0,8519	0,82	0,87	0,014
<i>SMO</i>	0,4669	0,01278	0,4672	0,45	0,48	0,014
<i>GLI1</i>	0,4387	0,01851	0,4449	0,41	0,45	0,014
Vismodegib 100 μM						
<i>PTHC1</i>	0,7943	0,01247	0,7920	0,78	0,81	0,014
<i>SMO</i>	0,3956	0,01738	0,3988	0,37	0,41	0,014
<i>GLI1</i>	0,3920	0,00874	0,3915	0,38	0,40	0,014

Kombinasyon tedavileri için seçilen dozlar ise her iki inhibitörün de etkilediği gen bölgesinde oluşturduğu anlamlı azalma dozları hem de Hh yolu transkripsiyon faktörü olan Gli1 ekspresyonundaki anlamlı azalmalara göre belirlenmiştir. Elde edilen tüm verilere göre kullanılacak kombinasyon değerleri her iki ajan için de 25 μ M ve 50 μ M olarak belirlenerek kombinasyon deney kolları her bir ajanın yüksek dozu ve düşük dozu olarak çaprazlanarak oluşturulmuştur. Gelecek deneylerde devam ettirilen kombinasyon değerleri Kombinasyon 1 için Robotnikinin 25 μ M+Vismodegib 50 μ M ve Kombinasyon 2 için Robotnikinin 50 μ M+Vismodegib 25 μ M kullanılmıştır.

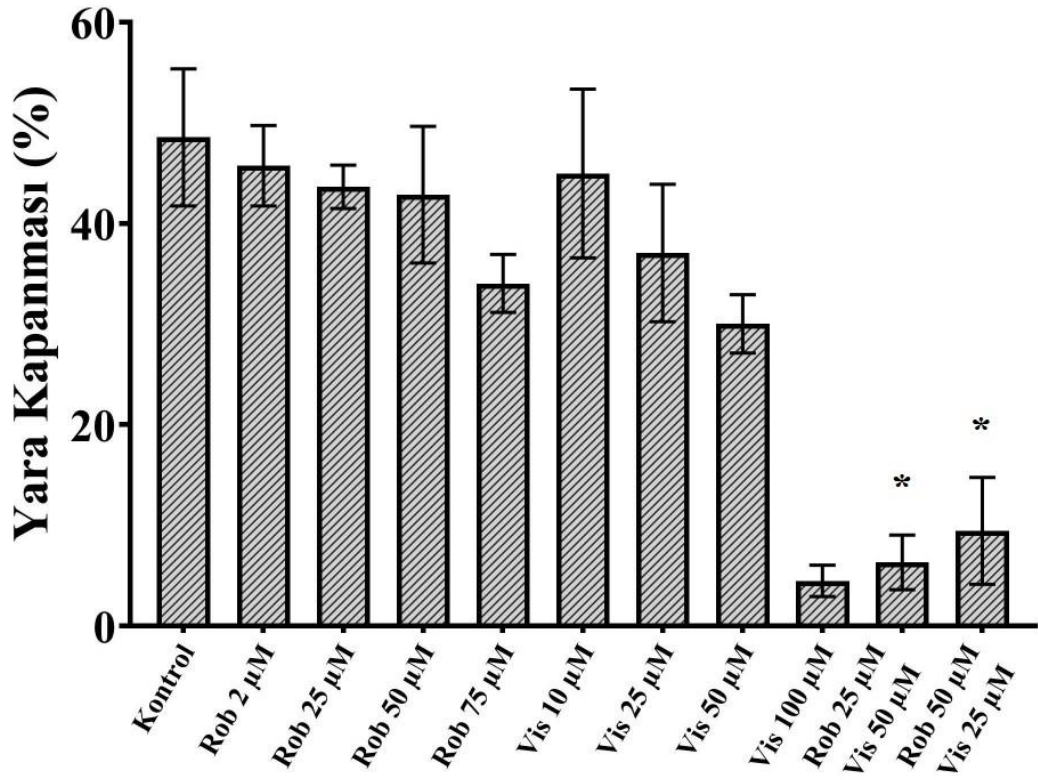
4.5 Yara İyileşmesi Modeli ile Oluşturulmuş Hücre Migrasyon Analizlerinin Sonuçları

Yara modeli oluşturulan ve farklı konsantrasyonda vismodegib ve robotnikinin ile kültür edilen hücrelerde 48 saat boyunca her 6 saatte bir aynı noktalardan mikroskop görüntüsü alındı. Alınan görüntüler arasında 0. 24. 48. saatlere ait kapanma görüntüleri Şekil 12’de verilmiştir. Şekilde verildiği üzere kırmızı ile belirtilen bölgeler yara sınırıdır ve 48. saatte %85’e yakın kapanma gözlenmiştir. Alınan görüntülerde Zen 2 (blue edition) yazılımı kullanılarak yara kapanma mesafesi belirlendi ve yara kapanma oranları 0.an ile kıyaslanarak 12., 24. ve 48. saatlere ait grafikler oluşturuldu. Oluşturulan grafiklerde de belirtildiği gibi kombine ilaç uygulanan gruplarda yara kapanma oranının yüksek oranda sabitlendiği saat 24. saat olarak belirlendi. Farklı oranlarda ilaç uygulaması yapılan kombine tedavilerde hücrelerin migratif özelliklerinde daha etkin azalmanın olduğu grup 25 uM robotnikinin ve 50 uM vismodegib kullanılan kombine tedavi grubu olarak belirlendi.

Tüm verilerde yapılan istatistiksel anlamlılık testinde $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi seçilmiştir ve tüm veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 12. U87-MG hücreleri ile yapılan migrasyon analizinin (yara kapanması) saate bağlı görüntüleri, Ölçek 100 µm’dir.



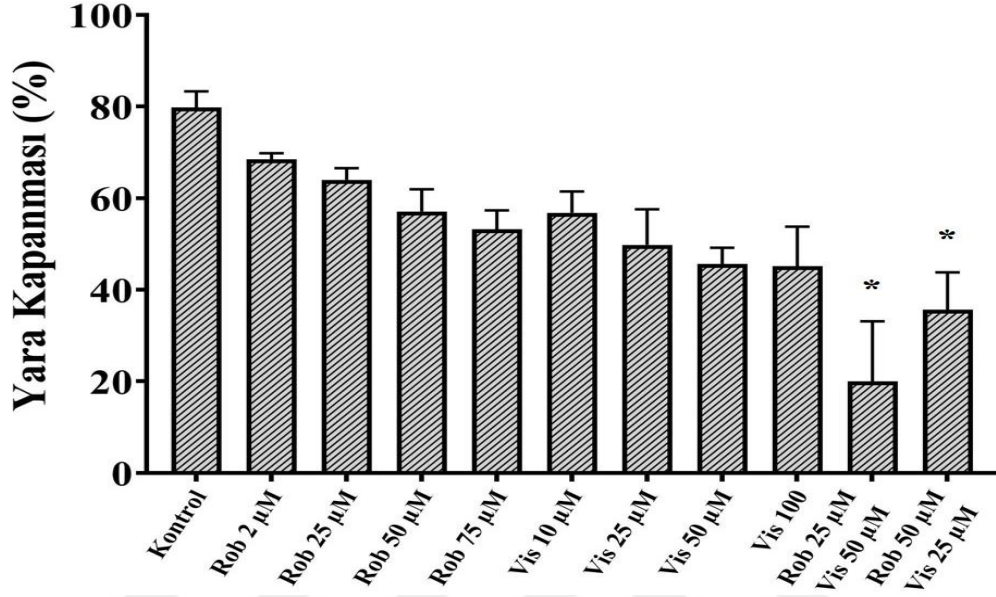
Şekil 13. 0. saat baz alınarak hesaplanan 24. saate ait yara kapanma grafiği

İlaç etkinliğinin 48. Saat ölçülmesi nedeniyle 48. saatte 0. ana göre yaralarda % kapanma uzaklığı ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre robotnikinin 25 µM ve 50 µM dozlarında yara kapanması kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla %80 ve %71,25 bulunmuştur. Vismodegib 25 µM ve 50 µM dozlarında yara kapanması kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla %61,25 ve %56,25 bulunmuştur. Kombinasyon uygulamalarında kombinasyon 1 ve kombinasyon 2de yara kapanması sırasıyla kontrole göre %25 ve %43,75 bulunmuştur.

Bu veriler ışığında kombinasyon 1 içeriğinde bulunan 50 µM vismodegib ile karşılaştırıldığında yara kapanmasını %31 oranında daha fazla engellemiştir. Aynı

şekilde kombinasyon 2 içeriğinde bulunan 50 μ M robotnikinin ile karşılaştırıldığında yara kapanmasını %27 oranında daha fazla engellemiştir.

Yara kapanmasında en yüksek inhibisyon kombinasyon 1 tedavisinde %75 olarak bulunmuştur. İlgili grafik Şekil 14'te verilmiştir.



Şekil 14.0. saat baz alınarak hesaplanan 48. saate ait yara kapanma grafiği

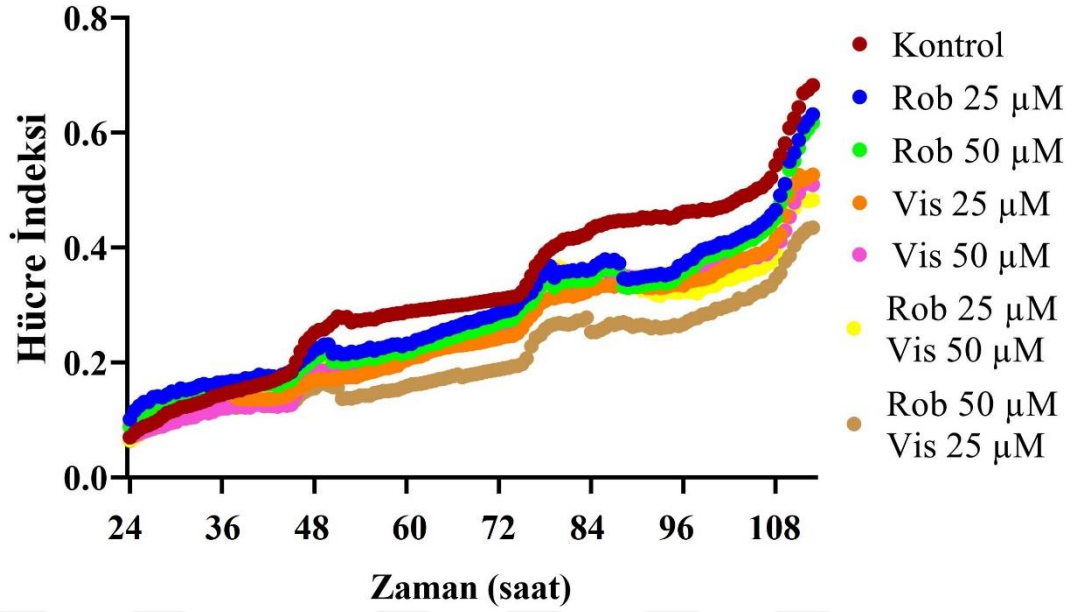
Tablo 11. U87-MG hücre hattında yapılan migrasyon analizinin 48. saatine ait %Yara kapanma verilerinin istatistiksel anlamlılık sonuçlarına ait oluşturulan tablo

Gruplar	Ort.	SD	Median	Min	Max	p
Kontrol	79,7724	3,57982	78,3710	76,99	86,01	-
Robotnikinin 25 μ M	64,0225	2,51647	65,2241	59,79	66,14	0,009
Robotnikinin 50 μ M	57,1049	4,81185	57,3976	51,19	62,55	0,009
Vismodegib 25 μ M	49,8287	7,76284	48,6632	40,94	61,88	0,009
Vismodegib 50 μ M	45,6446	3,51929	45,9815	40,14	49,50	0,009
Kombinasyon 1	20,0014	9,12808	24,6880	16,18	34,85	0,009
Kombinasyon 2	35,5869	8,23500	34,8275	24,27	47,37	0,009
						0,009**
						0,009
						0,009**

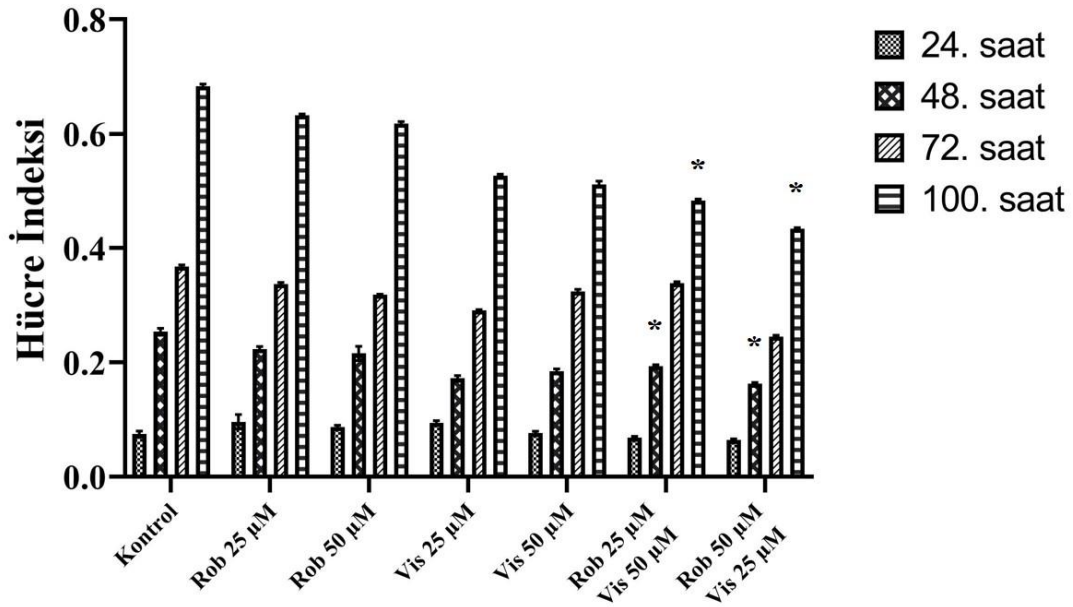
4.6 Gerçek Zamanlı Hücre İnvazyon Analizlerinin Sonuçları

xCelligence RTCA cihazında yapılan invazyon analizi hücrelerin matrijelden geçmelerine bağlı olarak hücrenin invaziv karakterini analizlemeye dayalı bir yöntemdir. İnvazyon analizinde kullanılan plateler 2 farklı kısımdan oluşur. Platein üst kısmında hücreler FBS bulunmayan ortamda kültüre edilir ve platein alt kısmında bulunan %10 FBS içeren (normal kültür ortamı) kültür ortamına aradaki matrijelden geçerek ulaşması matrijel altında bulunan altın elektrotlarda gerçekleşen empedans değişimine göre belirlenir.

RTCA cihazında empedans değişimine bağlı ölçüm alınan invazyon testi sonuçları oluşturulan grafik şekil 13.te verilmiştir. Cihaza özgü platelere ekilen hücrelerin elektrot yüzeyinde ilk değişim kaydettikleri an 24. saat olarak bulunmuştur ve 24. saatten sonra 100. saate kadar gerçek zamanlı ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonrası hiçbir işlem görmemiş kontrol grubunda hücrelerin 45. saat itibarıyla invaziv özellikleri belirlenmiş ve grafik ivmeli bir şekilde artmıştır. Farklı dozlarda robotnikinin, vismodegib ve bunların kombinasyon tedavilerinin uygulandığı deney gruplarında ise 45. saatten sonra hücrelerin invaziv özelliği her iki ajan için de artan dozlarda azalmıştır. Hücrelerin invaziv özelliklerinde kombinasyon 1 tedavisi uygulandığında 48.ve 100. saatlerin sonunda kontrole göre sırasıyla %73 ve %30luk azalma; kombinasyon 2 tedavisi uygulandığında ise 48.ve 100. saatlerin sonunda kontrole göre sırasıyla %74.6 ve %37lik azalma gözlenmiştir. Bu verilere göre uygulanan tedavinin etkin dozu olarak kombinasyon 2 seçilmiştir. Hücrenin invaziv karakterine ilacın en etkin olduğu doz ise 48-72. saatler arası olarak bulunmuştur.



Şekil 15. Zamana bağlı invaziv karakterdeki hücre yoğunluğu gösterilmiştir. Kontrol grubu normal hücre kültür ortamında büyütülen hücrelerden oluşmaktadır ve grafikte yeşil ile gösterilmiştir.



Şekil 16. U87-MG hücrelerinin zamana bağlı alınan invazyon ölçümleri sonucu elde edilen 24-48-72-100. saatlerin sonuçlarına ait oluşturulan bar grafiği. İlaç uygulaması yapılan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırılarak non-parametrik bir test olan Mann Withney U testi uygulanmıştır. İstatiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ seçilmiştir.

Tablo 12’de gösterilen verilerde her bir grupta bulunan verilerin kontrole göre karşılaştırılarak ve kombinasyonlarda kombinasyona ait yüksek doz moleküle göre karşılaştırılması ile non-parametrik bir analiz olan Mann Withney U testi; 24-48-72-100. saatlere ait yara kapanma sonuçları 24. saate göre istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirmek için non-parametrik bir analiz olan Wilcoxon testi uygulanmıştır. Wilcoxon testi sonuçlarının tümünde p değeri 0,00 çıkmıştır. İstatiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ seçilmiştir. Tüm bu analizlerden elde edilen sonuçlara göre verilerin tamamı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Tablo 12. U87-MG hücrelerinin zamana bağlı alınan invazyon ölçümleri sonucu elde edilen 24-48-72-100. saatlerin istatistiksel anlamlılık sonuçlarına ait oluşturulan tablo

Gruplar	Ortalama	SD	Median	Min	Max	p
Kontrol						
24. saat	0,0746	0,00537	0,0742	0,0698	0,0802	
48. saat	0,2537	0,00591	0,2539	0,2468	0,2601	
72. saat	0,3679	0,00251	0,3672	0,3659	0,3713	
100. saat	0,6835	0,00355	0,6832	0,6796	0,6881	
Robotnikinin 25 µM						
24. saat	0,0963	0,00308	0,0962	0,0817	0,1111	0,020921
48. saat	0,2236	0,01243	0,2232	0,2196	0,2287	0,020921
72. saat	0,3368	0,00148	0,3366	0,3339	0,3401	0,020921
100. saat	0,6323	0,00307	0,6328	0,6298	0,6341	0,020921
Robotnikinin 50 µM						
24. saat	0,0868	0,00308	0,0860	0,0843	0,0911	0,020921
48. saat	0,2158	0,01243	0,2151	0,2019	0,2313	0,020921
72. saat	0,3180	0,00148	0,3177	0,3169	0,3200	0,020165
100. saat	0,6181	0,00307	0,6185	0,6141	0,6214	0,020921
Vismodegib 25 µM						
24. saat	0,0944	0,00360	0,0942	0,0907	0,0987	0,020921
48. saat	0,1721	0,00519	0,1706	0,1676	0,1796	0,020165
72. saat	0,2909	0,00130	0,2907	0,2897	0,2928	0,020165
100. saat	0,5271	0,00211	0,5276	0,5244	0,5290	0,020921
Vismodegib 50 µM						
24. saat	0,0764	0,00324	0,0774	0,0717	0,0791	0,772830
48. saat	0,1847	0,00390	0,1850	0,1799	0,1891	0,020921
72. saat	0,3238	0,00413	0,3240	0,3188	0,3284	0,020921
100. saat	0,5118	0,00548	0,5103	0,5069	0,5196	0,020921
Kombinasyon 1						
24. saat	0,0682	0,00257	0,0684	0,0649	0,0711	0,083265
						0,020921**
48. saat	0,1931	0,00287	0,1929	0,1902	0,1965	0,020921
						0,020921**
72. saat	0,3382	0,00303	0,3389	0,3341	0,3410	0,020921
						0,020921**
100. saat	0,4833	0,00237	0,4833	0,4804	0,4862	0,020921
						0,020921**
Kombinasyon 2						
24. saat	0,0645	0,00160	0,0647	0,0625	0,0662	0,020921
						0,020921**
48. saat	0,1626	0,00247	0,1630	0,1594	0,1650	0,020921
						0,020921**
72. saat	0,2450	0,00268	0,2453	0,2421	0,2474	0,020921
						0,020165**
100. saat	0,4339	0,00206	0,4343	0,4312	0,4361	0,020921
						0,020921**

Hh yolağının aktif olması durumunda Ptch'in Smo üzerindeki baskılamayı kaldırmasıyla birlikte Smo'yu sitoplazmada stabil tutan SUFU kompleksi hücrede mikrotübüllere doğru hareket eder. Bu stabilitenin bozulması hücreye invaziv ve migratif bir özellik kazandırır.

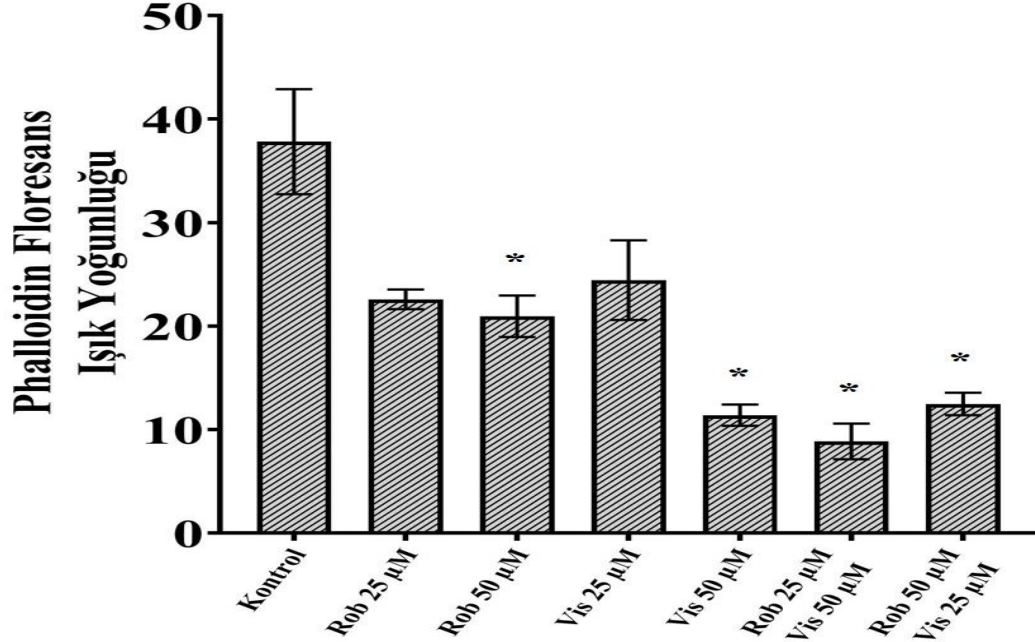
İnvazyon deneylerinde elde edilen sonuçlara göre hücrelerin 50 µM robotnikinin ve 25 µM vismodegib muamelesi sırasında 50.saatten sonra hücrelerin invaziv karakterinde anlamlı bir değişiklik gözlenirken 25 µM robotnikinin ve 50 µM vismodegib kullanılan kombine uygulamada 78.saat sonrasında kontrol grubu ve inhibitörlerin tekli kullanımlarına göre bir azalma olsa da gözlenen değişim anlamlı bir değişim değildir.

4.7 İmmunfloresan Boyama ile Hücre Proliferasyon Proteini ve Sitoiskelet Elemanlarının Görüntülenmesi ve Görüntü Analizlerinin Sonuçları

U87-MG hücrelerinde proliferasyon belirteci olan Ki-67 boyaması sonunda konfokal mikroskopta(Zeiss, LSM 800) alınan görüntüler LSM yazılımı Zen 2 (Blue Edition)de floresan boya yoğunluklarına göre analizlenmiştir. Analiz sonuçlarında elde edilen sonuçlar ile grafik oluşturulmuş ve kombine ilaç tedavisi uygulanan deney gruplarında kontrole göre proliferasyon proteinlerinde düşüş gözlenmiştir, bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır.

U87-MG hücrelerine farklı konsantrasyonlarda ve kombine olarak robotnikinin ve vismodegib uygulanmıştır. Uygulanan bu deney grupları arasında robotnikinin ve vismodegib gruplarında ayrı ayrı aktin boyama floresan yoğunluklarına bakıldığında doza bağlı düşüş gözlenmiştir. Aynı zamanda kombine tedavi uygulanan gruplarda kontrole bağlı aktin filamentlerin floresan boyama yoğunlukları azalmıştır.

Tüm verilerde yapılan istatistiksel anlamlılık testinde $p \leq 0,05$ anlamlılık düzeyi seçilmiştir ve tüm veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

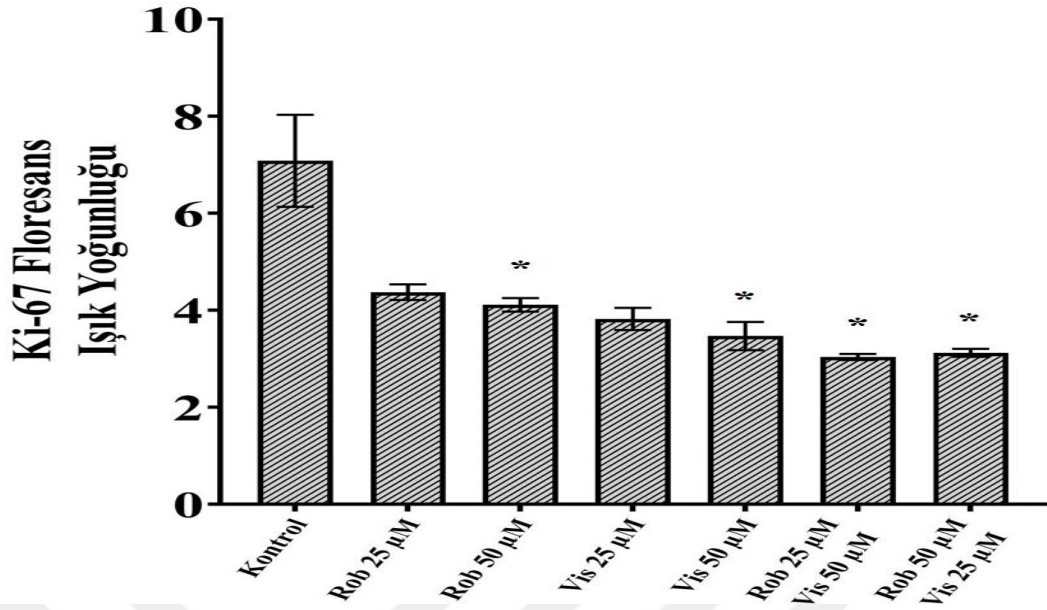


Şekil 17. U87-MG hücre hattı ile yapılan hücre iskeleti (phalloidin) boyama grafiği

Phalloidin boyamasında alınan floresan ışıma yoğunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında robotnikinin ve vismodegib 50 μM için phalloidin yoğunlukları sırasıyla %44,6 ve %70 azalmıştır. Aynı oran kombinasyon 1 ve kombinasyon 2 için sırasıyla %76,6 ve %67'dir. Bu veriler ışığında kombinasyon 1 de phalloidin yüksek doz kullanımı olan vismodegibe göre yaklaşık %7 daha etkilidir.

Tablo 13. U87-MG hücre hattı ile yapılan hücre iskeleti (phalloidin) boyamasına ait istatistiksel anlamlılık tablosu

Gruplar	Ort.	SD	Median	Min	Max	p
Kontrol	37,8194	5,07205	37,8154	32,75	42,89	-
Robotnikinin 25 μM	22,5746	0,95627	22,2455	21,83	23,65	0,050
Robotnikinin 50 μM	20,9460	2,00455	22,0535	18,63	22,15	0,050
Vismodegib 25 μM	24,4503	3,85022	22,7145	21,77	28,86	0,050
Vismodegib 50 μM	11,3914	1,02911	11,1722	10,49	12,51	0,050
Kombinasyon 1	8,8544	1,71753	8,0892	7,65	10,82	0,127**
Kombinasyon 2	12,4750	1,08833	12,1335	11,60	13,69	0,050**

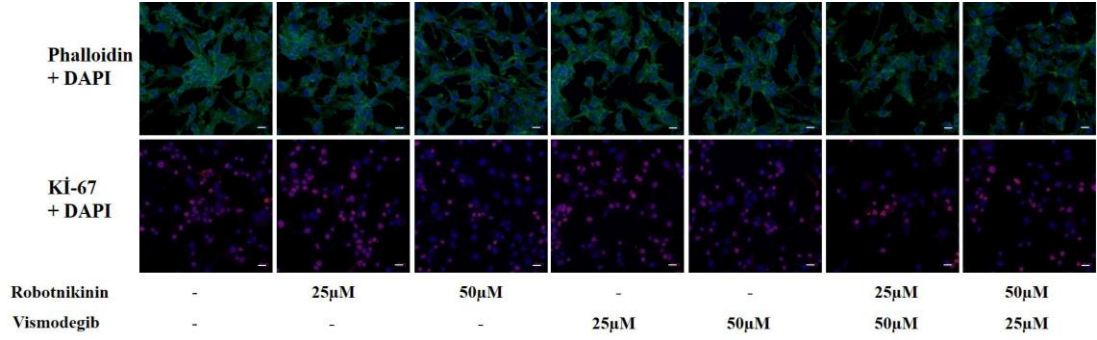


Şekil 18. U87-MG hücre hattı ile yapılan Ki-67 hücre proliferasyon belirteç boyama grafiği

Ki-67 hücre proliferasyon belirteç boyamasında alınan floresan ışımaya yoğunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında robotnikinin ve vismodegib 50 µM için phalloidin yoğunlukları sırasıyla %41,5 ve %51,4 azalmıştır. Aynı oran kombinasyon 1 ve kombinasyon 2 için sırasıyla %57,2 ve %55,7'dir. Bu veriler ışığında kombinasyon 1 de Ki-67 yüksek doz kullanımı olan vismodegibe göre yaklaşık %6 daha etkilidir.

Tablo 14. U87-MG hücre hattı ile yapılan Ki-67 hücre proliferasyon belirteç boyamasına ait istatistiksel anlamlılık tablosu

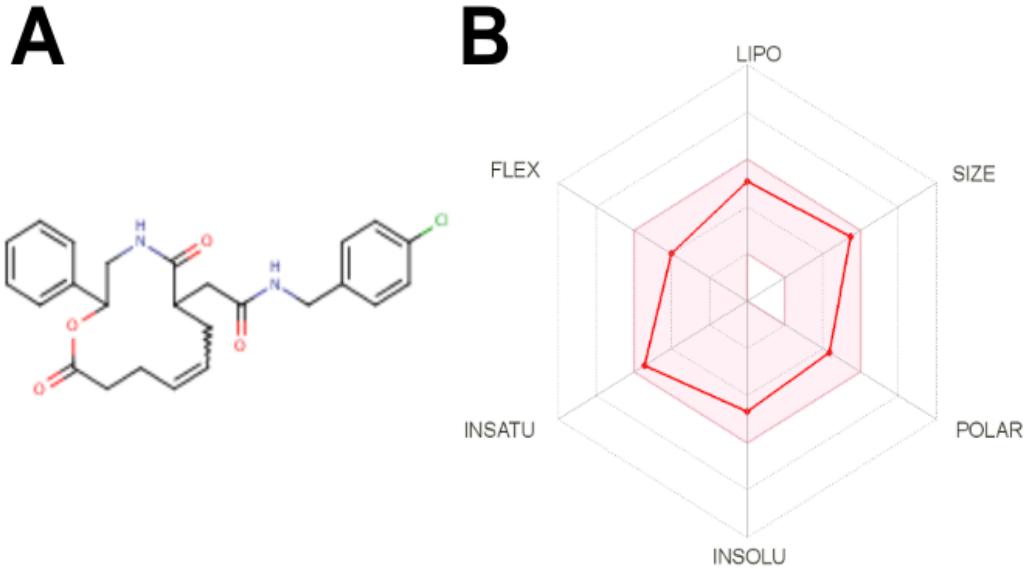
Gruplar	Ort.	SD	Median	Min	Max	p
Kontrol	7,0795	0,95008	6,8900	6,24	8,11	-
Robotnikinin 25 µM	4,3692	0,16001	4,3676	4,21	4,53	0,050
Robotnikinin 50 µM	4,1092	0,13970	4,0400	4,02	4,27	0,050
Vismodegib 25 µM	3,8212	0,22660	3,9100	3,56	3,99	0,050
Vismodegib 50 µM	3,4667	0,29153	3,5600	3,14	3,70	0,050
Kombinasyon 1	3,0374	0,06387	3,0121	2,99	3,11	0,050
Kombinasyon 2	3,1205	0,08126	3,1000	3,05	3,21	0,050**



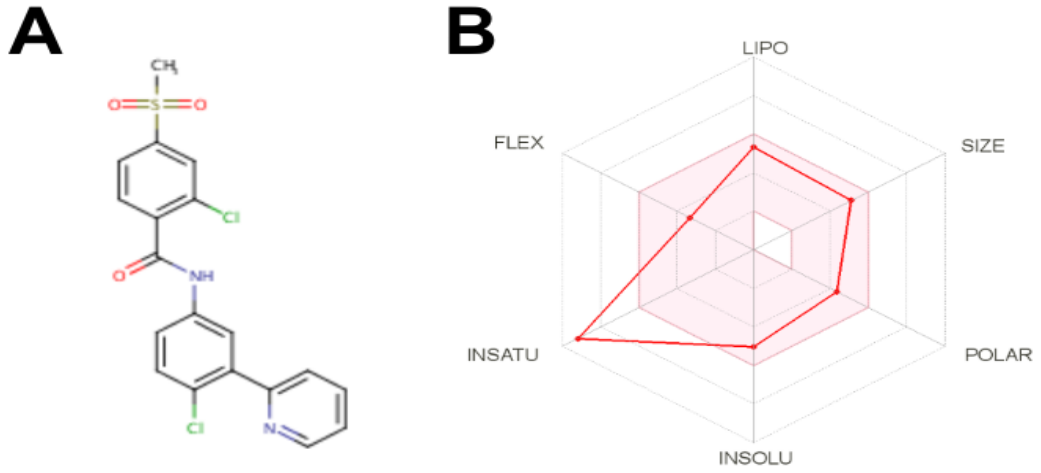
Şekil 19. U87-MG hücre hattı ile yapılan Phalloidin ve Ki-67 boyamalarının Dapi ile alınan görüntüleri. Ölçek 100 µm'dir.

4.8 In Silico İlaç Benzerlik Analizleri

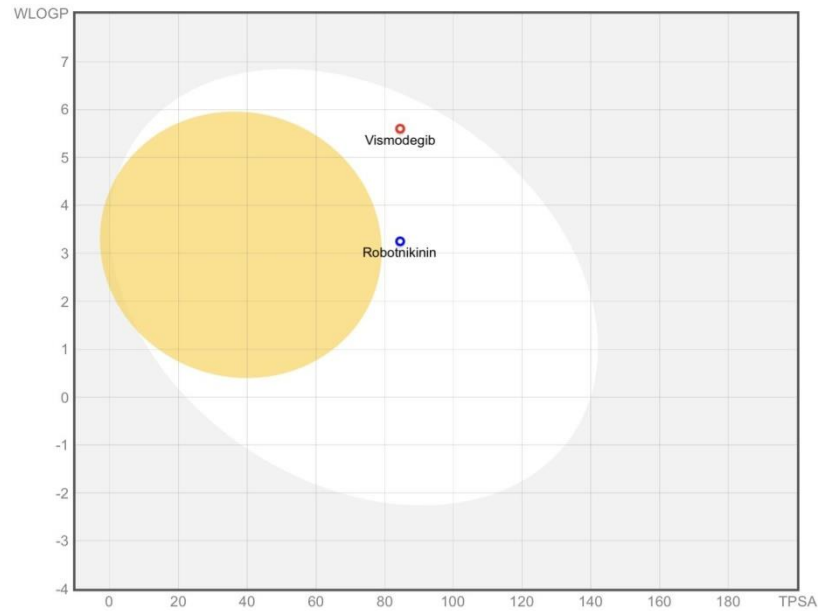
İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü'nün Moleküler Modelleme Grubu tarafından oluşturulan web araçları kullanılarak gerçekleştirilen *in silico* analiz sonuçlarına göre hem robotnikinin hem de vismodegib moleküllerinin yüksek gastrointestinal absorpsiyon kapasitesi olduğu fakat kan beyin bariyerinden geçemedikleri sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 20. A) Robotnikinin molekülünün molekül yapısı; B) Robotnikinin molekülüne ait biyo-uygunluk radarı. Pembe ile belirtilen aralık biyouygunluk özelliklerine göre optimal aralıkları göstermektedir, robotnikinin molekülünün tüm özelliklerinin değerleri optimal aralıktadır.



Şekil 21. A) Vismodegib molekülünün molekül yapısı; B) Vismodegib molekülüne ait biyo-uygunluk radarı. Pembe ile belirtilen aralık biyoygunluk özelliklerine göre optimal aralıkları göstermektedir, insaturation (doygunluk) değerinin optimal aralığını belirleyen parametre, sp^3 hibridizasyonundaki karbon fraksiyon sayısı >0.25 olmasıdır. Vismodegib molekülünde bu değer 0.05 olması nedeniyle optimal aralıkta değildir. Vismodegib molekülü biyo-uygunluk radarında yer alan diğer özelliklerde optimal aralıklara girmiştir.



Şekil 22. WLOGP-TPSA grafiği ile elde edilen BOILED-Egg tablosu, beyaz alan molekülün gastrointestinal sistemde absorpsiyonunun, sarı alan ise molekülün kan beyin bariyerinden geçiş yeteneğini belirtir.

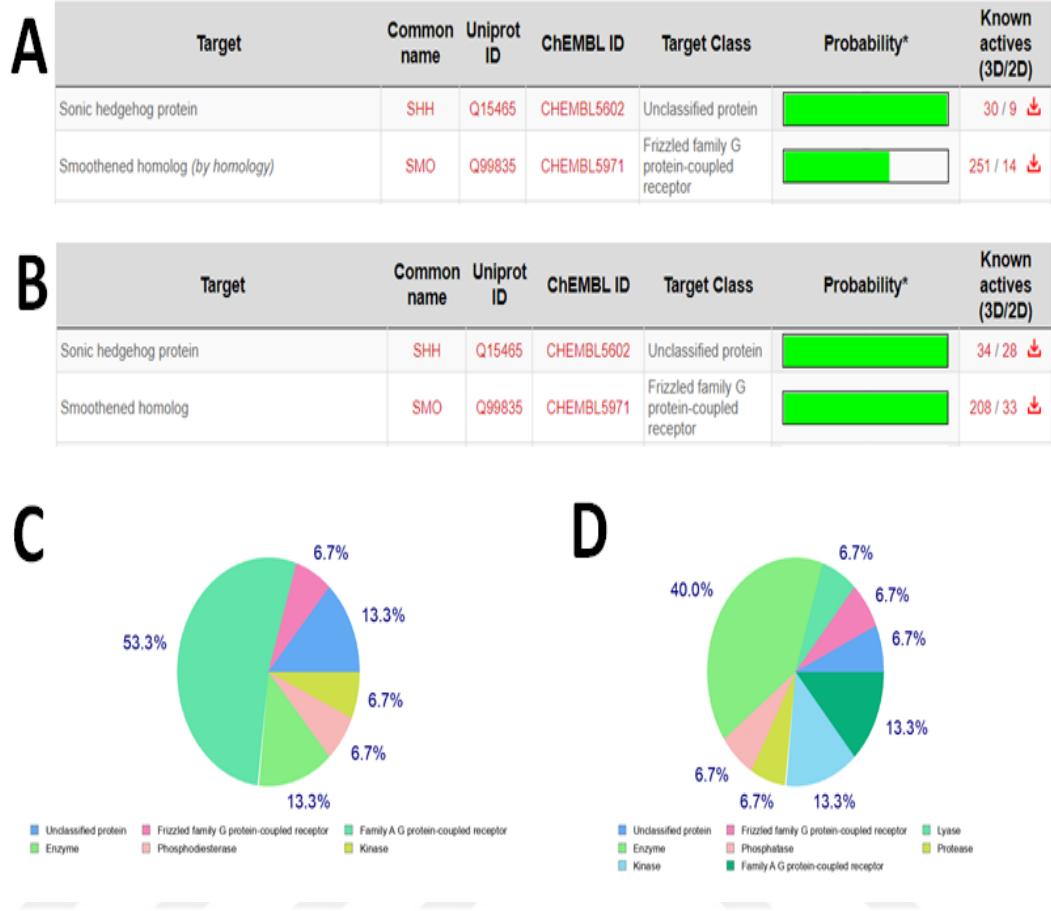
Robotnikinin ve vismodegib moleküllerinin her ikisinin de gastrointestinal sistemde absorpsiyonu yüksek iken, kan beyin bariyerinden geçiş yetenekleri bulunmamaktadır.

FDA onaylı Hh inhibitörü olan vismodegib molekül doygunluğu parametrelerinde uygun aralığa girmezken robotnikinin tüm biyo-uygunluk parametrelerinde optimal aralıklara girdiği bulunmuştur.

Tablo 15. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerinin biyo-uygunluk parametrelerinde optimal aralık tablosu

Biyo-uygunluk Parametreleri	Robotnikinin	Vismodegib
Molekül Lipofilikliği	Evet	Evet
Molekül Büyüklüğü	Evet	Evet
Molekül Polaritesi	Evet	Evet
Molekül Çözünürlüğü	Evet	Evet
Molekül Doygunluğu	Evet	Hayır
Molekül Esnekliği	Evet	Evet

Hedef tahmin analizleri bir molekülün klinikte ilaç olarak kullanılabilmesinde doğru hedefin seçilmesi konusunda bilgi sağlar. Robotnikinin ve vismodegib moleküllerine ait hedef tahmin analizleri yapıldığında her iki molekül için de Hh yolunun en öncelikli hedef olduğu bulunmuştur. Robotnikinin molekülünün ilk iki hedef tahminleri sırasıyla Hh sinyal yolu ligandı Shh ve Smo proteindir ve Shh ile uyumluluk olasılığı %100 iken Smo ile uyumluluk olasılığı yaklaşık %70 tir. Vismodegib molekülünün ise ilk iki hedef tahminleri sırasıyla Hh sinyal yolu ligandı Shh ve Smo proteindir ve her iki hedef ile uyumluluk olasılığı %100 bulunmuştur. Yapılan hedef tahmin sınıflandırmasında ise robotnikinine ait hedef tahmin sınıflandırması; %53.3 ile en yüksek oran A G protein bağlı reseptör ailesidir. Vismodegib molekülüne ait sınıflandırmada %40 ile en yüksek oran sınıflandırılmış farklı enzimler olarak bulunmuştur.



Şekil 23. A) Robotnikinin molekülünün hedef tahmin sıralamaları, B) Vismodegib molekülünün hedef tahmin sıralamaları, C) Robotnikinin molekülüne ait hedef tahmin sınıflandırmaları, D) Vismodegib molekülüne ait hedef tahmin sınıflandırmaları

ADME ve ilaç benzerliği analizlerinde moleküllerin değerlendirilebilmesi için gerekli bir takım fizikokimyasal özellikler baz alınmaktadır. Tablo 15’te moleküllerin bu özellikleri verilmiştir. Molekül ilaç benzerliğine uygunluk durumuna göre fizikokimyasal özellikleri arasında sp^3 hibridizasyonundaki karbon fraksiyon sayısı 0.25 ile 1 arasında olmalıdır, robotnikinin uygun aralığa girerken vismodegib molekülünde bu değer uygun aralığa girmemektedir.

Tablo 16. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerine ait fizikokimyasal özellikler

	Robotnikinin	Vismodegib
Molekül formülleri	C ₂₅ H ₂₇ ClN ₂ O ₄	C ₁₉ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O ₃ S
Molekül ağırlıkları	454.95 g/mol	421.30 g/mol
Heavy atom sayısı	32	27
Aromatik heavy atom sayısı	12	18
sp³ hibridizasyonundaki karbon fraksiyon sayısı	0.32	0.05
Dönebilir bağ sayısı	6	5
H-bağı alıcı sayısı	4	4
H-bağı verici sayısı	2	1
Molar kırılma	127.20	107.00
TPSA	84.51Å ²	84.51Å ²

Lipofiliklik özelliği bir molekülün n-oktanol/su arasındaki bölünme katsayısına göre hesaplanır ve molekülün sudaki serbest çözünme enerjileri hakkında bilgi verir. Yapılan analizde her iki moleküle ait n-oktanol/su katsayıları birbirine yakın bulunmuştur ve sonuçlar tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 17. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerine ait lipofiliklik özellikleri

	Robotnikinin	Vismodegib
Log P_{o/w} (iLOGP)	3.19	2.41
Log P_{o/w} (XLOGP3)	3.39	3.84
Log P_{o/w} (WLOGP)	3.25	5.60
Log P_{o/w} (MLOGP)	2.96	3.24
Log P_{o/w} (SILICOS-IT)	4.08	4.24
Consensus Log P_{o/w}	3.37	3.87

Suda çözünür moleküller kullanım ve formülasyon kolaylığı sağlayacağı gibi aynı zamanda birçok ilaç geliştirme faaliyetini de büyük ölçüde kolaylaştırır. Ayrıca, molekülün ilaç olarak kullanımında oral uygulamayı hedeflenmesi de yine molekülün çözünürlük ve absorpsiyon özelliklerine bağlıdır. Parenteral kullanımda ise farmasötik dozajın küçük hacminde yeterli miktarda aktif bileşen sağlamak için suda yüksek oranda çözünür olması gerekir. Yapılan analizlerde her iki moleküle ait LogS değerleri 6dan küçük olması nedeniyle moleküllerin çözünürlüklerinin oldukça düşük oldukları bulunmuştur.

Tablo 18. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerine ait suda çözünürlük özellikleri

	Robotnikinin	Vismodegib
Log S(ESOL)	-4.68	-5.03
Çözünürlük	9.55e-03 mg/ml ; 2.10e-05 mol/l	3.89e-03 mg/ml ; 9.23e-06 mol/l
Sınıf	Orta derecede çözünür	Orta derecede çözünür
Log S (Ali)	-4.84	-5.31
Çözünürlük	6.52e-03 mg/ml ; 1.43e-05 mol/l	2.06e-03 mg/ml ; 4.89e-06 mol/l
Sınıf	Orta derecede çözünür	Orta derecede çözünür
Log S (SILICOS-IT)	-7.63	-8.51
Çözünürlük	1.06e-05 mg/ml ; 2.32e-08 mol/l	1.31e-06 mg/ml ; 3.11e-09 mol/l
Sınıf	Zayıf çözünür	Zayıf çözünür

Robotnikinin ve vismodegib moleküllerine ait farmakokinetik özellikler tablo 18’de verilmiştir. İlaç ve benzeri moleküllerin P-glikoprotein substratı olmaları merkezi sinir sisteminden atılımlarını kolaylaştırır. Bu nedenle bu özellik ilaç benzeri molekülde olması beklenir ve robotnikinin bu özelliğe sahip bir molekülken vismodegib P-glikoprotein substratı değildir. Sitokrom P inhibisyonu, toksisiteye neden olur bu nedenle moleküllerin CYP inhibitörü istenen bir durum değildir ve analizi gerçekleştirilen her iki molekül de CYP inhibisyonuna neden olur. Log K_p ise bir molekülün deri geçirgenliğini gösterir, bu değerin oral yolla alımı gerçekleştirilecek moleküllerde oldukça düşük olması beklenir. Robotnikinin ve vismodegib molekülleri karşılaştırıldığında robotnikinin molekülünün deri geçirgenliği daha düşüktür.

Tablo 19. Robotnikinin ve Vismodegib moleküllerine ait farmakokinetik özellikler

	Robotnikinin	Vismodegib
Gastrointestinal absorpsiyon	Yüksek	Yüksek
Kan beyin bariyerinden geçiş	Hayır	Hayır
P-glikoprotein substratı	Evet	Hayır
CYP1A2 inhibitör	Hayır	Hayır
CYP2C19 inhibitör	Hayır	Hayır
CYP2C9 inhibitör	Evet	Evet
CYP2D6 inhibitör	Hayır	Evet
CYP3A4 inhibitör	Evet	Hayır
Log Kp (deri geçirgenliği)	-6.67 cm/s	-6.14 cm/s

Moleküllere ait ilaç benzerlik kuralları bulunmaktadır ve bu kurallar bir çok ilaç ve biyoteknoloji firması tarafından kabul edilmektedir. Kurallar moleküllere ait belirli fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklere göre belirlenir. Analizi gerçekleştirilen her iki molekül de lipinski'nin 5 kuralına uyar fakat robotnikinin aynı şekilde Ghose tarafından kabul edilen ve molekül ağırlığı, lipofiliklik ve heavy atom sayıları baz alınarak oluşturulmuş kurala uyarken vismodegib Ghose kurallarına lipofiliklik özelliğinin uygun aralığa girmemesinden dolayı uymadığı bulunmuştur.

Tablo 20. Robotnikinin ve vismodegib moleküllerinin ilaç benzerlik kurallarına uygunluğu

	Robotnikinin	Vismodegib
Lipinski kuralları	Evet	Evet
Ghose kuralları	Evet	Hayır; WLOGP>5.6
Veber kuralları	Evet	Evet
Egan kuralları	Evet	Evet
Muegge kuralları	Evet	Evet
Biyo-uygunluk skoru	0.55	0.55

Robotnikinin ve vismodegibin sentetik erişilebilirliği ile ilişkili tıbbi kimya karakterleri sırasıyla 4,41 ve 2,68 bulunmuştur. Sentetik erişilebilirlik değerleri için bulunan 1=çok kolay, 10=çok zor değerlendirmelerine göre vismodegib molekülünün sentetik erişilebilirliği daha uygundur. Leadlikeness özelliği; $250 \leq \text{molekül kütlesi} \leq 350$, $XLOGP \leq 3.5$ ve döner bağ sayısı ≤ 7 eşitliklerine göre bulunur. Robotnikinin molekülünün molekül kütlesi >350 olması nedeniyle; vismodegib

molekölünün ise molekül kütlesi>350 olması ve XLOGP>3.5 olması nedeniyle leadlikeness sınırlılıklarına uymamaktadırlar.

Tablo 21. Robotnikinin ve vismodegib moleküllerinin medikal kimya özellikleri

	Robotnikinin	Vismodegib
Kurşun benzerliği (leadlikeness)	Hayır; MW>350	Hayır; MW>350, XLOGP3>3.5
Sentetik erişilebilirlik	4.41	2.68

5. TARTIŞMA

Kanser dünyada ölüm insidansı sürekli artan ve en yüksek olan hastalıktır. Glioblastoma beyin tümörü olarak adlandırılan kanserde ise hastaların sağ kalım süresi 12-20 ay arasındadır ve hastaların tümünde ölüm gerçekleşmektedir.

Kanserin nedenlerinden biri sinyal yolaklarının aşırı aktivasyonu ya da aktivite kaybıdır. Hh sinyal yolağı bu sinyal yolaklarından biridir. Embriyogenez döneminde aktivitesiyle hücre döngüsü, proliferasyonu, doku rejenerasyonunu regüle eden bu sinyal yolağı yetişkinlikte inaktiftir (8). Yetişkin dönemde aktivasyonu karsinogenezle doğrudan ilişkilidir ve başta bazal hücreli karsinom, medullablastoma ve glioblastoma (66) olmak üzere birçok kanserde rol oynadığı bilinmektedir. Hh sinyal yolunun aktivasyonunu inhibe etmek üzere son yıllarda bir çok çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalarla hem yol aydınlatılmış hem de yolun inhibisyonunu sağlayan ajanlar keşfedilmiştir. Vismodegib bu ajanlardan FDA tarafından ilk onay alınarak klinikte kullanımı olan ilaçtır. Fakat kanser tedavisinde en çok karşılaşılan sorunlardan biri olan kanserin uygulanan tedaviye karşı direnç geliştirmesi sorunu vismodegib tedavisinde de görülmektedir. Bu nedenle sinyal yolunun ya da bu sinyal yolunu etkileyen diğer sinyal yollarının da inhibisyonunu sağlayan kombinasyon tedavilere ihtiyaç duyulmuştur.

Bu çalışmada sinyal yolunda görev alan en önemli iki protein olan Ptch1 ve Smo'nun birlikte inhibisyonları ile etkili bir kombinasyon tedavisi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda Hh sinyal yolunun ilk proteinleri olan Ptch1 ve Smo üzerine araştırmalar yapılmıştır. Stanton ve ark. tarafından yapılan çalışmada robotnikininin her ne kadar Smo antagonistleri etkileşimi ile rekabet edemeyeceği ve etkisinin bastırılacağı verilmiş olsa da yaptığımız çalışmalarda bunun aksi sonuçlar elde ettik (67).

Chandra ve ark. tarafından hasta kaynaklı GBM hücreleri ile yapılan çalışmada oluşturulan *in vitro* nörosferlerde 50 µM vismodegib tedavisi sonrasında apoptozun ve hücre döngüsünün durdurulduğu gösterilmiştir (33). Yapılan çalışmada Gli1 mRNA ekspresyonunun Hh sinyal yolu kaynaklı olduğu ve GBM hastalarında Hh yolu aktivitesinin düşürülmesinin tedavide etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde bu tez projesi kapsamında yapılan deneylerde de 50 µM vismodegib

tedavisinin hücrelerde proliferasyonu azalttığı ve hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında U87-MG hücrelerinin robotnikinin ile muamelesi öncesi satın alınan robotnikinin molekülünün DMSO içinde belirtilen çözünürlükte tam çözünmediğini gözlemledik bu nedenle de hücrelerin robotnikinin ile muamelesi sırasında artan DMSO oranı %2 ve sonrasında hücrelerde toksik etki yaratacağından (68) robotnikinin için maksimum doz 75 μ M olarak belirlendi ve yüksek dozda kontrol grubu olarak DMSO içeren grup kullanıldı. Hiçbir işlem yapılmamış hücreler ile karşılaştırıldığında bu 75 μ M doz robotnikinin ile muamele edilen hücrelerde ölüm çok yüksek gözlemlendi ve hücre morfolojilerinde değişim gözlemlendi.

Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyonları ve hücre canlılık analizlerinden elde edilen veriler ışığında robotnikinin molekülünün IC50 değeri istatistiksel tahmin olarak belirtilmiştir. Vismodegib molekülünde ise herhangi bir çözünme problemi yaşanmadığı için IC50 doz olarak belirlenen dozda çalışmalar yapılmış ve bu kanıtlanmıştır.

Hh sinyal yolunda Smo fosforillenmesi sonrasında sitoplazmada bulunan SUFU serbest forma geçerek mikrotübüllere doğru hareket eder ve bu esnada Gli2 baskılamasını kaldırarak Gli1 aktivasyonuna neden olur. Gli1 transkripsiyon faktörünün nukleusa translokasyonu sırasında mikrotübüllerde serbest forma geçen SUFU'nun hücreye hareket kazandırdığı düşünülmektedir, fakat SUFU'nın yapısı ve tam mekanizmaları henüz aydınlatılmayı beklemektedir (69). Bu hipotezden yola çıkarak çalışmamızda U87-MG hücre hattı ile migrasyon, invazyon ve hücrede bulunan aktin filament yapısının phalloidin boyaması ile gösterilmesi deneyleri gerçekleştirilmiştir. 50 μ M vismodegib kullanımının yanında 25 μ M robotnikinin kullanımının hücrede invaziv karakteri tek başına 50 μ M vismodegib kullanımına oranla daha da azalttığı gösterilmiştir. Gelecekte yapılan çalışmalar ile Hh yolu aktivasyonu olan hücrelerde SUFU yapısı incelenmeli ve inhibisyon durumu değerlendirilmelidir.

Hh yolu inhibitör ajanı olarak klinikte kullanımı olan vismodegibin lokal ve metastatik olmayan BCC hastalarında günlük kullanımı tek doz 150 mg şeklindedir (70). Çalışma için *in vitro* kullanıma uygun satın alınan vismodegib ise 10 mg'dır ve stok konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde DMSO içinde çözülmüştür. Tedavi için

hücrelere verilen dozlar ise stok konsantrasyon içinden seyreltilerek kullanılmıştır. 50 μ M vismodegib ile hücreleri muamele etmek için kullanılan vismodegib miktarı 0,5 mg'dır. Robotnikinin ise henüz onay alan bir ajan olarak klinikte kullanımı yoktur. Benzer şekilde *in vitro* kullanıma uygun satın alınan robotnikinin ise 1 mg'dır ve stok konsantrasyonu 7,5 mM olacak şekilde DMSO içinde çözülmüştür. Tedavi için hücrelere verilen dozlar stok konsantrasyon içinden seyreltilerek kullanılmıştır. 25 μ M robotnikinin ile hücreleri muamele etmek için kullanılan robotnikinin miktarı 0,0033 mg'dır. Vismodegib klinikte *in vitro* kullanımının 300 katı kadar fazla mg olarak kullanılmasından dolayı aynı eşitlik robotnikinin için kurulduğunda klinikte kullanımı 1 mg olabilmesi ön görülmektedir. Bu veriler ışığında aynı ya da benzer formülasyona sahip robotnikin için de klinik kullanımı mümkün olabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçların doğrulanması için çalışma önce Hh yolu aktivasyonu gösteren farklı hücre hatlarında ve sonrasında da *in vivo* çalışmalar ile desteklenmelidir.

DrugBank web aracından ilaç-ilaç etkileşimine bağlı olarak tarama yapıldığında Vismodegib ilacının kilinikte robotnikinin ve benzeri herhangi bir Ptch inhibitörü ajan ile kombine kullanımına rastlanmamıştır. Bu çalışma literatürde Robotnikinin ve Vismodegib'in kombine kullanımının *in vitro* olarak gösterildiği ilk çalışmadır. İn silico analizler için kullanılan İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü web araçları ücretsiz bir şekilde kullanıcıların hizmetine sunulan ve literatür tarafından kabul görmüş araçlardır. Elde edilen tüm sonuçlar robotnikinin molekülünün vismodegib molekülü ile ilaç benzerliği yönünden kıyaslamalarını oluşturmuştur.

ADME analizlerinde incelenen leadlikeness özellikleri bir molekülün ilaç benzeri aday olabilmesi için sahip olduğu kimyasal optimizasyonları sağlamaktadır. İlaç benzeri molekülün invitro hücre kültür çalışmaları ardından yapılan *in vivo* ve faz öncesi çalışmalar sonunda klinikte kullanımı için potansiyel müşteri seçim kriterlerinin daha iyi rasyonelleştirilmesine olanak sağlar. Bu nedenle moleküllerin leadlikeness değeri için varolan eşitliklere optimal aralıkta uyması beklenmektedir. Çalışmada kullanılan robotnikinin molekülünün leadlikeness özelliğinin FDA onaylı bir ilaç olan vismodegibe göre daha uygun çıkması gelecekte robotnikinin *in vivo* ve faz çalışmalarının yapılmasını uygun kılmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan U87-MG glioblastom hücreleri astrosit türü hücredir ve bu hücreler vücutta bölgesel kan akımını düzenleyerek oksijen ve glikozun aktif

bölgeye ulaşmasını sağlarlar. Bu nedenle potansiyel ilaç hedeflerinin kan beyin bariyerinden geçebilir olması oldukça önemlidir. Analizde kullanılan moleküllerin her ikisinin de kan beyin bariyerinden geçiş yeteneğinin oldukça düşük olması ve vismodegib molekülünün günümüzde klinikte Hh yolunu hedefleyen bir ajan olarak kullanılması nedeniyle çalışmaların *in vitro* dışında *in vivo* olarak da değerlendirilmesi gerekmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada glioblastoma başta olmak üzere birçok kanserde etkin rol aldığı bilinen Hh sinyal yolunun inhibisyonu üzerine denemeler yapılmıştır. Hh sinyal yolağı yetişkin dönemde Ptch1 transmembran proteininin Smo transmembran proteinini baskılaması yoluyla inaktif haldedir. Hücreye Ptch1'i aktiveleyen Shh sinyalinin gelmesiyle Smo baskılanması ortadan kalkar ve sitoplazma içerisinde oluşan değişimler ile hücre hem invaziv bir karakter kazanır hem de proliferasyon ile doğrudan ve dolaylı olarak ilişkili olan Gli1 transkripsiyon faktörünün ekspresyonu gerçekleşir. Gli1 ekspresyonu aynı zamanda hücrede Wnt, Pka, mTOR, notch gibi sinyal yolları ile de eksprese edilebilir ya da o sinyal yollarının aktivitesinde rol alabilir.

Literatürde de belirtildiği gibi Hh sinyal yolunun aydınlatılması ve inhibisyonu üzerine birçok çalışma yürütülmektedir. Hh sinyal yolunun inhibisyonunun kanser tedavisinde etkili bir yol olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada Hh sinyal yolunun Ptch1 ve Smo proteinleri üzerinden kombinasyon tedavisi ile inhibisyonları sağlanmıştır. Çalışmanın hipotezi Hh sinyal yolunun ikili kombinasyonunun ajanların tek tek kullanımına oranla daha yüksek inhibisyon etkisi yaratabileceği üzerinedir ve yapılan çalışmalar ile Hh yolunun inhibisyonunda daha yüksek etki gözlenmiştir.

Sinerjistik etki yaratan ajanlardan biri olan vismodegib Hh sinyal yolunda yer alan Smo'nun inhibitör ajanı olarak FDA tarafından ilk onay alan ilaçtır ve günümüzde BCC hastalarında kullanılmaktadır. Fakat hastalarda oluşan %60 civarında yanıt ve 3-6 ay arasında gelişen direnç nedeniyle kemoterapi tedavisinde %100 başarı sağlanamamaktadır. Ptch1 inhibitörü olarak kullanılan ajan ise henüz 2009 yılında keşfedilmiş ve klinik ya da *in vivo* kullanımı söz konusu olmayan robotnikinindir. Robotnikinin Ptch1'i aktiveleyen Shh ligandları ile etkileşime girerek hücreye Shh sinyalinin gitmesini engeller ve böylece sinyal yolunun inaktif kalmasını sağlar. Yapılan çalışmada robotnikinin ve vismodegib ajanlarının tek tek ve kombine kullanımlarında hücrenin canlılık, proliferasyon, migrasyon ve invazyonunun engellenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca *in silico* olarak FDA onaylı vismodegib ve robotnikinin karşılaştırmaları yapılmış ve birçok yönden robotnikinin vismodegibe göre ilaç benzerliğinde daha avantajlı olduğu bulunmuştur.

Tüm bu bilgiler ışığında robotnikinin ajanının U87-MG hücrelerinde etkili bir inhibitör olduğu görülmüştür.

Bundan sonraki çalışmalarda iki inhibitörün de *in vitro* olarak farklı hücre hatlarında denenmesi planlanmaktadır. İlaç etkinliklerinin araştırılabilmesi için çalışmalar daha sonrasında *in vivo* olarak da devam etmelidir.

Yapılan bu çalışma literatürde, Hh sinyal yolunun en önemli 2 proteinin olan Smo'nun inhibitörü vismodegib ve Ptch1'in inhibitörü robotnikinin kombine kullanımlarını içeren ilk çalışmadır.



7. KAYNAKLAR

1. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes and Development*. 2001; 15(23):3059-87.
2. Petrova R, Joyner AL. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development (Cambridge)*. 2014; 141(18):3445-57.
3. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 Signaling Regulates Human Glioma Growth, Cancer Stem Cell Self-Renewal, and Tumorigenicity. *Curr Biol*. 2007; 17(2):165-72.
4. Meng E, Hanna A, Samant RS, Shevde LA. The impact of hedgehog signaling pathway on DNA repair mechanisms in human cancer. *Cancers*. 2015; 7(3):1333-48.
5. Lézot F, Corre I, Morice S, Rédini F, Verrecchia F. SHH Signaling Pathway Drives Pediatric Bone Sarcoma Progression. *Cells*. 2020; 9(3):536.
6. Nüsslein-volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature*. 1980; 287(5785):795-801.
7. Briscoe J, Théron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013; 14(7):416-29.
8. Hooper JE, Scott MP. Communicating with hedgehogs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005; 6(4):306-17.
9. Cheng SY, Michael Bishop J. Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(8):5442-7.
10. Hui CC, Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011; 27:513-37.
11. Yang C, Chen W, Chen Y, Jiang J. Smoothed transduces Hedgehog signal by forming a complex with Evc/Evc2. *Cell Res*. 2012; 22(11):1593-604.
12. Kim J, Kato M, Beachy PA. Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothed in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(51):21666-71.
13. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui CC, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: Implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*. 1999; 126(17):3915-24.
14. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes and Development*. 2008; 22(18):2454-72.
15. Aberger F, Frischauf A-M. GLI Genes and Their Targets in Epidermal Development and Disease. In: *Hedgehog-Gli Signaling in Human Disease*. 2007.
16. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*. 1993; 7(5):812-

- 21.
17. Cooley A, Zelivianski S, Jeruss JS. Impact of cyclin E overexpression on Smad3 activity in breast cancer cell lines. *Cell Cycle*. 2010; 9(24):4900-7.
18. Gaubatz S, Lindeman GJ, Ishida S, Jakoi L, Nevins JR, Livingston DM, et al. E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell*. 2000; 9(24):4900-7.
19. Cui H, Loftus KM, Noell CR, Solmaz SR. Identification of cyclin-dependent kinase 1 specific phosphorylation sites by an *in vitro* kinase assay. *J Vis Exp*. 2018; (135):57674.
20. Yam CH, Fung TK, Poon RYC. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002; 59(8):1317-26.
21. Hagting A, Jackman M, Simpson K, Pines J. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol*. 1999; 9(13):680-9.
22. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* (80-). 1984; 226(4678):1097-9.
23. Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*. 1986; 47(1):19-28.
24. Paznekas WA, Okajima K, Schertzer M, Wood S, Jabs EW. Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P). *Genomics*. 1999;
25. Alexaki VI, Javelaud D, Van Kempen LCL, Mohammad KS, Dennler S, Luciani F, et al. GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 2010; 62(1):42-9.
26. Ke Z, Caiping S, Qing Z, Xiaojing W. Sonic hedgehog–Gli1 signals promote epithelial–mesenchymal transition in ovarian cancer by mediating PI3K/AKT pathway. *Med Oncol*. 2015; 32(1):368.
27. Wu M, Ingram L, Tolosa EJ, Vera RE, Li Q, Kim S, et al. Gli transcription factors mediate the oncogenic transformation of prostate basal cells induced by a Kras-androgen receptor axis. *J Biol Chem*. 2016; 291(49):25749-25760.
28. Regan JL, Schumacher D, Staudte S, Steffen A, Haybaeck J, Keilholz U, et al. Non-Canonical Hedgehog Signaling Is a Positive Regulator of the WNT Pathway and Is Required for the Survival of Colon Cancer Stem Cells. *Cell Rep*. 2017; 21(10):2813-2828.
29. Ng JMY, Curran T. The Hedgehog's tale: Developing strategies for targeting cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2011.
30. Inaguma S, Riku M, Hashimoto M, Murakami H, Saga S, Ikeda H, et al. GLI1 interferes with the DNA mismatch repair system in pancreatic cancer through bhlhe41-mediated suppression of MLH1. *Cancer Res*. 2013; 73(24):7313-23.
31. Mazumdar T, DeVecchio J, Agyeman A, Shi T, Houghton JA. The GLI genes

- as the molecular switch in disrupting Hedgehog signaling in colon cancer. *Oncotarget*. 2011; 2(8):638-45.
32. Singh BN, Fu J, Srivastava RK, Shankar S. Hedgehog signaling antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics: Molecular mechanisms. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27306.
 33. Chandra V, Das T, Gulati P, Biswas NK, Rote S, Chatterjee U, et al. Hedgehog Signaling Pathway Is Active in GBM with GLI1 mRNA Expression Showing a Single Continuous Distribution Rather than Discrete High/Low Clusters. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0116390.
 34. Cui D, Xu Q, Wang K, Che X. Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas. *J Neurol Sci*. 2010; 288(1-2):156-66.
 35. Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2001; 11(5):547-53.
 36. Chen Y, Yue S, Xie L, Pu XH, Jin T, Cheng SY. Dual phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3 β regulates its stability and localization in the primary cilium. *J Biol Chem*. 2011; 286(15):13502-11.
 37. He J, Sheng T, Stelter AA, Li C, Zhang X, Sinha M, et al. Suppressing Wnt signaling by the hedgehog pathway through sFRP-1. *J Biol Chem*. 2006; 281(47):35598-602.
 38. Stockhausen MT, Kristoffersen K, Poulsen HS. The functional role of Notch signaling in human gliomas. *Neuro-Oncology*. 2010; 12(2):199-211.
 39. Ulasov I V., Nandi S, Dey M, Sonabend AM, Lesniak MS. Inhibition of sonic hedgehog and notch pathways enhances sensitivity of cd133+ glioma stem cells to temozolomide therapy. *Mol Med*. 2011; 17(1-2):103-12.
 40. Zhao X, Malhotra GK, Lele SM, Lele MS, West WW, Eudy JD, et al. Telomerase-immortalized human mammary stem/progenitor cells with ability to self-renew and differentiate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(32):14146-51.
 41. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, et al. Sonic hedgehog controls stem cells behavior in the postnatal and adult brain. *Development*. 2005; 132(2):335-44.
 42. Bigelow RLH, Jen EY, Delehedde M, Chari NS, McDonnell TJ. Sonic hedgehog induces epidermal growth factor dependent matrix infiltration in HaCat keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2005; 124(2):457-65.
 43. Johnson RW, Nguyen MP, Padalecki SS, Grubbs BG, Merkel AR, Oyajobi BO, et al. TGF- β promotion of Gli2-induced expression of parathyroid hormone-related protein, an important osteolytic factor in bone metastasis, is independent of canonical Hedgehog signaling. *Cancer Res*. 2011; 71(3):822-31.
 44. Ju B, Spitsbergen J, Eden CJ, Taylor MR, Chen W. Co-activation of hedgehog and AKT pathways promote tumorigenesis in zebrafish. *Mol Cancer*. 2009; 8:40.

45. Po A, Ferretti E, Miele E, De Smaele E, Paganelli A, Canettieri G, et al. Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *EMBO J.* 2010; 29(15):2646-58.
46. Milla LA, González-Ramírez CN, Palma V. Sonic hedgehog in cancer stem cells: A novel link with autophagy. *Biological Research.* 2012; 45(3):223-30.
47. Kurita S, Mott JL, Almada LL, Bronk SF, Werneburg NW, Sun SY, et al. GLI3-dependent repression of DR4 mediates hedgehog antagonism of TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene.* 2010; 29(34):4848-58.
48. Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. Breast cancer growth and metastasis: Interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Research.* 2011; 13(3):211.
49. Theunissen JW, De Sauvage FJ. Paracrine hedgehog signaling in cancer. *Cancer Research.* 2009; 69(15):6007-10.
50. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(D1):D353-D361.
51. Takezaki T, Hide T, Takanaga H, Nakamura H, Kuratsu J ichi, Kondo T. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells. *Cancer Sci.* 2011; 102(7):1306-12.
52. Mechlin CW, Tanner MJ, Chen M, Buttyan R, Levin RM, Mian BM. Gli2 Expression and Human Bladder Transitional Carcinoma Cell Invasiveness. *J Urol.* 2010; 184(1):344-51.
53. Jiang C-L, Chen L-C, Cui Y-Q, Du W-Z, Li Y-L, Liu Y, et al. Targeting glioma stem cells via the Hedgehog signaling pathway. *Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2014; 1:51-59.
54. Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2006; 5(12):1026-33.
55. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1):D1074-D1082.
56. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(D1):D1388-D1395.
57. Dijkgraaf GJP, Aliche B, Weinmann L, Januario T, West K, Modrusan Z, et al. Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothened mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res.* 2011; 71(2):435-44.
58. Yan M, Wang L, Zuo H, Zhang Z, Chen W, Mao L, et al. HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011; 47(6):504-9.
59. Sharpe HJ, Pau G, Dijkgraaf GJ, Basset-Seguin N, Modrusan Z, Januario T, et al. Genomic Analysis of Smoothened Inhibitor Resistance in Basal Cell Carcinoma. *Cancer Cell.* 2015; 27(3):327-41.

60. Atwood SX, Sarin KY, Whitson RJ, Li JR, Kim G, Rezaee M, et al. Smoothed Variants Explain the Majority of Drug Resistance in Basal Cell Carcinoma. *Cancer Cell*. 2015; 27(3):342-53.
61. Mateska I, Nanda K, Dye NA, Alexaki VI, Eaton S. Range of SHH signaling in adrenal gland is limited by membrane contact to cells with primary cilia. *J Cell Biol*. 2020; 219(12):e201910087.
62. Uchida H, Arita K, Yunoue S, Yonezawa H, Shinsato Y, Kawano H, et al. Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells. *J Neurooncol*. 2011; 104(3):697-704.
63. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW. Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Letters*. 2015; 362(1):1-7.
64. ATCC. ATCC Cell Lines by Gene Mutation. In: *Cell Culture Guides*. 2019.
65. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition*. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition. 2011.
66. Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, et al. Cyclopamine-Mediated Hedgehog Pathway Inhibition Depletes Stem-Like Cancer Cells in Glioblastoma. *Stem Cells*. 2007; 25(10):2524-33.
67. Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, Nakai K, Wang X, Duffner JL, et al. A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol*. 2009; 5(3):154-6.
68. De Abreu Costa L, Ottoni MHF, Dos Santos MG, Meireles AB, De Almeida VG, De Fátima Pereira W, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) decreases cell proliferation and TNF- α , IFN-, and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes. *Molecules*. 2017; 22(11):1789.
69. Huang D, Wang Y, Tang J, Luo S. Molecular mechanisms of suppressor of fused in regulating the hedgehog signalling pathway. *Oncology Letters*. 2018; 15(5):6077-6086.
70. Ozkan AS, Akyol M, editors. *Dermatoonkoloji*. Izmir: O'Tıp Kitapevi; 2019.
71. "FDA approves Erivedge (vismodegib) capsule, the first medicine for adults with advanced basal cell carcinoma". Roche. 30 January 2012. Retrieved 9 August 2020
72. Wirsching, H. G., Galanis, E., Weller, M. Glioblastoma. *Handbook of clinical neurology*, 2016; 134:381-97.
73. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444(7120):756-60.

8. EKLER

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. Yasemin Başpınar

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4918-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hedgehog Yolağında Yer Alan Smo İnhibitörlerinin Ptch1 İnhibitörleri ile Kombine Kullanımının İn Vitro Hücre Proliferasyon ve İnvazyonuna Etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Yasemin Başpınar Onkoloji Enstitüsü
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐ ÇOK MERKEZLİ ☒

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2020/27-41	Tarih:09.11.2020				
	Prof.Dr. Yasemin Başpınar'ın sorumlusu olduğu "Hedgehog Yolağında Yer Alan Smo İnhibitörlerinin Ptc1 İnhibitörleri ile Kombine Kullanımının İn Vitro Hücre Proliferasyon ve İnvasyonuna Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait sorumlu araştırmacı dilekçesine ilişkin; -Çalışmaya Hedgehog yolağını kullanan glioblastom hücre hattı ile devam edilmesi ile ilgili yapılan değişiklikler, -Güncellenmiş literatür listesi, İle ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL (Başkan Yardımcısı)	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu



ASLIHAN KARADAĞ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

09 Ağustos 2018 - Şu Anda (3 yıl)

Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TRANSLASYONEL ONKOLOJİ (YL) (TEZLİ)

Diploma Numarası: -

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 4.0 / 4.0

03 Eylül 2013 - 09 Temmuz 2018 (4 yıl 11 ay)

Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
BİYOKİMYA BÖLÜMÜ, BİYOKİMYA PR.

Diploma Numarası: 2017/04/0355

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.71 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Haziran 2017 - 01 Temmuz 2017 (2 ay) (Tam Zamanlı)

STAJYER, EGE ÜNİVERSİTESİ NÜKLEER BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- İç Hastalıkları -- Onkoloji

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Biyokimya

Teknik Bilimler -- Kimya Mühendisliği ve Teknolojisi -- Biyoteknoloji --
Biyoteknolojik Prosesler ve Fermentasyon Teknolojisi

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

H. E. MEÇO, A. KARADAĞ, S. ÖMEROĞLU, G. AYDEMİR, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, M. E. ORUÇ, H. ÜVET & Y. BAŞBINAR, Optimization of Different Surface Modifications for Binding of Tumor Cells in a Microfluidic Systems, Journal of Basic and Clinical Health Sciences, 2019, 2458-8938, 3, 2, 73-77.

A. PAKDEMİRLİ, F. TOKSÖZ, A. KARADAĞ, H. K. MISIRLIOĞLU, Y. BAŞBINAR, H. ELLİDOKUZ & O. AÇIKGÖZ, Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Soluble Factors and Folic Acid in Wound Healing , turkish journal of medical sciences, 2019, 1300-0144, 49, 3, 914-921.

A. PAKDEMİRLİ, B. BAYRAM, A. KARADAĞ & H. E. MEÇO, Uluslararası yayın etkinliklerinin performansı: Türkiye’de ‘Fizyoloji’ alanı çalışmaları, Sağlık akademisyenleri dergisi, 2019, 2148-7472, 6, 2, 136-141.

Bildiriler

S. ÖMEROĞLU, R. VAROL, Z. KARAVELİOĞLU, A. KARADAĞ, Y. BAŞBINAR, M. E. ORUÇ & H. ÜVET, Determination of Cell Stiffness Using Polymer Microbeads as Reference, Tam Metin Bildiri, TIPEKNO, 19 Kasım 2020, 20 Kasım 2021.

H. KURTER, N. MERT ÖZÜPEK, A. KARADAĞ, Y. BAŞBINAR & G. ÇALIBAŞI KOÇAL, Drug-Likeness Analysis of Anthocyanidin, Özet Bildiri, Sağlıkta Yapay Zeka, 16 Nisan 2021, 18 Nisan 2021, 2757-9778, 1, 2, 75 - 75.

A. KARADAĞ, H. KURTER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL & Y. BAŞBINAR, Drug-like Prediction Targeting Inhibition of The Hedgehog Signaling Pathway, Özet Bildiri, 2. ULUSLARARASI SAĞLIKTA YAPAY ZEKA KONGRESİ, 16 Nisan 2021, 18 Nisan 2021, 2757-9778.

A. KARADAĞ, H. KURTER, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, G. GENÇOĞLAN, H. ELLİDOKUZ & Y. BAŞBINAR, The Effect of Inhibitors and Antagonists on The Hedgehog Signaling Pathway, Tam Metin Bildiri, 5th International Hippocrates Congress On Medical And Health Sciences, 18 Aralık 2020, 19 Aralık 2020, 1 - 5.

R. VAROL, G. AYDEMİR, A. KARADAĞ, H. E. MEÇO, S. ÖMEROĞLU, M. E. ORUÇ, Y. BAŞBINAR, G. B. ESMER & H. ÜVET, Holographic Imaging of Cancer Cell Proliferation, Sözlü Sunum, 2nd International Cancer and Ion Channels Congress, 22 Eylül 2019, 24 Eylül 2019.

S. ÖMEROĞLU, H. E. MEÇO, A. KARADAĞ, G. AYDEMİR, R. VAROL, M. E. ORUÇ, Y. BAŞBINAR, G. B. ESMER & H. ÜVET, Immobilization of CTCs on Silane-Modified Surfaces, Tam Metin Bildiri, 2nd International Cancer and Ion Channels Congress , 20 Eylül 2019, 22 Eylül 2019, 1303-829X, S2.

A. LEBLEBİCİ, B. UNCU, G. ÇALIBAŞI KOÇAL, A. PAKDEMİRLİ, N. YILDIRIM, N. MERT ÖZÜPEK, A. KARADAĞ, H. ELLİDOKUZ & Y. BAŞBINAR, RAW DATA ANALYSIS OF PIWI-INTERACTIVE RNAs IN OVARIAN CANCER, Sözlü Sunum, International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, 01 Mart 2019, 03 Mart 2019.

S. GÜLER, G. YEĞEN, A. KARADAĞ, M. AYDEMİR, E. ERDOĞAN ÖZŞEKER & A. AKKAYA, Degradation Of Burdirect Red 4BS by Pseudomonas putida (ATCC 17514), Sözlü Sunum, 28th National Chemistry Congress, 20 Ağustos 2016, 21 Ağustos 2016.

Projeler

TÜBİTAK 1001/3501/1003, BURSİYER, Dolaşımdaki Kanserli Hücrelerin (ctcs) Mekanik Sertlik (cell Stiffness) Yapısındaki Değişimini Kantitatif Faz Görüntüleme Yöntemi Kullanarak Ölçen Holografik Tek Hücre Görüntüleme Tekniği, Yürütülen Kuruluş: ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ (Devam ediyor) .

BAP, ARAŞTIRMACI, Hedgehog Yolağında Yer Alan Smo İnhibitörlerinin Ptch1 İnhibitörleri ile Kombine Kullanımının in vitro Hücre Proliferasyon ve İnvazyonuna Etkisi , Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

Ödüller

Diğer, Uluslararası, Holographic Imaging of Cancer Cell Proliferation, Tailor of Science Biotechnology Application Award , Ödül Alınan Kurum: TAILOR OF SCIENCE BIYOTEKNOLOJİ İNOVASYON A.Ş, TÜRKİYE, 22 Eylül 2019.

Diğer, Uluslararası, 5. Uluslararası Gıda Arge Proje Pazarı, Gıda Ambalaj Materyali Geliştirilmesi, Ödül Alınan Kurum: EGE İHRACATÇI BİRLİKLERİ, TÜRKİYE, 26 Mayıs 2017.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

116E866, Dolaşımdaki Kanseri Hücrelerin (Ctcs) Mekanik Sertlik (Cell Stiffness) Yapısındaki Değişimini Kantitatif Faz Görüntüleme Yöntemi Kullanarak Ölçen Holografik Tek Hücre Görüntüleme Tekniği, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Burslu, Yürürlükte, ARDEB, EEEAG - Elektrik, Elektronik Ve Enformatik Araştırma Destek Grubu, Proje Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.10.2018 - 15.12.2021, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.12.2017 - 15.12.2021.

BİDEB Destekleri

ASLIHAN KARADAĞ, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2019 - 2, 01.10.2019 - 30.09.2020.

ASLIHAN KARADAĞ, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2020 - 2, 01.10.2020 - 30.09.2021.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0