

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**OVER KANSERİ HÜCRELERİNDE DNA HASARI VE GOLGİ
STRESİNE YANITTA APOPTOTİK MEKANİZMALARIN
ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

YELİZ AKA

DOKTORA TEZİ

ANKARA- 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

OVER KANSERİ HÜCRELERİNDE DNA HASARI VE GOLGİ
STRESİNE YANITTA APOPTOTİK MEKANİZMALARIN
ARAŞTIRILMASI

HAZIRLAYAN

YELİZ AKA

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. F. BELGİN ATAÇ

ANKARA- 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Yeliz AKA tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/09/2024

Tez Adı: Over Kanseri Hücrelerinde DNA Hasarı ve Golgi Stresine Yanıtta Apoptotik Mekanizmaların Araştırılması

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

ONAY

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

Tarih: 10 /10/ 2024

Öğrencinin Adı, Soyadı: Yeliz AKA

Öğrencinin Numarası: 22020354

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Programı: Tıbbi Biyoloji Doktora

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı:

Tez Başlığı: Over Kanseri Hücrelerinde DNA Hasarı ve Golgi Stresine Yanıtta Apoptotik Mekanizmaların Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 105 sayfalık kısmına ilişkin, 10 / 10 / 2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 11'dir. Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Öğrenci İmzası:.....

ONAY

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji Doktora sürecimde; bilgi, ilgi, desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, daima bana yol gösteren danışman hocam Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Biyoloji Doktora eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimlerini paylaşan; ilgisi, desteği ile yönlendiren, enerjisi ile bana güç veren sevgili hocam Prof. Dr. Hasibe VERDİ’ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez süresi boyunca bilgisini ve desteğini esirgemeyen Tez İzleme Kurulu üyelerinden sayın hocam Prof. Dr. Şefik Güran’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarına ve bana verdiği destekten dolayı Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK’e teşekkürlerimi sunarım.

Bilim insanı olma yolunda bana ışık tutan, hayallerimi gerçekleştirmek için bu yolda bana daima güvenen ve destek olan Prof. Dr. Özgür KÜTÜK’e içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Biyoloji Laboratuvarlarında desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Yaprak YALÇIN ve Dr. Öğr. Üyesi H. Pınar BAYSAN ÇEBİ’ye çok teşekkür ederim.

Laboratuvar süreçlerinde her zaman destek olan Sağlık Teknisyeni Serap SEZER ve Sağlık Teknisyeni Yüksel SÜER’e çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, bana sevgilerini hissettiren, eğitim sürecime sabreden ve destek veren, onlardan güç alarak bu yolda ilerlememi sağlayan, çocuklarım olmasından gurur duyduğum sevgili Ecemnaz ÖZMAY ve Batuhan ÖZMAY’a sonsuz sevgilerimle teşekkür ederim.

Yanımda olamasalar da varlıklarını her daim hissettiğim sevgili babam Doğan AKA, abim Dr. Sertel AKA’ya ve her an, her anlamda yanımda olmalarını, desteklerini hissettiğim sevgili annem Hatice AKA, ablalarım Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR, Doç. Dr. Deniz AKA SATAR, Prof. Dr. Filiz AKA BOLAT’a sonsuz sevgilerimle teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

AKA Y. OVER KANSERİ HÜCRELERİNDE DNA HASARI VE GOLGİ STRESİNE YANITTA APOPTOTİK MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI. BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA TEZİ, 2024.

Over kanseri, metastatik aşamada tanı konması ve gelişen kemoterapi direnci nedeniyle tüm jinekolojik kanserler arasında mortalite oranı en yüksek olan kanser türüdür. Tümörün cerrahi olarak çıkarılmasına ve platin bazlı kemoterapiye rağmen, birçok over kanseri hastası kanser tekrarlaması nedeniyle hastalığa yenik düşmektedir. Bu nedenle, over kanseri hastalarının prognozunu iyileştirmek için yeni tedavi stratejileri esastır. Replikasyon stresi over kanserinin yaygın bir özelliğidir ve ATR/CHK1 sinyalleme hücreleri replikasyon stresine karşı korumada öncelikli olarak rol oynar. ATR inhibitörünün tekil uygulamaları olmakla birlikte kombine tedavi uygulamalar da spesifik hedefler olarak etkinlik gösterirler. Over kanserlerinde ATR inhibitörleri birçok çalışmada kombine olarak mitokondriyal hücre ölüm yollarını aktive etse de çalışmalar kısıtlı kalmaktadır.

Bu tez çalışmasıyla over kanseri hücrelerinde etkinlik gösterebilecek yeni bir moleküler kombinasyon tedavisinin, hem de bu kombinatoriyal uygulamanın moleküler çalışma mekanizmalarının bulunması hedeflenmiştir. Yüksek verimli küçük molekül tarama analizini kullanarak, over kanseri hücrelerinde en etkili hücre ölümü indükleyen kombinasyon olarak AZD6738 (ATR inhibitörü) /Brefeldin A (Golgi stres indükleyicisi) belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar ile AZD6738/Brefeldin A'nın eş zamanlı uygulanması, SKOV3 (**p<0.001, kontrol vs AZD6738+BFA) ve IGROV1 (**p<0.01, kontrol vs AZD6738+BFA) over kanseri hücrelerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır. AZD6738/Brefeldin A maruziyeti ayrıca sitozole sitokrom c translokasyonunu da indükler; bu, mitokondriyal hücre ölüm yolunun karakteristik bir özelliğidir. Buradaki en önemli moleküler süreç, SKOV3 ve IGROV1 hücrelerinde AZD6738/Brefeldin A'nın kombinatoriyal kullanımı, anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri BCL-2, BCL-XL ve MCL1'in ifade seviyelerinde azalmaya yol açarken, özellikle BIM ve PUMA olmak üzere pro-apoptotik BCL-2 proteinlerinin ifade

seviyelerinde artışa neden olur. Tüm bu bulgular, AZD6738/Brefeldin A'nın over kanseri için potansiyel bir tedavi yaklaşımı olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Over Kanseri, DNA hasarı, ATR, Golgi stresi, Hücre Ölümü

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA23/09) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu'na teşekkürlerimizi sunarız.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 223Z241 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

ABSTRACT

**AKA Y. EXPLORING THE APOPTOTIC MECHANISMS IN RESPONSE TO DNA
DAMAGE AND GOLGI STRESS IN OVARIAN CANCER CELLS. BASKENT
UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES, MEDICAL BIOLOGY PHD.
THESIS, THESIS,2024**

Ovarian cancer has the highest mortality rate among all gynecologic cancers due to its diagnosis at the metastatic stage and developing chemotherapy resistance. Despite surgical removal of the tumor and platinum-based chemotherapy, many ovarian cancer patients succumb to the disease due to cancer recurrence. Therefore, new treatment strategies are essential to improve the prognosis of ovarian cancer patients. Replication stress is a common feature of ovarian cancer, and ATR/CHK1 signaling plays a primary role in protecting cells from replication stress. Although ATR inhibitors have single applications, combination therapeutic applications also show efficacy as specific targets. Although ATR inhibitors activate mitochondrial cell death pathways in combination in many studies in ovarian cancer, studies remain limited.

This thesis study aimed to find a new molecular combination therapy that could be effective in ovarian cancer cells, as well as the molecular working mechanisms of this combinatorial application. Using high-throughput small molecule screening analysis, AZD6738 (ATR inhibitor)/Brefeldin A (Golgi stress inducer) was determined as the most effective cell death-inducing combination in ovarian cancer cells. Experimental studies have shown that simultaneous application of AZD6738/Brefeldin A causes apoptotic cell death in SKOV3 (** $p < 0.001$, control vs AZD6738+BFA) and IGROV1 (** $p < 0.01$, control vs AZD6738+BFA) ovarian cancer cells, together with caspase-3 and caspase-9 activation. AZD6738/Brefeldin A exposure also induces cytochrome c translocation to the cytosol, which is a characteristic feature of the mitochondrial cell death pathway. The most important molecular process here is that the combinatorial use of AZD6738/Brefeldin A in SKOV3 and IGROV1 cells leads to a decrease in the expression levels of anti-apoptotic BCL-2 family members BCL-2, BCL-XL and MCL1, while it leads to an increase in the expression levels of pro-apoptotic BCL-2 proteins, especially BIM and PUMA. All these findings suggest that AZD6738/Brefeldin A is a potential therapeutic approach for ovarian cancer.

Keywords: Ovarian Cancer ATR, DNA Damage, Golgi Stress, Cell Death,

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project no: DA23/09) and supported by Baskent University Research Fund. The authors thank to Baskent University Institutional Review Board for their supports.

This study was supported by Scientific and Tecnological Research Council of Turkey (TUBITAK) under the Grant Number 223Z241. The authors thank to TUBITAK for their supports.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Over Kanseri ve Over Kanserin Epidemiyolojisi	3
2.2. Over Kanserin Histopatolojisi	3
2.2.1. Over kanserlerinin sınıflandırması	3
2.2.2. Over Kanserlerinin moleküler patolojik sınıflandırması.....	5
2.2.3. Epitelyal over kanserlerinin klinik seyri ve tedavi yaklaşımları	10
2.3. Over Kanserlerinin Moleküler Genetik Mekanizması	11
2.3.1. Over kanserinde hücre siklusu	12
2.3.2. Over kanserinde DNA hasar ve tamir mekanizmaları.....	13
2.3.3. ATR sinyal ileti yolları.....	16
2.3.4 ATR inhibitörleri	21
2.4. Golgi Kompleksi	23
2.4.1. Golgi kompleksinin yapısal ve fonksiyonel işlevleri.....	23
2.4.2. Golgi kompleksi stresi ve hücre ölümü	27
2.4.3. Golgi kompleks stres indükleyici molekül	29
2.5. Programlanmış Hücre Ölümü	29
2.6. Çalışmanın Amacı	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar.....	35
3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar	35
3.1.2. Çalışmada kullanılan malzemeler	36

3.1.2.1. Hücre kültürü	36
3.1.2.2. Immunblot Analiz	36
3.1.2.3. RT-qPCR analiz	37
3.1.2.3. Apoptotik hücre ölüm analizi.....	38
3.1.2.4. 3D Algimatrix tümör sferoid kültürleri	38
3.1.2.5. Golgi stresi analizi	38
3.2. Araştırma Planı ve Yöntemler	39
3.2.1. Araştırma Ön Çalışma.....	39
3.2.2. Hücre kültürü	42
3.2.2.1. Hücrelerin çözündürülmesi	42
3.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması.....	43
3.2.2.3. Hücrelere ilaç uygulanması.....	43
3.2.2.4. Hücrelerden total protein izolasyonu	44
3.2.3. İmmunblot analiz	44
3.2.3.1. Bradford yöntemi	44
3.2.3.2. İmmunblot yöntemi.....	45
3.2.4. RT-qPCR analiz	46
3.2.4.1. Hücre kültürü materyalinden total RNA izolasyonu.....	46
3.2.4.2. RNA saflığının ve miktarının tayini	47
3.2.4.3. İzole edilen RNA'ların RT-PCR analizi.....	47
3.2.5. Apoptotik hücre ölüm analizi.....	48
3.2.5.1. Annexin V/PI testi	48
3.2.5.2. Kaspaz -3 ve -9 aktivasyon testi	48
3.2.5.3. Sitokrom c salınım testi	48
3.2.5.4. BAX/BAK aktivasyon testi	49
3.2.6. 3D Algimatrix sferoid kültürleri.....	49
3.2.7. Golgi kompleksi stres	50
3.2.7.1. GM130 immunfloresan görüntüleme	50
3.3. İstatiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR	51
4.1. BCL-2 Ailesi Immunblot Bulgular	51

4.2. RT-PCR Analiz Bulguları	59
4.2.1. IGROV1 hücrelerinde AZD6738 uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları.....	59
4.2.2. IGROV1 hücrelerinde BFA uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları.....	61
4.2.3. IGROV1 hücrelerinde AZD6738+BFA uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları	63
4.2.4. SKOV3 hücrelerinde AZD6738 uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları.....	65
4.2.5. SKOV3 hücrelerinde BFA uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları.....	67
4.2.6. SKOV3 hücrelerinde AZD6738+BFA uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları	69
4.3. Apoptotik Hücre Ölüm Analiz Bulguları.....	71
4.3.1. Annexin V/ PI bulguları	71
4.3.2. Kaspaz -3 ve -9 aktivasyon bulguları	72
4.3.3. Sitokrom c salınım bulguları.....	74
4.3.4. BAX/BAK aktivasyon bulguları	75
3.2.5. 3D Algimatrix Spheroid Kültür Bulguları.....	76
3.2.6. GM130 Immunofloresan Boyama	79
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	86
KAYNAKLAR.....	87

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. RT-qPCR Çalışma Döngüsü	47
--	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Over Kanseri Patolojik Sınıflandırması .	4
Şekil 2. Fallop tüpünün epitelinden HGSOc başlatma modeli .	10
Şekil 3. Hücre Siklusu ve DNA Tamiri .	13
Şekil 4. DNA Tamir Mekanizması .	16
Şekil 5. ATR-Chk1 yolağının DNA hasarına cevaben aktive olması .	18
Şekil 6. ATR' ye bağlı replikasyon stres yanıtının aktivasyonu .	20
Şekil 7. AZD6738'in kimyasal yapısı .	21
Şekil 8. Hücre İçi Protein Trafikinde Golgi Kompleksi .	24
Şekil 9. Programlı Hücre Ölüm Yolağı .	31
Şekil 10. Çalışma Planı .	34
Şekil 11. SKOV3, IGROV1 ve HOEC hücrelerinin AZD6738 için EC ₅₀ değerleri .	39
Şekil 12. SKOV3 hücrelerinin AZD6738, Brefeldin A, AZD6738/Brefeldin A kombinasyonu ve diğer kemoterapi ilaçlarına apoptotik yanıtı .	40
Şekil 13. Küçük molekül tarama stratejisi .	41
Şekil 14. Örnek tarama sonucunda Brefeldin A öncelikli moleküler hit olarak belirlenmesi .	42
Şekil 15. IGROV1 Hücre Hattı BCL-2 Protein seviyeleri .	51
Şekil 16. IGROV1 Hücre Hattı AZD6738 Cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi .	52

Şekil 17. IGROV1 Hücre Hattı BFA Cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi	53
Şekil 18. IGROV1 Hücre Hattı AZD6738 ve BFA cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi.....	54
Şekil 19. SKOV3 Hücre Hattı BCL-2 Protein seviyeleri	55
Şekil 20. SKOV3 Hücre Hattı AZD6738 cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi	56
Şekil 21. SKOV3 Hücre Hattı BFA cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi	57
Şekil 22. SKOV3 Hücre Hattı AZD6738 ve BFA cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi.....	58
Şekil 23. IGROV1 AZD6738 cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu	60
Şekil 24. IGROV1 BFA cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu.....	62
Şekil 25. IGROV1 AZD6738+BFA cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu	64
Şekil 26. SKOV3 AZD6738 cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu	66
Şekil 27. SKOV3 BFA cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu	68
Şekil 28. SKOV3 AZD6738+BFA cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu	70
Şekil 29. IGROV1, SKOV3 ve HOEC hücreleri AZD6738, BFA, AZD6738+BFA Annexin V/PI apoptotik hücre yanıtları.	71
Şekil 30. IGROV1 ve SKOV3 hücreleri AZD6738, BFA, AZD6738+BFA cevaben, Immunblot Kaspaz Apoptotik Hücre Yanıtı..	72
Şekil 31. SKOV3 ve IGROV1 hücreleri AZD6738, BFA, AZD6738+BFA cevaben, Luminometrik Kaspaz Apoptotik Hücre Yanıtı	73
Şekil 32. SKOV3 ve IGROV1 hücreleri AZD6738, BFA veya AZD6738+BFA cevaben, Sitokrom c Apoptotik Hücre Yanıtı.....	74

Şekil 33. IGROV1 ve SKOV3 hücreleri AZD6738, BFA, AZD6738+BFA cevaben, BAX ve BAK Apoptotik Hücre Yanıtı.....	75
Şekil 34. SKOV3 ve IGROV1 hücrelerinin 3D Tümör Sferoid Kültürleri	76
Şekil 35. SKOV3 ve IGROV1 Tümör Sferoidleri AZD6738, BFA veya AZD6738+BFA cevaben Hücre Canlılığı Sonuçları	77
Şekil 36. SKOV3 ve IGROV1, AZD6738, BFA, AZD6738+BFA cevaben tümör sferoidlerinde kaspaz-3, kaspaz-9 PARP fragmanlarının değerlendirilmesi.	78
Şekil 37. SKOV3 BFA, AZD6738 ve BFA+ AZD6738 cevaben Golgi Morfolojisi değerlendirilmesi	79
Şekil 38. SKOV3 BFA, AZD6738 ve BFA+ AZD6738 cevaben Golgi Morfolojisinin istatistiksel değerlendirilmesi.	80

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AKAP450	A-kinaz çapa proteini 9, A-kinase anchor protein 9
AKT	Protein kinaz B, Protein kinase B
ARF	ADP-ribosilasyon faktörleri
ARID1A	AT açısından zengin etkileşimli alan içeren protein 1A, AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ATM	mutasyona uğramış Ataksi-telenjipektazi, Ataxia-telangiectasia Mutated
ATR	Rad3 ile ilişkili ve ATM, ATM and Rad3-related
ATRIP	ATR etkileşim proteini, ATR-interaction protein
BAD	BCL2 hücre ölümünün ilişkili agonisti, BCL2 associated agonist of cell death
BAX	BCL-2 ile ilişkili X proteini, BCL-2-associated X protein
BAK	BCL-2 antagonisti katili 1, BCL-2 antagonist killer 1
BCL-2	B hücreli lenfoma, B-cell lymphoma
BCL-XL	B hücreli lenfoma-ekstra büyük, B-cell lymphoma-extra-large
BCL-W	BCL-2 benzeri protein, BCL-2-like protein
BER	Baz eksizyon onarımı, base excision repair
BFL1	Bcl-2 ile ilişkili protein A1, Bcl-2-related protein A1
BH3	BCL-2 homolojisi 3, BCL-2 homology 3
BID	BH3 etkileşimli alan ölüm agonisti, BH3 interacting-domain death agonist
BIK	Bcl-2 ile etkileşen öldürücü, Bcl-2-interacting killer
BIM	Bcl-2 hücre ölümü etkileşim aracısı, Bcl-2 interacting mediator of cell death
BLM	Bloom sendrom protein, Bloom syndrome protein
BRAF	v-Raf mürin sarkoma viral onkojen homolog B, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BRCA1/2	Meme Kanseri 1/2, Breast Cancer 1/2
CASPASE	Sistein Aspartat spesifik proteaz, Cysteine Aspartate specific protease
CAS9	CRISPR ile ilişkili nükleaz-9, CRISPR-associated nuclease 9

CA-125	Kanser Antijen 125, Cancer Antigen 125
CDC25	hücre bölünme döngüsü 25 protein, cell division cycle 25
CDK	Siklin-bağımlı kinazlar, Cyclin-dependent kinases
CHK1	Kontrol noktası kinaz 1, Checkpoint kinase 1
CHK2	Kontrol noktası kinaz 2, Checkpoint kinase 2
c-Myc	hücresel Miyelositomatozis, cellular Myelocytomatosis
CLASP	sitoplazmik bağlayıcı ilişkili proteinler, cytoplasmic linker associated proteins
CRISPR-	düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrar, clustered regularly interspaced short, palindromic repeat
CRISPR/Cas9	CRISPR/CRISPR ilişkili nükleaz 9- (CRISPR/CRISPR-associate nuclease-9)
COP1	Kaplama proteini 1, Coat protein I
COXIV	Sitokrom c oksidaz IV, Cytochrome c oxidase IV
DDR	DNA hasar cevabı, DNA damage response
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNAPKcs	DNA'ya bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
dNTP	deoksiribonükleotid trifosfat
DSB	çift-zincir DNA kırıkları, double strand break
EOVC	Endometrioid over karsinom, Endometrioid over carcinoma
ERBB2	Eristoblastik onkogen B, Erythroblastic oncogene B
FANC1	Fanconi anemisi tamamlayıcı grup I, Fanconi anemia complementation group 1
FANCD2	Fankoni anemisi grubu D2 proteini, Fanconi anemia group D2 protein
FAT	FRAP-ATM-TRRAP
FATC	FAT karboksi-terminal FAT carboxi-terminal
FBS	Fetal bovine serum
FRAP	FKBP12 rapamisinle ilişkili protein-FKBP12 rapamycin-associated protein
GCCC88	88C içeren sarmal-sarmal alan, Coiled-coil domain containing 88C

GM130	Golgi matriks proteini
GOLM1	Golgi membrane protein 1, Golgi membran protein
GOLPH3	Golgi fosfoprotein 3, Golgi phosphoprotein 3
GRASP	Golgi yeniden birleşme ve proteinlerin yığılması, Golgi Reassembly and Stacking Proteins
GRIP	Golgin-97, RanBP2alpha, Imh1p and p230/golgin-245
GTP	Guanozin-5'-trifosfat
HGSOC	High-grade serous ovarian cancer, Yüksek-dereceli seröz over karsinom
HOEC	İnsan over epitel hücresi, Human Ovarian Epitel Cell
HR	Homolog rekombinasyon, Homologous Recombination
IR	iyonlaştırıcı radyasyon
KRAS	Kirsten fare sarkoma virüs, Kirsten Rat Sarcoma Virüs
LGSOC	Düşük-dereceli seröz over karsinomları, Low-grade serous ovarian cancer
MACF1	Mikrotübül-aktin çapraz bağlama faktörü 1 Microtubule-actin cross-linking factor 1,
Mec1	Mitoz giriş kontrol noktası proteini, Mitosis entry checkpoint protein
MCL1	Miyeloid hücreli lösemi, Myeloid Cell Leukemia 1
MGMT	O ⁶ -metilguanin DNA metil transferaz, O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase
MCM	Minikromozom tamir kompleksi, Minichromosome maintenance complex
MDC1	DNA hasar kontrol noktası 1 aracısı, mediator of DNA damage checkpoint 1
MMR	Yanlış eşleşme onarımı, Mismatch repair
mTOR	memelilerde rapamisin hedef protein, mammalian Target of rapamycin
MOC	Müsinöz over karsinomları, Mucinous ovarian carcinoma
MOMP	Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu, Mitochondrial Outer Membrane Permeability
MRN	MRE11/RAD50/NBS1
MSH	MutS homolog

MYO18A	Miyozin-XVIII, Myosin-XVIIIa
MTOC	Mikrotübül düzenleme merkezi, Microtubule organizing center
NER	Nükleotid eksizyon onarımı, Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Homolog olmayan uç birleştirme, Nonhomologous End Joining
OCCC	Şeffaf hücreli over karsinomları, Ovarian clear cell carcinoma
PALPB2	BRCA2 ortağı ve yerini belirleyici, partner and localizer of BRCA2
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz, Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu, Polymerase chain reaction
PIKK	Fosfatidilinositol 3-kinazla ilişkili kinazlar, Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases
PI3K	Fosfoinozotid 3-kinazlar Phosphoinositide 3-kinases
PIK3CA	Fosfotidil 3-kinaz, katalitik 110-KD alfa, Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic 110-KD alpha
PRD	PIKK düzenleyici alan, PIKK-Regulation domain
PTEN	Fosfat ve tensin homolog, Phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53-apoptozisin yukarı düzenlenmiş modülatörü, p53- upregulated modulator of apoptosis
RAS	fare sarkoma virüs, rat sarcoma virüs
RB	Retinoblastom
RIHNO	Rad9, Rad1, Hus1 için etkileşimli tek nükleer protein, for Rad9, Rad1, Hus1 interacting nuclear orphan,
RNAi	RNA interferans, RNA interference
ROS	reaktif oksijen türleri, reactive oxygen species
RPA	Replikasyon protein A, Replication Protein A
RRM2	Ribonükleozid-difosfat redüktaz alt birimi M2, Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2
SMARCA1	Kromatin alt ailesi A benzeri protein 1'in SWI/SNF ile matris ilişkili aktin bağımlı düzenleyicisi, SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily

SMG1	Serin/treonin-protein kinaz 1, Serine/threonine-protein kinase 1
SNAP	Çözünür N-etilmaleimid-hassas faktör bağlantı proteinleri, Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Proteins
SNARE	SNAP Reseptör, SNAP Receptors
SSA	tek sarmal uzatma, single strand annealing
SSDNA	tek-zincirli DNA uzantılar, single strand DNA
STIC	Seröz Tubal İntraepitelyal Karsinom, Seröz Tubal Intraepitelyal Carsinom
TCGA	kanser genom atlas, the cancer genome atlas
TC-NER	transkripsiyonla birleştirilmiş nükleotid eksizyon onarımı Transcription-coupled nucleotide excision repair
TGN	trans golgi network
TopBP1	DNA topoizomeraz 2-bağlayıcı protein 1, DNA topoisomerase 2-binding protein 1
TP53	Tumor protein p53, Tumor protein p53
TRAPP	Transformasyon/transkripsiyon alanıyla ilişkili protein, Transformation/transcription domain-associated protein
TMEJ	Polθ-aracılı uç birleştirme, Polθ-mediated end joining
UV	ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü, World Health Organization
WRN	Werner sendrom helikaz, Werner syndrome helicase
XLFI	XRCC4 benzeri faktör, XRCC4-like factor
XRCC1	X-ışını çapraz tamamlayıcı grup 1 proteini, X-ray cross complementing group 1 protein

1. GİRİŞ

Over kanseri kadınlarda 6. en sık görülen kanser tipidir, her yıl yaklaşık çeyrek milyon kadına over kanseri teşhisi konulmaktadır ve 140000 kadın over kanseri nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Tüm bunların yanında over kanseri tarama testlerinin mevcut olmaması, hastalara metastatik aşamalarda teşhis konulabilmesi ve sıklıkla gelişen kemoterapi direnci nedeniyle over kanseri tüm jinekolojik kanserler arasında mortalite oranı en yüksek olanıdır.

Kanser, sıklıkla DNA hasar tamir mekanizmasındaki bozuklukların sonucu oluşmaktadır. Mutasyona uğramış Ataksi-telenjiyektazi (*Ataxia-telangiectasia Mutated*, ATM) ve Rad3 ile ilişkili ve ATM (*ATM and Rad3-related*, ATR) en kritik DNA hasarı kontrol ve tamir sistemlerinden birisini kontrol eder. ATM ağırlıklı olarak ikili DNA zincir kırıklarında aktive olurken, ATR daha geniş spektrumda DNA hasar mekanizmaları tarafından aktive edilir. ATR inhibitörleri DNA hasarını takiben tek zincir ve çift zincir kırıklarının birikmesine, hücre proliferasyonunda yavaşlamaya ve hücre ölümüne neden olabilir. Birçok ATR inhibitörü özellikle DNA hasarı yapan diğer kemoterapi ajanlarıyla kombine biçimde farklı kanser tiplerinde faz çalışmalarında denenmektedir. Golgi Kompleksi (GK), çok sayıda protein ve lipidin işlenmesinde, hücre içi molekül trafiğinde ve iyon kanallarının düzenlenmesinde rol oynayan bir organeldir. GK'nın fonksiyonel bozukluklarının hücre homeostazı, protein işlenmesi ve kanser oluşum sürecine etkisi daha yeni ortaya konulmaktadır.

Yeni jenerasyon selektif ATR inhibitörleri ile genotoksik kemoterapi veya hedeflenmiş terapi kombinasyonları farklı kanser tiplerinde faz I ve II çalışmalarında denenmektedir, benzer bir yaklaşımın over kanseri tedavisinde doğru kombinasyonlarla geliştirilebileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak hit seleksiyonu işleminden sonra elde edilen Golgi stres indükleyici Brefeldin A (BFA), AZD6738 ile kullanıldığında hücre ölümü indüklemeye potansiyeline sahip öncelikli molekül olarak tespit edilmiş olup, tez proje çalışmasında kullanılmasına karar verilmiştir.

Hücrelerde mitokondriyal hücre ölümü yolağı B hücreli lenfoma-2 (*B Cell Lymphoma-2*, BCL-2) protein ailesi tarafından kontrol edilir. Hücre ölümü sinyal iletisindeki bozulmalar kanser hücrelerinin kemoterapi, hipoksi ve onkojenik stress gibi pek çok hücre hasara ve strese cevaben sağkalımlarını destekler. Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (mitochondrial outer membrane permeability, MOMP), sitokrom c ve diğer proapoptotik

moleküllerin sitozole salınması, apoptozom kompleksinin oluşması ve kaspaz-3/-9 aktivasyonu ile meydana gelmektedir. BCL-2 protein ailesinin üyeleri protein-protein etkileşimleriyle MOMP' u kontrol etmektedirler.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Over Kanseri ve Over Kanserinin Epidemiyolojisi

Over kanseri çoğunlukla geç evrede tanısı koyulan bir kanser türüdür. Over kanseri ile yapılan çalışmada, veri analizleri sonucunda over kanserinin kadınlarda görülen kanserlerin %2.5'ini, kadınlarda kanser ile ilişkili ölümlerin ise %5'ini oluşturduğunu göstermiştir. Kadınlar için yaşam boyu over kanseri gelişim riski %1.3 (her 78 kadından birisi) olarak tespit edilirken, yüksek parite, oral doğum kontrol ilaçlarının kullanımı, tubal ligasyon ve ooforektomi azalmış over kanseri riski ile ilişkili olarak bulunmuştur. Ancak menopozal hormon replasman terapisi artmış over kanseri riski ile ilişkilidir (1).

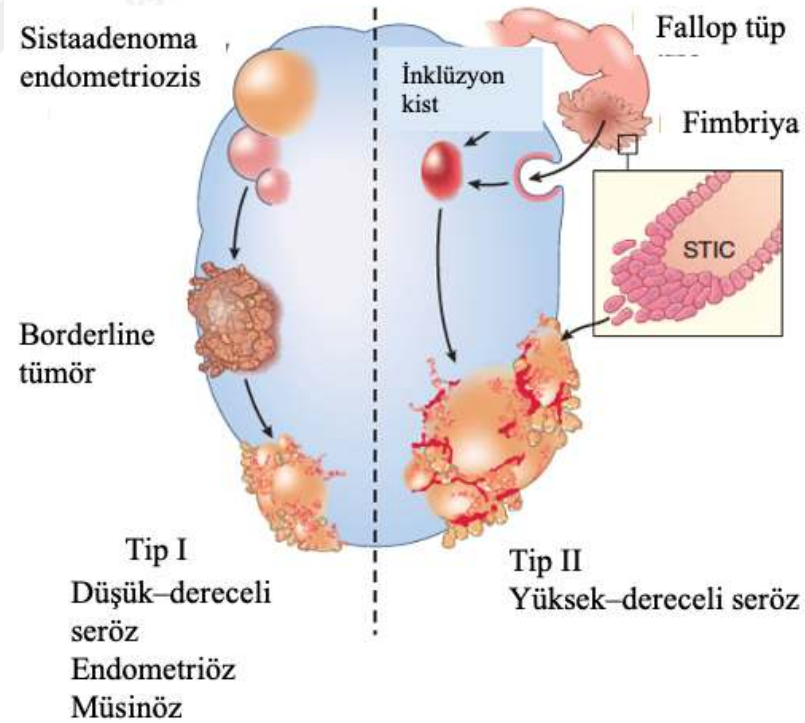
Seröz epitelyal over karsinomlarının büyük kısmı evre III ve evre IV'te teşhis alırken, bu gruptaki kanserler için 5-yıllık sağkalım süresi % 43'tür, ancak bu sağkalım süresi evre IV over kanseri hastalarında %29'a düşmektedir. Dünya genelinde ise senelik 239000 yeni over kanseri vakası beklenirken over kanseri ilişkili ölüm beklentisi senelik 152000 olarak belirlenmiştir (2). Yakın zamanda tamamlanan klinik çalışmasının analizinde evre III ve evre IV over kanserlerinde 5-yıllık sağkalım süresi %45 olarak bulunmuştur (3). İngiltere de yapılan bir çalışmanın verilerine göre ise over kanseri tanısı alma yaşı ortalama 67.8 (SD 7.2) iken 5-yıllık sağkalım süresi %33 olarak belirlenmiştir. En sık tanı alan histolojik alt grubun ise seröz karsinomlar (%46), sıklıkla da yüksek-derece (high-grade) seröz over kanserleri olduğu gösterilmiştir (4). Evre III ve evre IV seröz over karsinomları için 5-yıllık sağkalım süresi sırasıyla %26 ve %14 olarak tespit edilmiştir. 2023 kanser istatistik verilerine göre over kanseri ABD'de kadınlarda en sık görülen 13. Kanser türüyken kanser ile ilişkili ölümlerin en sık 5. nedeni olarak belirlenmiştir (senelik beklenen ölüm sayısı: 13270) (5).

2.2. Over Kanserinin Histopatolojisi

2.2.1. Over kanserlerinin sınıflandırması

Over kanseri çoğunlukla metastatik geç evrede tanı alan, genomik seviyede karmaşık bir kanser türüdür (6). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) 2020 sınıflandırılmasında histolojik, immünohistokimyasal ve moleküler analizlere göre over karsinomları beş kategoriye ayırmıştır; 1. Yüksek-dereceli seröz over karsinomları (High-grade serous ovarian cancer, HGSOC), 2. Endometrioid over karsinomları (Endometrioid over

carcinoma, EOVC), 3. Şeffaf Hücreli over karsinomları (Ovarian clear cell carcinoma, OCCC), 4. Düşük-dereceli seröz over karsinomları (Low-grade serous ovarian cancer, LGSOC), 5. Müsinöz over karsinomları (Mucinous ovarian carcinoma, MOC) (7). Seromüsinöz karsinom ise endometrioid karsinom kategorisi içinde bir alt tip olarak sınıflandırılır. Primer over neoplazmlarının çoğu müllerian epitel kökenlidir. Bu tümörlerin histolojik sınıflandırılması epitel dokunun farklılaşma derecesine ve proliferasyon seviyesine göre yapılır. Temel olarak neoplastik epitelin farklılaşmasına dayanan seröz, müsinöz ve endometrioid tümörler olarak üç ana histolojik tip vardır. Proliferasyon seviyesine göre ise iyi huylu (benign), sınırdan (borderline) ve kötü huylu (malign) tümörler olarak sınıflandırılırlar. Benign tümörler bileşenlerine dayalı olarak alt sınıflara ayrılır. Kistik alanlar içeren kistadenomlar, kistik ve fibröz alanlar içeren kistadenofibromlar ve ağırlıklı olarak fibröz alanlar içeren adenofibromlar bu sınıflandırmaya örnektir. Borderline ve malign tümörlerde de kistik yapılar görülebilir, bu tümörler kistadenokarsinom olarak adlandırılır.



Şekil 1. Over Kanseri Patolojik Sınıflandırması (8).

2.2.2. Over Kanserlerinin moleküler patolojik sınıflandırması

Klinik ve moleküler patoloji çalışmaları over karsinomlarının Tip I ve Tip II olarak sınıflandırılabilceğini göstermiştir (Şekil 1) (8, 9). Tip I karsinomlar düşük-dereceli tümörlerdir ve sıklıkla sınırdaki tümörler veya endometriozis ile ilişkili olarak ortaya çıkar. Bu tümörler düşük-dereceli seröz, endometrioid ve müsinöz tümörleri kapsamakta olup, Tip II tümörler çoğunlukla seröz intraepitelyal karsinom kaynaklı yüksek-dereceli seröz karsinomları kapsar. Seröz tümörler en sık görülen malign over tümörler ve tubal-benzeri epitelyal yapılarla karakterize olup, over kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur. Benign, borderline ve malign seröz tümörler tüm over tümörlerinin %30'unu, over epitelyal tümörlerin de yaklaşık %50'sini oluşturur. Seröz tümörlerin %70'i benign ve %30'u malign, benign ve borderline tümörler, 20-45 yaş arasında sıklıkla görülmekte olup, seröz karsinomlar daha ileri yaşlarda ortaya çıkar. Benign ve borderline over tümörlerinin risk faktörleri çok az bilinirken, seröz karsinomların risk faktörleri de tam anlaşılamamıştır. Seröz karsinomların risk faktörleri arasında nulliparite, aile öyküsü ve kalıtsal mutasyonlar yer alır. Düşük pariteli kadınlarda da seröz karsinomlar daha yüksek frekansta görülür. 40 yaş üzeri kadınlarda oral kontraseptif kullanımı veya tüp ligasyonu öyküsünün over kanseri gelişim riskini azalttığı bulunmuştur. Meme kanser 1/2 (*Breast Cancer* 1/2, BRCA1/2) genlerindeki kalıtsal mutasyonlar, over ve meme kanseri riskini artırır. BRCA1 mutasyonları 70 yaş altındaki over kanseri hastalarının %5'inde bulunur. Germline BRCA1/2 mutasyonları tüm over kanseri hastalarının %17'sinde tespit edilmiştir, bu grup hastalarda da en sık görülen histolojik alt tip yüksek-derece seröz over kanserleridir (10, 11). Bu alt tipler arasında intratümoral ve intertümoral tümör heterojenitesi çok yüksek seviyede olup, tedavideki başarısızlığın ana nedenini oluşturur, bu heterojenite morfolojik ve moleküler düzeyde tanımlanır (12, 13).

Seröz over karsinomları; 1. düşük-dereceli over karsinomu ve 2. yüksek-dereceli over karsinomu olarak iki ana gruba ayrılır (13). Bu ayrım nükleer atipi derecesine göre yapılır ve hasta sağkalımı ile korelasyon gösterir. Düşük dereceli karsinomları seröz borderline tümörlerle ilişkili olarak ortaya çıkarken, yüksek-dereceli over karsinomları fallop tüpü fimbriasındaki *in situ* lezyonlardan veya overdeki seröz inklüzyon kistlerinden köken alabilir. Yüksek-dereceli over karsinomlarının fallop tüpü kökenine dair ilk bulgular BRCA1/2 germline mutasyonlarına sahip kadınların profilaktik salpingo-ooferektomi sonrasında patolojik incelemeye tutulan fallop tüplerinde sıklıkla atipi bulgular saptanmıştır (14). Bu lezyonlar seröz tubal intraepitelyal

karsinom (*Seröz Tubal Intraepitelyal Carsinom*, STIC) olarak adlandırılmakta olup, sporadik yüksek-derece over karsinomları ile ilişkili bulunmuştur (15, 16). Dolayısı ile yüksek-dereceli over kanserlerinin en azından bir kısmının fallop tüplerinden kaynaklandığı düşünülür. Fallop tüplerinden kaynaklanmayan yüksek-dereceli over kanserlerinin kökeninin ise kortikal over inklüzyon kistleri olduğu varsayılır. Bu kistler yüzey epitelinin kendi üzerine kıvrılması sonrasında gerçekleşen seröz metaplazi neticesinde ortaya çıkar. Bir başka önerme de bu kistlerin ovulasyon sırasında kopan fallop tüpü epitelyumundan köken aldığı düşünülür (16, 17). Hala yüksek-dereceli over kanserlerinin ne kadarının fallop tüpü ne kadarının kortikal over inklüzyon kistlerinden kaynaklandığı bilinmemektedir.

Histolojik kökenlerinden bağımsız olarak düşük-dereceli over karsinomları ve yüksek-dereceli over karsinomları oldukça farklı mutasyon yükleri ile karakterizedir. Düşük-dereceli over karsinomlarında sıklıkla kirsten fare sarkoma virüs (*kirsten rat sarcoma virus*, KRAS), v-Raf mürin sarkoma viral onkogen homolog B (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*, BRAF) veya eritoblastik onkogen B (*erythroblastic oncogene B*, ERBB2b) onkojenlerinde mutasyonlar tespit edilirken, tümör protein p53 (*Tumor Protein p53*, TP53) yabancı tipte yer alır (18, 19). Yüksek-dereceli over kanserlerinde ise TP53 tümör baskılayıcı geninde sıklıkla mutasyonu varken, KRAS veya BRAF mutasyonları çok nadir bulunur. Fosfotidil 3-kinaz, katalitik 110-KD alfa (*Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic 110-KD alpha*, PIK3CA) gibi onkojenlerin amplifikasyonları ya da Retinoblastom (Rb) gibi tümör baskılayıcıların delesyonları da yüksek-dereceli over kanserlerinde sıklıkla tespit edilir (20). BRCA1/2 mutasyonlarına bağlı olarak gelişen hemen tüm yüksek-dereceli over kanserlerinde TP53 mutasyonu varken, sporadik yüksek-dereceli over karsinomlarında BRCA1 veya BRCA2 mutasyonları oldukça nadirdir.

Seröz tümörler papiller epitelyumun fibröz kist yapıları içinde bulunduğu veya over yüzeyinden çıkıntı yapan bir kitle olarak ortaya çıkabilir. Benign tümörler epitelyal kalınlaşmanın görülmediği, pürüzsüz ve parlak bir kist duvarına sahipken borderline tümörlerde papiller çıkıntıların sayısı artmıştır (19-22). Malign tümörlerde papiller yapıların sayısı ve kapladığı alan artarken kapsülün nodüleritesinde de artış gözlenmiştir. Bilateral tümörler benign seröz kistadenomlarının %20'sinde, seröz borderline tümörlerin %30'unda ve seröz karsinomların %66'sında görülmüştür (23, 24). Borderline ve malign seröz tümörlerin önemli bir kısmında over yüzeyi de etkilenmiştir. Benign tümörlerde kolumnar epitelyal hücreler silia

yapılarını korurken kimi alanlarda mikroskopik papiller yapılar bulunabilir. Borderline seröz tümörlerde ise çok katmanlı stromal papiller yapılar, tabakalanmış epitelyum ve hafif nükleer atipi görülebilmekte, ancak stromal invazyon mevcut olmamaktadır (25). Yüksek-dereceli seröz over karsinomlarında stromal invazyon yaygın olarak görülür, tümör hücrelerinde belirgin atipi, pleomorfizm ve atipik mitoz bulguları mevcuttur ve kimi zaman seröz epitelyal yapılar tamamen kaybolur. STIC, yüksek-dereceli seröz over karsinomları ile benzer özelliklere sahiptir, ancak stroma invazyonu yoktur. Düşük-dereceli ve yüksek-dereceli over karsinomları peritonyal yüzeylere ve omentum'a yayılma eğiliminde, sıklıkla karın içi serbest sıvı (ascites) ile ilişkilidirler (9, 12). Seröz tümörlerin bu açıdan biyolojik davranışları farklılaşma derecesine ve peritonyal hastalığın aşamasına bağlıdır. Örneğin over yüzeyinde bulunan tümörler veya fallop tüpü kaynaklı tümörler dökülme yolu ile direkt olarak peritona yayılabilir. Hasta prognozu histolojik sınıflandırma ve peritonyal hastalığın varlığı ile kuvvetli biçimde ilişkilidir. Düşük-dereceli over karsinomları over dışına yayılsalar bile yavaş progresyon gösterirler hastalar daha uzun sağkalım süresi sahiptirler Ancak yüksek-dereceli over kanserlerinde tanı sırasında genellikle karın içi yayılım mevcut olup, agresif tümör davranışı ile beraber hastaların prognozu daha kötüdür (3, 4). Dolayısı ile tümörlerin derecesi peritonyumun etkilenmesinden bağımsız olarak tedavi seçimini ve prognozu etkiler.

Müsinöz tümörler tüm over tümörlerinin %20'sini oluşturur. Genelde orta yaşlarda görülen müsinöz tümörler ergenlik öncesi ve menapoz sonrası oldukça nadirdir (3, 4, 21). Müsinöz tümörlerin çoğunluğu benign veya borderline tümörlerdir. Primer over müsinöz karsinomları sıklıkla görülmemekte, tüm over kanserlerinin sadece %3'ünü oluştururlar (26). KRAS mutasyonları müsinöz over tümörlerinin öncelikli genetik bulgusudur İyi huylu müsinöz kistadenomalarının %58'inde, müsinöz sınırdaki tümörlerinin %75-86'sında ve müsinöz over karsinomlarının %85'inde KRAS mutasyonu tespit edilmiştir (27). Tümör evrimi çalışmalarında benign, borderline ve karsinom doku örneklerinde aynı KRAS mutasyonları bulunmuştur, bu da KRAS mutasyonlarının bu lezyonların patojenezinin ilk aşamalarında rol oynadığına işaret etmektedir (28, 29). Müsinöz tümörlerde over yüzeyi nadiren etkilenir, primer müsinöz kistadenokarsinomları ve müsinöz karsinomların %5'i bilateraldir. Müsinöz tümörler oldukça büyük kistik kitleler oluşturabilirler, bu kitleler glikoproteinden zengin jelatinöz bir sıvı içeren çok loküllü tümörler olarak karakterize edilmiştir. Benign müsinöz over tümörleri apikal müsin içeren siliasız kolumnar epitel hücreleri içerirler. Önemli bir kısmında gastrik veya

intestinal farklılaşma görülür. Borderline müsinöz over tümörleri epitelyal tabakalaşma ve glandular papiller çıkıntılarla bağırsak tübüler adenomlarına veya villöz adenomlarına benzerler (30). Müsinöz karsinomlar ise birbirine bitişik büyüme ile bir tür yayılmacı invazyon karakteri gösterirler, over dışına yayılımları kötü prognozla ilişkilidir ve ancak bu tümörler daha önce de bahsedildiği üzere yaygın biçimde görülmezler (30, 31). Primer müsinöz over tümörlerinin büyük kısmı unilateraldir, bilateral müsinöz tümörler tespit edildiğinde metastatik müsinöz tümörlerden ayırıcı tanının yapılması şarttır. Endometrioid over karsinomları tüm over kanserlerinin yaklaşık %10-15' ini oluşturur. Endometrioid adenofibroma, benign endometrioid tümörleri ve borderline endometrioid tümörleri nadiren görülür. Endometrioid over kanserlerinin yaklaşık 1/3'ünde eşzamanlı endometrium karsinomları mevcuttur, moleküler ve histopatolojik çalışmalar bu vakaların çoğunda endometrioid over karsinomlarının primer endometrial karsinomun metastazı ilişkili olduğunu göstermiştir (32, 33). Vakaların yaklaşık %20'sinde ise endometrioid karsinomlar endometriosis ile beraber görülür.

Moleküler genetik çalışmaları, endometrioid over karsinomları ve endometrium kanserleri arasında çok sayıda ortak mekanizma belirlemiştir. Fosfat ve tensin homolog (*Phosphatase and tensin homolog*, PTEN) delesyonuna, PIK3CA mutasyonu veya amplifikasyonuna bağlı olarak yüksek seviyede aktive Fosfoinozotid 3-kinazlar/ protein kinaz B (*Phosphoinositide 3-kinases/ protein kinase B*, PI3K/Akt) sinyal ileti yolağı bu mekanizmalardan birisidir (33).

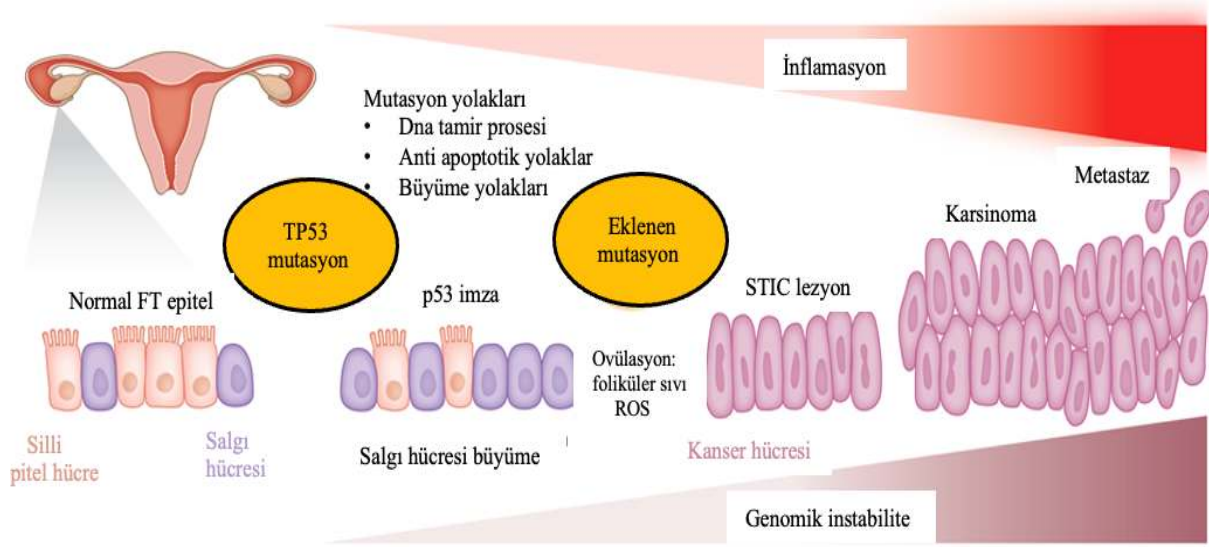
Benign ve borderline berrak hücreli tümörler oldukça nadir görülürler, berrak hücreli karsinomlar da sıklıkla görülen bir tümör tipi değildir (34). Berrak hücreli karsinomlar berrak sitoplazmaya sahip büyük epitel hücreleri ile karakterizedirler. Bu tümörler kimi zaman endometriosis veya endometrioid over karsinomları ile beraber görüldükleri, endometriyumun berrak hücreli karsinomlarına benzedikleri için endometriod adenokarsinomların bir varyantı olarak kabul edilirler (35). Bu saptamayı destekleyecek biçimde PIK3CA, AT açısından zengin etkileşimli alan içeren protein 1A (*AT-rich interactive domain-containing protein 1A*, ARID1A), KRAS, PTEN veya TP53 mutasyonları berrak hücreli over karsinomlarında da bulunur (36). Solid yapıya sahip berrak hücreli over karsinomlarında berrak hücreler tübüller şeklinde organize olarak, kistik tümörlerde neoplastik hücreler kistik boşlukları çevreler.

Brenner tümörleri üroepitelyumu andıran neoplastik epitel hücreleri içermekte ve çoğunlukla benign tümörlerdir (37-40). Epitelyal over tümörlerinin yaklaşık %10'unu oluştururlar. Brenner tümörleri solid veya kistik yapıya sahip olabilmekte, genellikle

unilateraldir. Histolojik olarak normal over stromasına benzeyen fibroz stroma ve bu fibroz stroma içerisinde belirgin sınırlara sahip epitel hücre kümeleriyle karakterizedir, bu epitel hücre kümeleri üriner sistemin epitelyumuna benzerlik gösterirler. Brenner tümörleri genellikle tesadüfen belirlenirler, malign Brenner tümörleri yaygın görülmezler, çoğu zaman evre 1’de tanı alırlar ve prognostik olarak düşük-dereceli karsinomlarla benzerlik gösterirler (38, 39). Oldukça nadir rastlanan geçişken (transisyonel) over karsinomları ise daha geç evrelerde tanı alırlar ve yüksek-dereceli seröz over kanserleri gibi tedavi edilirler (41).

Önemli bir durum da yukarıda bahsedilen over kanseri tiplerinin büyük çoğunluğunda kanser hücrelerinin normal over hücrelerine fenotipik olarak benzerlik göstermemesidir. Yüksek-dereceli over kanserleri ile seröz tubal intraepitelyal karsinom arasındaki mekanistik ilişki de göz önüne alındığında primer over kanserlerinin tanımlanmasında anatomik, histopatolojik, immünolojik ve genetik parametrelerin dikkatlice değerlendirilmesi gerekmektedir. Şu an için veriler primer over kanseri sınıflandırmasına germ hücre tümörleri, gonadal stromal tümörleri ve küçük hücreli hiperkalsemik tip over kanseri dahil edebilir (16). Fallop tüpü epitel, temel olarak sekretuar ve siliar hücrelerden oluşmakta, endometriyal epitelinin menstrual siklusa hipotalamus-hipofiz-over aksı tarafından düzenlenmesine benzer biçimde fallop tüpü epitel de östrojen/progesteron-bağımlı bir döngü tarafından kontrol edilir (42). Daha önce kesintisiz biçimde devam eden ovulasyona bağlı olarak over yüzeyinde meydana gelen yırtılma ve tamir süreçleri over yüzey epitel hücrelerinde metaplaziye neden olduğu ve yüksek-dereceli over kanserlerinin bu metaplazi sürecinde ortaya çıkan mutasyonlarla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (43). Ancak BRCA1/2 germline mutasyonları taşıyan kadınlarda gerçekleştirilen risk azaltıcı salpingo-ooforektomi ameliyatlarında tubal dokularda STIC lezyonlarına rastlanması fallop tüplerinin, özellikle de fimbria’nın yüksek-dereceli over kanserlerinin orijin lokasyonu olduğunu belirlemiştir (44-46). Bunlara ek olarak yakın zamanda yapılan çalışmalar genetik risk taşımayan hastalarda teşhis koyulan sporadik yüksek-dereceli over kanseri vakalarında da fimbria’nın kanser hücrelerinin köken aldığı anatomik bölge olduğunu ortaya koymuştur (47, 48). Yüksek-dereceli over kanseri hücrelerinin ve fallop tüpü epitel hücreleri benzer morfolojilere, gen ekspresyon profillerine ve immünotiplere sahiptir (16, 49). Fallop tüpü epitelinin ektopik olarak fallop tüpü dışında bir lokalizasyonda bulunması endosalpingiozis olarak adlandırılır. Endosalpingiozis overde tubal kortikal inklüzyon kistleri olarak görülür ve bu inklüzyon kistleri fallop tüpü-kaynaklı olmayan yüksek-dereceli over

kanserlerinin olası kökeni olarak düşünülmektedir. Endometriozis neoplastik olmayan bir yapı olarak bilinse de berrak hücreli ve endometrioid over karsinomlarının gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu net biçimde gösterilmiştir (50-52). Ancak halen over endometrisozisin over kanserine dönüşüm sürecinin moleküler ve hücresel mekanizmaları belirlenememiştir, dolayısı ile çoğunlukla over dışında bulunan endometriozis yapılarında kanser gelişimi olmazken neden over endometrisozis yapılarında kanser gelişiminin daha sıklıkla görüldüğü bilinmemektedir (Şekil 2) (53).



Şekil 2. Fallop tüpünün epitelinden HGSOc başlatma modeli (53).

2.2.3. Epitelyal over kanserlerinin klinik seyri ve tedavi yaklaşımları

Tüm over karsinomları alt batın ağrısı ve abdominal distansiyon gibi benzer klinik bulgular verirler. Gastrointestinal şikayetler, artmış idrar yapma sıklığı, disüri ve pelvik bölgede baskı hissi diğer semptomlarıdır.

Bening lezyonlar kolayca cerrahi olarak çıkarılabilirler ve tedavi edilebilirler. Malign tümörler ilerleyici güçsüzlük, kilo kaybı ve kaşeksiye neden olurlar. Karsinomlar tümör kapsülün dışına çıktıklarında ve periton boşluğuna döküldüklerinde karın boşluğunda sıvı birikimine (ascites) yol açarlar. Ascites sıvısı çoğu zaman dökülen tümör hücreleri içerir, periton yayılım paterni oldukça spesifiktir, 0.1-0.5 cm büyüklüğünde yüzeye yayılım gösteren nodüller bulunur. Bölgesel lenf bezlerin de genellikle tutulur, karaciğer, akciğerler ve gastrointestinal

sistemde metastaz çoğunlukla mevcuttur. Unilateral over karsinomlarında diğer taraftaki overe metastaz neredeyse vakaların yarısında cerrahi sırasında tespit edilir, bu kötü prognozla ilişkilidir. Over karsinomları kadınların önemli bir kısmında ileri evrelerde teşhis edilir, bu nedenle 5-yıllık sağkalım süreleri bu hastalarda oldukça kısadır. Tümör antijenlerini tespit etmeyi hedefleyen birçok immünolojik ve biyokimyasal test over kanserinin erken evrede teşhisi için geliştirilse de halen yeterli duyarlılık ve spesifikliğe sahip bir tanı testi mevcut değildir. Kanser antijen 125 (*Cancer Antigen 125*, CA-125) hastalık reküransı ve progresyonunu takip etmek için kullanılır. Koruyucu ve önleyici tarama stratejileri özellikle BRCA1/2 mutasyonu taşıyan veya kuvvetli aile öyküsü olan kadınları tespit etmeyi amaçlar, risk önleyici salpingo-ooforektomi standart cerrahi yöntem olarak kullanılmaktadır.

2.3. Over Kanserlerinin Moleküler Genetik Mekanizması

Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas, TCGA) kanser fenotiplerini genotipleri ile ilişkilendirerek kanser biyolojisinin gelişimine katkıda bulunmuştur. Kanser türlerinin genotipik ve fenotipik özellikleri her ne kadar birbirinden ayrılıyor olsada, aslında temel özellikleri aynıdır. Hannahan ve Weinberg kanserin bilinen ilk temel özellikleri olarak genomik kararsızlık ve biriken mutasyonlar, enerji metabolizmasını yeniden programlama, kanserleşmeyi destekleyen inflamasyon ve bağışıklık sisteminden kaçma olarak tanımlamışlardır (54). Sonraki çalışmalarında kanser hücrelerinin yeni nesil özellikleri arasında; sınırsız çoğalma potansiyelini açığa çıkarma, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçma, büyüme sinyallerinde kendi kendine yetme, yeni damar oluşumu tetikleme, doku invazyonu ve metastazı aktiveleştirme ve hücre ölümüne karşı direnç geliştirme olarak eklemişlerdir (55). Hannahan son çalışmasında ise kanser biyolojisinde yeni temel özellikler olarak mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, fenotipik platisitenin kilidini açma, polimorfik mikrobiyomlar ve yaşlanmış hücreleri de kanserin özelliklerine dahil etmiştir (56).

Sonuç olarak kanser hücreleri bu özelliklerin tamamını oluşturuyor olsa da, en temel özellik olarak kontrolsüz hücre bölünmesi olarak tanımlanmakta ve hücre bütünlüğünün bozulması sonucu oluşmaktadır. Bu nedenle genomik instabilite, bir hücrenin kanserleşme sürecindeki en kritik basamağı oluşturur. Bir hücrenin genetik materyali olan DNA'nın nesilden nesile düzgün bir şekilde aktarılması korunması genomik stabilite için gereklidir. Genomik

stabilitenin korunması; hücre bölünmesinin stabil olması ve hücre herhangi bir hasara maruz kaldığında DNA tamir mekanizmaları ve hücresel yolların aktivasyonu ile gerçekleşir.

2.3.1. Over kanserinde hücre siklusu

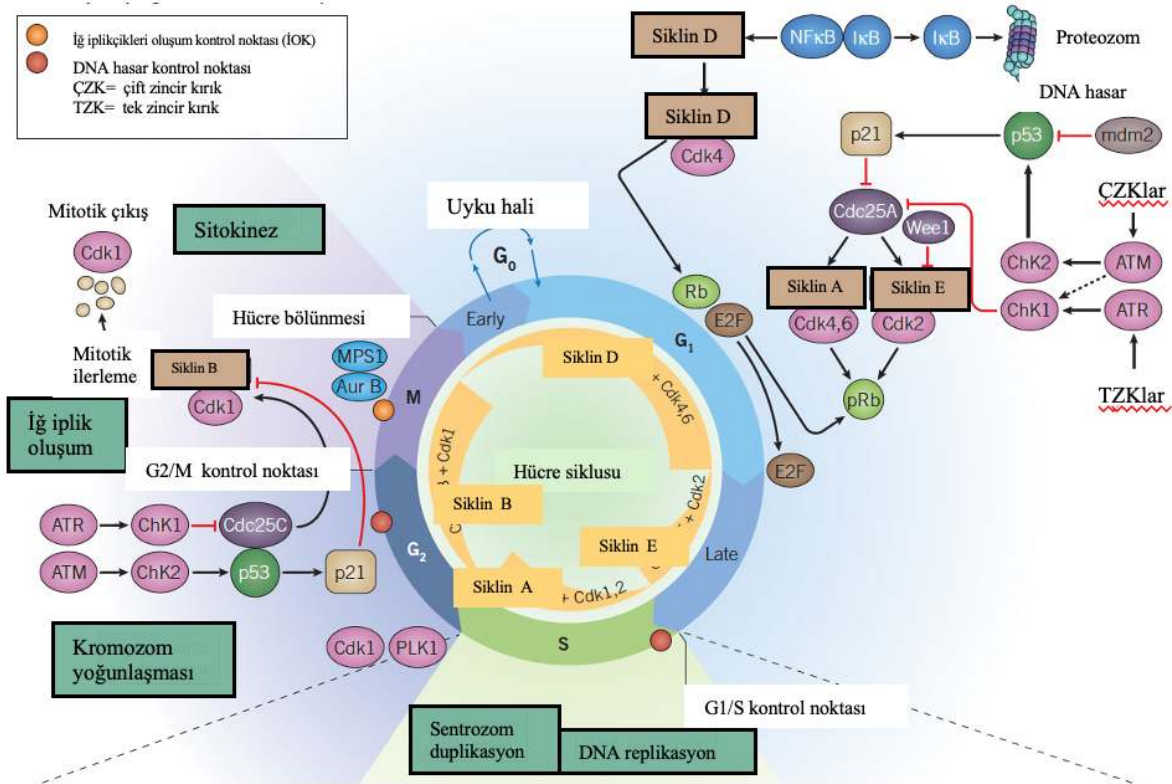
Bir hücrede hücre siklusu; interfaz (G0, G1, S, G2) ve mitoz (M) fazlarından oluşur. Her bir faz siklin-bağımlı kinazlar (*Cyclin-dependent kinases*, CDK) tarafından düzenlenmektedir. Siklin-bağımlı kinazların aktiviteleri öncelikli olarak partner siklinlerin seviyeleri ile kontrol edilmekte olsa da, protein-protein ilişkileri ve fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar, bu düzenlenme mekanizmalarına katkı sağlar (57).

Birçok insan dokusunda hücreler Gap faz 0 (Gap phase 0, G0) fazında, geçici ya da kalıcı olarak durağan durumundadır. Mitojenik faktörler, örneğin büyüme faktörleri sinyal iletileri ile bu hücreler uyku durumundan çıkabilir ve CDK4/6 aktivasyonu ile hücreler Gap faz 1 (Gap phase 1, G1) fazına girerek, hücre döngüsünü başlatır. CDK4/6, siklin D1-D3 tarafından pozitif olarak düzenlenirken, INK4 protein ailesi üyeleri (p15, p16, p18 ve p19) tarafından baskılanır. CDK4/6 ikinci ve daha önemli fonksiyonunu ise Rb üzerinden gerçekleştirir. Rb, Transkripsiyon faktörü 2 (*Transcription Factor 2*, E2F)'e bağlanarak E2F'in transkripsiyonel aktivitesini engeller. Aktive olan CDK4/6, Rb proteinini fosforile eder, E2F transkripsiyon faktöründen ayrılmasını, E2F'in G1'den Sentez (S, Synthesis) fazına geçişi ve S fazının gerçekleşmesi için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu aktive etmesini sağlar (57).

Bir önemli nokta da bu süreçlerin sonucunda aktive olan siklin E/CDK2'nin de Rb'yi fosforile edebilmesidir, siklin E/CDK2 kendi aktivasyonunu daha da artırır. Bu bir pozitif geribildirim (feedback) mekanizması sağlar. S fazının bitmesiyle, CDK1 siklin A2 ve siklin B'ye bağlanmaya başlar, CDK1'i aktif hale getirir. Gap faz 2 (Gap phase 2, G2) fazına geçişle birlikte siklin A2 yıkılarak, CDK1 sadece siklin B ile bağlı halde aktivitesine devam eder (57). Hücre siklusu, mitoz (M, Mitosis) fazına geçerek tamamlanmaktadır (Şekil 3).

Hücreler özellikle DNA hasarına cevaben, hücre döngüsünü durdurur, hasarlı DNA'nın tamirini sağlayacak kontrol noktaları aktivasyonu ile her bir hücre döngüsü basamağında farklı CDK'ların aktivitesi engellerler. G1/S geçiş kontrol noktasında ATM ve ATR tarafından aktive edilen Kontrol noktası kinaz 1 (*Checkpoint kinase 1*, Chk1) özellikle Cdc25A fosfatazı fosforile ederek, inaktif hale getirir ve böylece hem CDK4/6 hem de CDK2 aktivasyonunu bloke etmeye çalışır. Kontrol noktası kinaz 2 (*Checkpoint kinase 2*, Chk2) kontrol yolağı ise p53'ü aktive

eder, p21^{CIP} ve p27^{KIP} seviyelerini artırır ve hücreler DNA hasarını tamir etmek için G1 fazında hücre döngüsünü durdurur. Özellikle kanser hücrelerinde p53 inaktive edici mutasyonları sıklıkla görülmektedir. CHK2 yolağı daha çok p53 yolağı üzerinden çalıştığı için, kanser hücrelerinde G1-G1/S kontrol noktası arızalıdır, bu da kanser hücrelerinde hücre döngüsü kontrolünün neredeyse tamamen CDK1'e bağımlı, CHK1 tarafından düzenlenen G2 kontrol noktasında gerçekleşmesini sağlar.



Şekil 3. Hücre Siklusu ve DNA Tamiri (Cancer Research Product Guide Edition 3, 2015, Tocris'den alınmıştır).

2.3.2. Over kanserinde DNA hasar ve tamir mekanizmaları

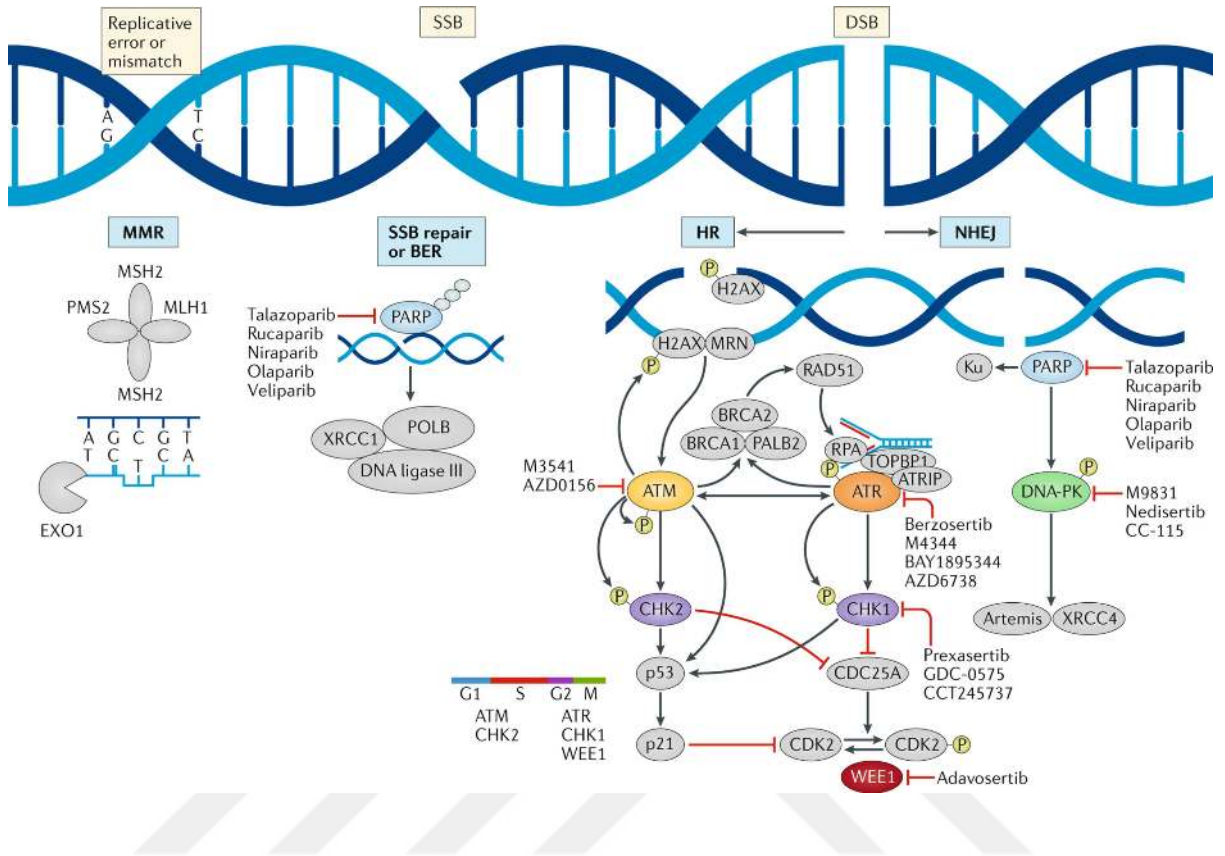
İnsan hücreleri DNA'ya zarar veren endojen veya ekzojen ajanlara maruz kaldığında, DNA hasar tespiti ve onarımı için bir dizi sinyal yolağını aktive ederek genomik stabiliteyi korumaya çalışır (58, 59). Bu mekanizmaların tamamı DNA hasar cevabı (DNA damage response; DDR) olarak adlandırılır. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species; ROS), lipid peroksidasyon yan ürünleri,

alkilleyici ajanlar ve reaktif karbonil türleri DNA hasarına neden olan endojen ajanların önemli kısmını oluştururlar. DNA' nın spontan hidrolizi sonucu apuritik/apirimiditik abazik bölgeler meydana gelir. Ekzojen DNA hasarının kaynakları arasında ultraviyole (UV) ışık, iyonlaştırıcı radyasyon (IR), kemoterapi ajanları ve çevresel kanserojenlere maruz kalma yer almaktadır. DNA hasar cevabını kontrol eden proteinler, genomik stabiliteyi korumak için farklı moleküler fonksiyonları gerçekleştirirler. UV maruziyetine bağlı olarak oluşan siklobutan primidin dimerleri ışık tarafından fotoliz proteinleri aracılığıyla tamir edilirler (60, 61). Alkile edici ajanlar veya oksidanlar tarafından indüklenen metilasyon gibi baz modifikasyonları yerine aktivite gösteren enzim grupları tarafından ortadan kaldırılırlar. Örneğin O⁶-metilguanin lezyonları O⁶-metilguanin DNA metil transferaz (*O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase*, MGMT) tarafından ortadan kaldırılırlar (62).

DNA' daki baz modifikasyonlarının tamirinde görev alan bir başka mekanizma da baz eksizyon onarımı (base excision repair, BER)'dir (63, 64). BER sürecinde DNA glikosilazlar 8-oxoG gibi hasarlı bazları tanıdıktan sonra bazları yerlerinden çıkarırlar, geriye apuritik veya apirimiditik bölgeler bırakırlar. Bu sürecin devamında çoğunlukla tek nükleotid replasmanını içeren bir mekanizma ile abazik bölge tamir edilir. Bu moleküler yolakta tek-zincir kırık tamirinde de görev yapan X-ışını çapraz tamamlayıcı grup 1 proteini (*X-ray cross complementing group 1 protein*, XRCC1) ve Poli (ADP-riboz) polimeraz (*Poly (ADP-ribose) polymerase*, PARP1) gibi proteinler fonksiyon gösterir. DNA heliks yapısını bozan daha büyük hasarlarda ise nükleotid eksizyon onarımı (nucleotide excision repair, NER) tamir görevinden sorumludur (65-67). Kısaca NER sensör yapıları (XPC-RAD23B-CETN2 protein kompleksi) heliks yapısını bozan lezyonları tarayarak belirler ve transkripsiyonla-eşlenik biçimde çalışan transkripsiyonla birleştirilmiş nükleotid eksizyon onarımı (transcription-coupled nucleotide excision repair, TC-NER) transkripsiyonu bloke eden lezyonu ortadan kaldırır (68). Yanlış eşleşme onarımı (mismatch repair, MMR) öncelikli olarak insersiyon ve delesyonlarla ilişkili olarak tek nükleotid uyumsuzluklarının düzeltilmesinden sorumludur. MMR moleküler mekanizması, MutS homolog 2 (MSH2)'nin, MutS homolog 3 (MSH3) veya MutS homolog 6 (MSH6) ile heterodimerizasyonu sonrasında MLH1-PMS2 ve EXO1 kompleksi hasarlı nükleotidi ortadan kaldırır (69).

Çift-zincir DNA kırıkları (double strand break, DSB) bir hücre için en tehlikeli DNA hasarı türüdür. Bu lezyonların tamiri için temel olarak dört mekanizma görev yapar: Homolog

rekombinasyon (homologous recombination, HR) homolog olmayan uç birleştirme (nonhomologous end joining, NHEJ), tek sarmal uzatma (single strand annealing, SSA) ve Polθ- aracılı uç birleştirme (Polθ-mediated end joining, TMEJ) (70-76). HR yüksek derecede aslına uygunlukla ile çalışan bir tamir mekanizması olmasına karşın sadece hücre siklusunun G2 ve M fazlarında fonksiyon gösterebilir. NHEJ mekanizmasının sensörleri olarak görev yapan KU70/KU80 heterodimerleri relatif olarak çok daha yüksek seviyede ifadenime gösterdikleri için HR sensör protein kompleksi olan MRN kompleksi (MRE11/RAD50/NBS1)'nin çift-zincir kırıklarının tanınması ve tamirinde NHEJ ile yarışmacı biçimde fonksiyon göstermesi gerekir. Zincir kesim mekanizması kırık bölgesinin iki yönlü olarak gerçekleştirilir, böylece oldukça uzun biçimde oluşturulan tek-zincirli DNA uzantıları (single strand DNA, ssDNA) NHEJ'in fonksiyonel olmasını engeller. TMEJ zincir kesimi sonrasında 5 baz çiftinden daha az mikrohomojoloji bölgelerini tanıyıp, HR' un yetersiz olduğu durumlarda tamiri tamamlayabilir, ancak bu tamir hataya daha meyillidir. G1 fazında çift zincir kırıkları (double strand break, DSB) KU70/KU80 heterodimerleri tarafından tanınarak, DNA'ya bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*, DNA-PKcs) kırık bölgesine çekilerek XRCC4 benzeri faktör (*XRCC4-like factor*, XLF), Artemis ve X-ışını çapraz tamamlayıcı grup 1 proteini (*X-ray cross complementing group 1 protein*, XRCC4) proteinleri ile birlikte aktif DNA protein kinaz (DNA protein kinase, DNA-PK) komplekslerini oluştururlar. DNA replikasyonunu takiben DSB' lerin tamiri için ise 3'-5' ekzonükleaz MRN kompleksi ve 5'-3' ekzonükleaz Bloom sendrom protein/DNA2 (*Bloom syndrome protein/ DNA2*, BLM/DNA2) kompleksi uç bölgelerin rezeksiyonunu sağlar, uzun tek-zincir DNA yapısını ortaya çıkar. MRN kompleksi eşzamanlı olarak ATM'yi de aktive eder, aktive ATM, DNA Hasar Kontrol Noktası 1 Aracısı (*Mediator of DNA Damage Checkpoint 1*, MDC1) ve γ H2AX'i fosforilasyonu ile tamir mekanizmasını hızlandırır (68). Oluşan tek-zincirli DNA bölgeleri, Replikasyon protein A (*Replication Protein A*, RPA) tarafından kaplanarak, RPA ATR- ATR Etkileşim proteini (*ATR Interaction Protein*, ATRIP) kompleksi ile protein-protein ilişkisi vasıtasıyla ATR'nin aktivasyonunu tetikler (Şekil 4) (77).



Şekil 4. DNA Tamir Mekanizması (77).

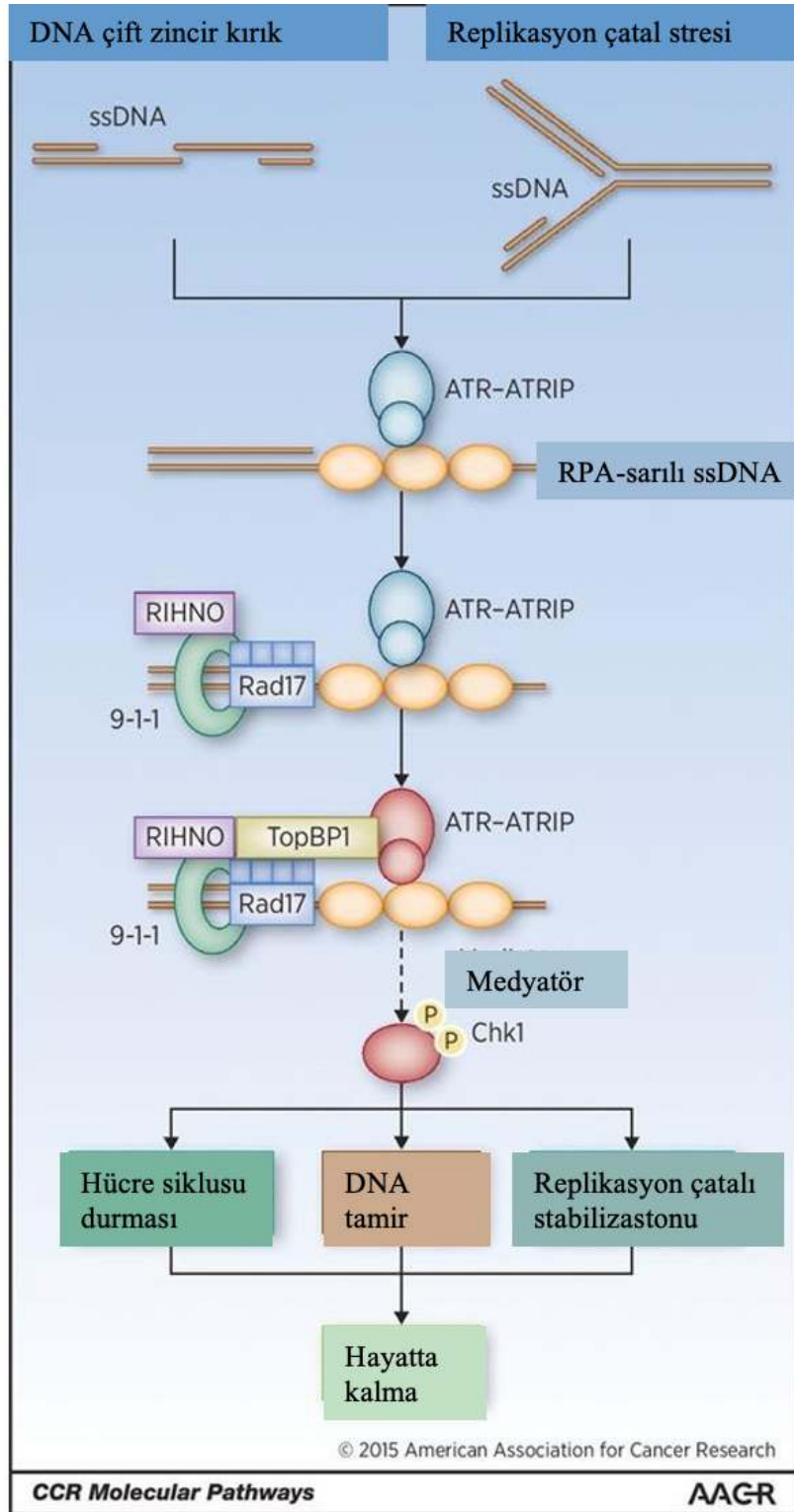
Diğer memeli hücrelerinde olduğu gibi over epitel hücrelerinde ve over kanseri hücrelerinde de tek-zincir/iplik DNA (ssDNA) ve çift-zincir/iplik birleşme noktalarının en sık görüldüğü alanlar duraklatılmış replikasyon çatallarıdır. Bu birleşme noktalarına çift zincir DNA kırıklarının kesilme yoluyla tamiri neticesinde ortaya çıkan ssDNA kuyruklarında da rastlanır. Duraklatılmış replikasyon çatallarının yüksek sayıda bulunması nükleotid havuzunda azalma ve DNA zincirler-arası çapraz bağların oluşmasıyla beraber replikasyon stresi ile karakterize olur (78). ATR-bağımlı DNA hasar cevabı öncelikli olarak bu koşullar altında aktive olduğundan replikasyon stres cevabı olarak adlandırılır.

2.3.3. ATR sinyal ileti yolları

İnsan hücrelerinde genetik bilginin doğru biçimde bir sonraki nesle aktarılması için genomik stabilitenin korunması gereklidir. ATM ve ATR kinazları insan hücrelerinde DNA hasar cevabının en önemli düzenleyicileridirler. DNA-PKcs, memelilerde rapamisin hedefi (*the mammalian target of rapamycin*, mTOR), serin/treonin-protein kinaz 1 (*serine/threonine-*

protein kinase 1, SMG1) ve Fosfoinozidit 3-kinazlar (*Phosphoinositide 3-kinases*, PI3K) gibi Fosfatidilinositol 3-kinazla ilişkili kinazlar (*Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*, PIKK) kinaz ailesinin birer üyesi olan ATR ve ATM ortaklaşan fonksiyonları birlikte özelleşmiş fonksiyonları da gerçekleştirirler. ATM ve ATR lipid kinaz aktivitesi göstermezler, serin-treonin kinazlar olarak fonksiyon gösterirler. PIKK kinazlarının yapısal organizasyonuna evrimsel olarak korunmuş, FKBP12 rapamisinle ilişkili protein-ATM- Transformasyon/transkripsiyon alanıyla ilişkili protein (*FKBP12 rapamycin-associated protein-ATM-Transformation/transcription domain-associated protein*, FRAP-ATM-TRRAP) (FAT), PIKK-düzenleyici domain (*PIKK-regulation domain*, PRD) ve FAT karboksi-terminal (*FAT carboxi terminal*, FATC) domainleri ATR ve ATM aktivasyonu için gerekli olup, bu domain'lerdeki mutasyonlar her ikisinin de kinaz aktivitelerini etkiler.

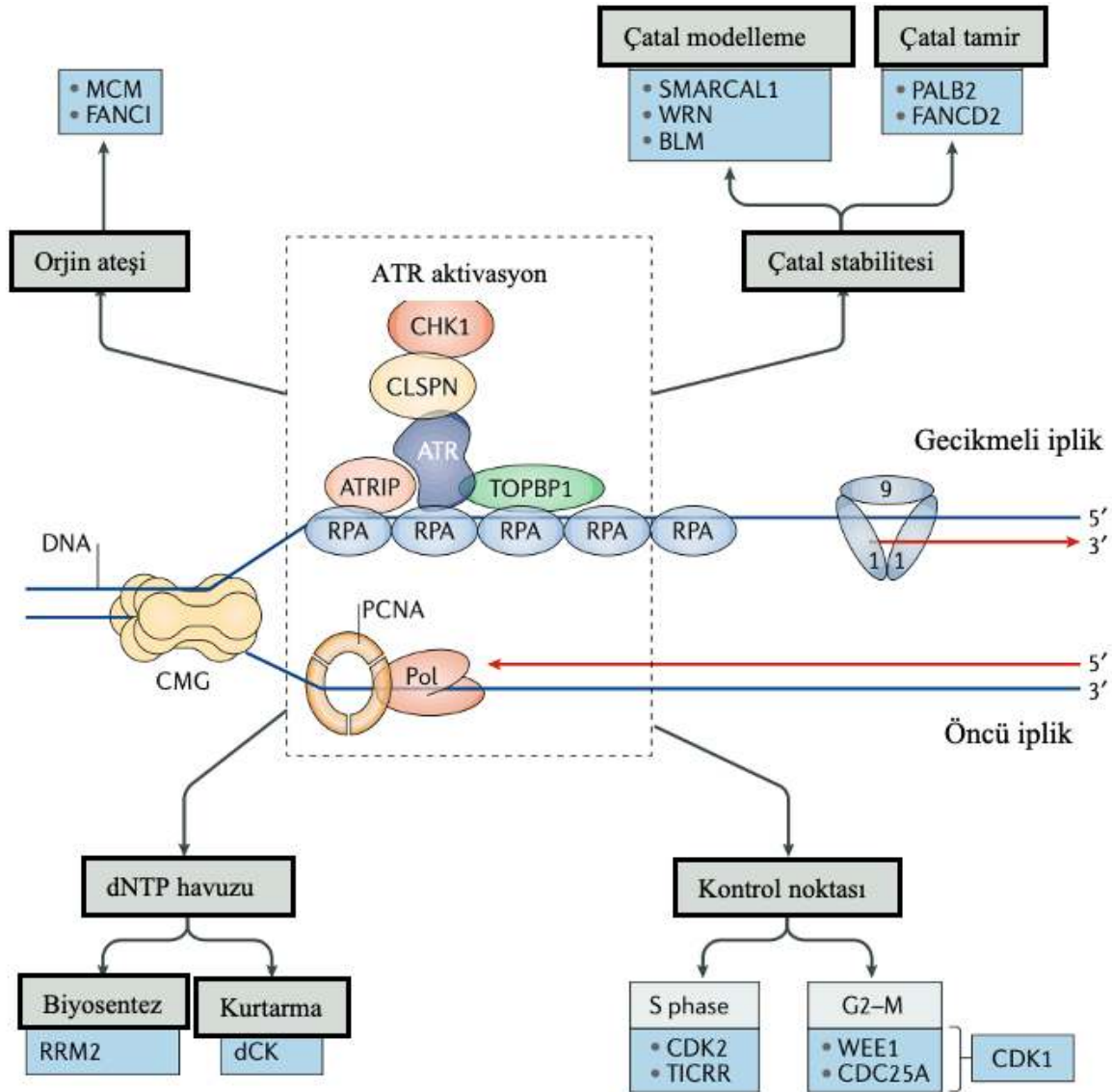
ATM öncelikli olarak iki-iplik/zincir DNA zincir kırıklarına cevaben aktive olurken, ATR tek-zincir/iplik DNA yapısı ve replikasyon stresi mekanizmaları tarafından aktive edilir. ATR aktive olduğunda sinyal ileti yolağındaki etkin kinaz olan Chk1'i aktive eder, ATR-Chk1 yolağı genomu DNA hasarı ve replikasyon stresinden korumak için hücre siklusunu durdurur, replikasyon orijinini baskılar, strese girmiş replikasyon çatallarını korur ve DNA tamiri gibi birçok hücresel yanıtı düzenler (Şekil 5) (79). Chk1'in ATR tarafından fosforilasyonu sonrası tam olarak aktivasyonu için claspin adaptör proteini iş birliğini gerektirir (80). ATR-Chk1 yolağının aktivasyonu, RPA tarafından kaplanmış/sarılmış tek-zincir/iplik DNA tarafından tetiklenir. ATR'nin partner proteini olan ATRIP, RPA'yı tanır ve bağlanır, böylece ATR-ATRIP, RPA ile kaplı tek-zincir DNA'ya bağlanmış olur. Sonrasında Rad17 kompleksi, Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1 kompleksi) ve Rad9, Rad1, Hus1 etkileşimli tek nükleer protein (*for Rad9, Rad1, Hus1 interacting nuclear orphan*, RHINO) bölgeye toplanırlar. Bu protein kompleksleri DNA topoizomerez 2-bağlayıcı protein 1 (*DNA topoisomerase 2-binding protein 1*, TopBP1) yoluyla ATR-ATRIP kinaz aktivitesini artırır, ATR Claspin proteininin de yardımıyla Chk1'i fosforile eder, Chk1'in aktif hale geçer. ATR tarafından fosforilasyon yoluyla aktive edilen Chk1 hücre bölünme döngüsü 25 (*the cell division cycle 25*, Cdc25) fosfataz gibi hücre döngüsü bileşenlerini fosforile ederek baskılar, eşzamanlı olarak homolog rekombinasyon ve NER gibi DNA onarım mekanizmalarını aktive eder (Şekil 5) (78).



Şekil 5. ATR-Chk1 yolağının DNA hasarına cevaben aktive olması (79).

ATR ilk olarak maya hücrelerinde DNA hasarı kontrol noktalarında görev yapan mitoz giriş kontrol noktası proteini (*mitosis entry checkpoint protein*, Mec1)'in memeli hücrelerindeki homolog geni olarak tespit edilmiştir (81, 82). Geliştirilen fare modelinde ATR' nin biallelik inaktivasyonu yaşamları bağdaşmaz iken heterozigot ATR^{+/-} fareler fertil olduğu ve belirgin bir fenotip göstermezler (83). Bununla paralel biçimde erişkin fare modellerinde ATR' nin genetik inaktivasyonu prematüre yaşlanma ve özellikle hızlı çoğalma kapasitesine sahip hücre gruplarında öncül hücrelerin depleksiyonuna neden olduğu bulunmuştur (84, 85). ATR veya ATRIP mutasyonları ile ilişkili olan Seckel sendromu otozomal resesif geçiş gösteren, gelişme geriliği, düşük doğum ağırlığı, mikrosefali, mental retardasyon ve karakteristik yüz görünümü ile karakterize bir hastalıktır (86, 87). Seckel sendromu fare modelinde prematüre yaşlanma ve diğer anomaliler görülse de kanser insidansında herhangi bir artış gözlenmemiştir (88).

Replikasyon stresi cevabının öncelikli görevi duraklatılmış replikasyon çatallarının çökmesini engellemektir. Replikasyon stresi cevabı sürecinde ATR; Kromatin alt ailesi A benzeri protein 1'in SWI/SNF ile ilişkili matris ilişkili aktin bağımlı düzenleyicisi (*SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1*, SMARCA1), Bloom sendrom protein (*Bloom syndrome protein*, BLM), Werner sendrom helikaz (*Werner syndrome helicase*, WRN) gibi helikazların fonksiyonlarını düzenleyerek duraklatılmış replikasyon çatallarının yapısal olarak yeniden modellenmesini sağlar (89-92). Ek olarak ATR, BRCA2 ortağı ve yerini belirleyici (*Partner and localizer of BRCA2*, PALPB2) ve Fanconi anemisi grubu D2 proteini (*Fanconi anemia group D2 protein*, FANCD2) gibi homolog rekombinasyon unsurlarını replikasyon stresi bölgesine çekerek duraklatılmış çatalların yarattığı hasarın DNA yapısının çökmesinden önce tamir edilmesini gerçekleştirir (93, 94). ATR'nin, minikromozom tamir kompleksi (*minichromosome maintenance complex*, MCM) ve Fanconi anemisi tamamlayıcı grup I (*Fanconi anemia complementation group 1*, FANCI) proteinlerini fosforile ederek DNA replikasyon orijin ateşleme noktalarını (origin firing) kontrol ederek replikasyon stresini sınırlamaya çalıştığı ortaya konmuştur (95, 96). Bir başka moleküler etki mekanizması olarak ATR, Ribonükleozid-difosfat redüktaz alt birimi M2 (*Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2*, RRM2) transkripsiyonunu arttırarak veya RRM2'nin proteozomal yıkımını yavaşlatarak deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) biyosentezini stimüle ederek, artan dNTP seviyeleri yoluyla replikasyon stresini azaltmaya çalışır (Şekil 6) (97-99).



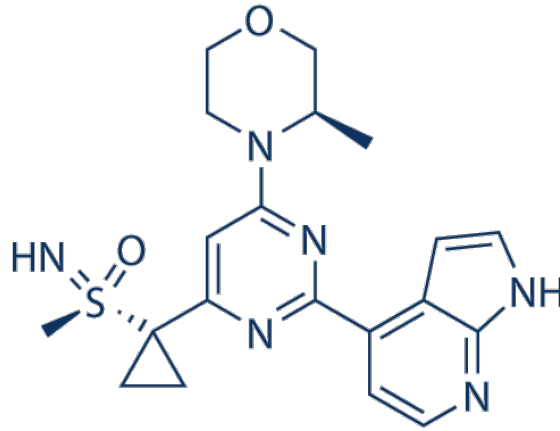
Şekil 6. ATR' ye bağlı replikasyon stres yanıtının aktivasyonu (78).

Ancak kanser hücrelerinde ATR transforme olmamış normal hücelere göre daha kritik roller üstlenebilir. ATR'nin delesyonu veya inaktive edici mutasyonları sadece malign melanomların alt tiplerinde raporlanmıştır (100). Kanser hücrelerinde Fare sarkoma virüs (*Rat sarcoma virus*, Ras) ve hücrel Miyelositomatozis, (*cellular Myelocytomatosis*, c-Myc) gibi onkojenlerin aşırı ifadenmesi yüksek düzeyde replikasyon stresine neden olurken, bu hücrelerin sağkalımının etkin bir ATR sinyal ileti sistemine bağlı olduğu gösterilmiştir. Ek olarak ATM ifadenmesinde eksikliğin veya ATM'nin mutasyon neticesinde disfonksiyonunun

kanser hücrelerini ATR baskılanmasına daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (101-103). Tüm bunlarla beraber ATR'nin hücre döngüsünü yavaşlatarak DNA tamirine olanak sağladığı düşünüldüğünde, ATR inhibitörlerinin özellikle DNA hasarı indükleyen kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımı rasyonel bir seçenektir. Bu önermeyi destekleyecek biçimde ATR inhibitörlerinin p53 yolağı defektif olan hücrelerde p53 yolağı intaktif olan hücrelere göre genotoksik ajanlarla daha etkin sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur (104-106). Bunların sonucunda yüksek seviyede replikasyon stresi ile mücadele etmek zorunda olan kanser hücrelerinin, replikasyon stresi cevabını düzenleyen ve sınırlayan mekanizmalara bağımlı olması rasyonel bir çıkarımdır.

2.3.4 ATR inhibitörleri

Seçici olarak ATR'i baskıladığı raporlanan ilk inhibitör VE-821'dir (107). Farmakodinamik özellikleri ve seçiciliği geliştirilmiş olan VE-822 (VX-970)' in farklı kanser hücrelerinde '*cisplatin*', '*oxaliplatin*', '*etoposide*', iyonize radyasyon ve '*gemcitabine*' gibi DNA hasarı indükleyici ajanlarla etkin kombine etki gösterdiği bulunmuştur (108-112). Oral yolla kullanılabilen AZD6738 ATR için yüksek seçiciliğe sahip ve optimal farmakodinamik özelliklere sahip bir ATR inhibitörü olarak sentezlenmiştir ve karakterize edilmiştir (Şekil 7) (113, 114).



Şekil 7. AZD6738'in kimyasal yapısı (114).

AZD6738'in hücresel düzeyde ATR için seçici inhibisyon konsantrasyonu 0.074 μM olarak bulunurken PIKK ailesine ait diğer kinazları ATM için $>30 \mu\text{M}$ ve PI3K α için $>30 \mu\text{M}$

olarak belirlenmiştir (114). AZD6738 özellikle p53- ve ATM-yetersiz/eksik tümör modellerinde gerek tekil ajan olarak gerekse iyonize radyasyon, “5-FU”, *cisplatin* ve PARP inhibitörleri gibi genotoksik ajanlarla kombine biçimde kullanıldığında etkinlik göstermiştir (115-120). Ancak ATR’nin normal hücre fonksiyonlardaki kritik rolü göz önüne alındığında fizyolojik düzeyde toksisite gösterme olasılığı mevcuttur.

Duraklatılmış replikasyon çatallarının tamirinde görev yapan homolog rekombinasyon sinyal ileti yollarındaki bozukluklar da kanser hücrelerini ATR inhibitörlerine duyarlı hale getirebilir. RAD51 veya BRCA1’in RNA interferans (RNA interference, RNAi) -temelli susturumunun over kanseri hücrelerini ATR inhibitörlerine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (121, 122). Ek olarak ATR inhibitörleri ve PARP inhibitörlerinin kombinatoryal uygulamasının over kanserini de içeren birçok tümör tipinde etkin hücre ölümü indüklediği gösterilmiştir (116, 123-125).

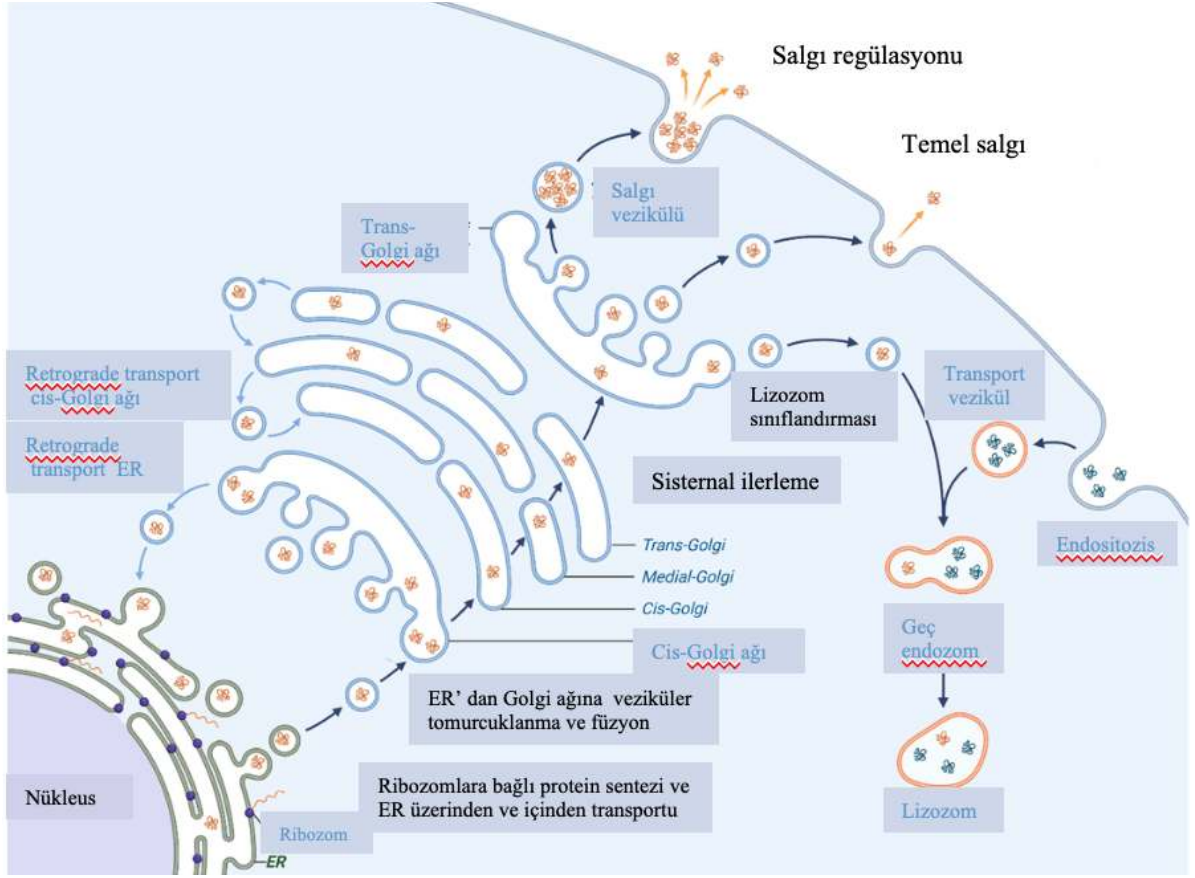
ATR inhibitörlerinin mekanistik çalışma prensipleri birkaç temel fenomenolojik sisteme dayanabilir. ATR’ nin bloke edilmesi çok sayıda durağan replikasyon orijininin aktive hale gelmesine, birçok ssDNA bölgesinin ortaya çıkmasına ve hücrel RPA havuzunun tükenmesine neden olabilir. RPA seviyeleri azaldığından ssDNA bölgeleri çift-zincir kırıkları ile beraber kromozom kırıklarına yol açabilir (126). ATR inhibisyonu dNTP sentezini de baskılayacağı için replikasyon stresini daha da artırır, duraklatılmış replikasyon çatallarının artışı ile genomik instabiliteye neden olur. Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrar / CRISPR ilişkili nükleaz 9- (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated nuclease-9*, CRISPR/Cas9-) temelli bir fonksiyon kaybı genetik tarama çalışmasında fare embriyonik hücrelerinde Cdc25A’ nın delesyonunun hücreleri ATR inhibisyonuna dirençli hale getirdiği gösterilmiştir (127). ATR ve Chk1 amplifikasyonlarına özellikle yüksek derecede genomik instabiliteye sahip tümörlerde rastlanmıştır (121). Özetle ATR bir yandan DNA replikasyonuna bağlı replikasyon stresi ile, diğer yandan mitotik geçişin düzenlenmesini kontrol ederek genomik stabiliteye katkı sunar. ATR inhibitörlerine yanıtı ve artan replikasyon stresini takip etmek için en sık kullanılan moleküler belirteç fosforile histon H2AX (γ H2AX)’ tir. Deneysel ve klinik uygulamalarda immünofloresan ve immünhistokimya boyamaları ile değerlendirilen γ H2AX noktasal odak boyamaları genellikle çift-zincir kırıklarına işaret ederken replikasyon stresinde pan-nükleer boyama paterni görülür (128, 129).

2.4. Golgi Kompleksi

Organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri özellikle çevresel stres uyaranlarına karşı sinyal ileti cevaplarını doğru şiddette ve doğru sürede aktive edebilme yeteneklerine bağlıdır. Üst düzeyde evrimleşmişmiş organizmaları oluşturan hücrelerde hücre içi kompartimentalizasyon ve özelleşmiş organel fonksiyonları bu stres cevapları için kritiktir. Hücre içi protein trafiği ve yönlendirilmesi fonksiyonları için bir merkez olarak görev yapan Golgi Kompleksi (GK) endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organellere benzer biçimde hücresel homeostazın korunmasında önemli yol oynamaktadır. GK memeli hücrelerinde dinamik bir yapıya sahiptir, GK'nin doğru biçimde yapılandırılması, yapı-fonksiyon ilişkisinin net olması hücrenin homeostazı için kritik önemdedir (130).

2.4.1. Golgi kompleksinin yapısal ve fonksiyonel işlevleri

GK hücre içi protein trafiği ve yönlendirilmesi fonksiyonları için bir merkezi bir rolü vardır. İnsan hücrelerinde GK, protein ve lipidlerin ana modifikasyon ve dağıtım bileşeni olarak görev yapar. Protein salgılanması, membran ve proteinlerin hücre içi lokalizasyonu, glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar GK tarafından denetlenir. Kargoların taşınmasında, post-translasyonel modifikasyonda yer alan enzimler (glikoziltransferazlar, glikosidazlar ve kinazlar) aracılık ederken, GK'nın şerit yapısı ve sarnıç istiflenmesi çoğunlukla sarmal bobin matris golgin proteinlerinin iş birliğine dayanır. Bu proteinlerin arasında, Giantin, Golgi matriks proteini 130 (*Golgi matrix proteini 130*, GM130) ve Golgi Yeniden Birleşme ve Proteinlerin Yığılması, (*Golgi Reassembly and Stacking Proteins*, GRASP)'lar üçlü bir kompleks oluştururlar ve Endoplazmik Retikulum (ER)'dan taşınan kargolar için GK yanaşma yerleri olarak görev yaparlar (Şekil 8) (131).



Şekil 8. Hücre İçi Protein Trafikinde Golgi Kompleksi (132).

GK şeritinin spatiyotemporal organizasyonu artan protein ve membran sentezine adaptasyon için gereklidir (133). Dolayısı ile Golgi mimarisindeki bozulmalar nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi patolojilerde sıklıkla gözlemlenir (134-136). GK omurgalı hücrelerinin büyük kısmında interfaz aşamasında kurdele yapısındadır, insanlarda bu duruma istisna olarak, gastrik parietal hücreler ve mesane üroepitelyal iki hücre grubu bulunmaktadır (137, 138). GK istif yapısı polarize olmuş 4-8 yassı yapıda membran sarnıcından oluşur, *cis* yüzü ER'dan kargoları alırken *trans* yüzü farklı hücre içi veya dışı farklı destinasyonlara kargoların gönderilmesinden sorumludur (134). Polarize olmayan hücrelerde ise GK şeridi sentrozoma yakın bir bölgede lokalize olur.

GK'nin mimari organizasyonunda ve fonksiyonunda görev üstlenen iki önemli protein ailesi olan golginler ve GRASP'lar karakterize edilmiştir (139-143). Golginler GK'ye spesifik lokalizasyonları ve *coiled-coil* protein yapıları ile karakterize edilirler. Golginlerin önemli bir

kısmı ADP-ribosilasyon faktör (Arf) protein ailesi tarafından GK'nin sitoplazmik yüzüne yönlendirilirken, bir kısmı da integral membran proteinler olarak bulunurlar (140). Sarmal-sarmal protein yapılarından dolayı golginler 300 nm' ye kadar hücre içi uzanma kapasitesine sahiptirler (144, 145). Golginler Rab protein ailesi üyeleri, Çözünür N-etilmaleimid-Hassas Faktör Bağlantı Protein, (*Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Proteins*, SNAP) Reseptör, (*SNAP Receptors*, SNARE)'ler, mikrotübüller ve aktin bağlantı proteinleri gibi pek çok protein-protein ilişkisi kurabilirler. Golginler membran trafiği, golgi sarnıçlarının arasında köprü kurulması ve transport veziküllerinin hedef membran yapılarına yanaşması ve tutunması gibi pek çok fonksiyon üstlenirler (146). 88C içeren sarmal-sarmal alan (*Coiled-coil domain containing 88C*, GCC88) proteini trans golgi ağı (trans golgi network, TGN)'de lokalizedir, evrimsel süreçte oldukça korunmuş Golgin-97, RanBP2alpha, Imh1p and p230/golgin-245 (GRIP) domain'i vasıtasıyla TGN membranlarına bağlanır (147). Diğer golgin proteinleri gibi *coiled-coil* yapısına sahip olan GCC88 endozom-TGN retrograd transportunda görev yapar (148). HeLA hücrelerinde GCC88'in aşırı ekspresyonunun Golgi şerit yapısının bozulmasına, Golgi'nin mini istifler şeklinde sitoplazmaya dağılmasına neden olduğu gösterilmiştir (149). Dolayısı ile GCC88 GK' nin mini istifleri ile Golgi şeritleri arasındaki dengeyi aktin filamentleri ile ilişkisi yoluyla düzenlemektedir. HeLa hücrelerinde GCC88'in aşırı ifadenmesinin LC3-II-pozitif otofagozomların sayısında artışa yol açtığı ve bu durumun artan otofagozom sentezi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Golgin-245/p230 da GRIP domainine sahiptir ve mikrotübülleri aktin filamentlerine bağlayan Mikrotübül-aktin çapraz bağlama faktörü 1 (*microtubule-actin cross-linking factor 1*, MACF1) ile protein-protein ilişkisi kurduğu gösterilmiştir (150). Yine GRIP domainine sahip GCC185 TGN golgin protein ailesinin üyesidir ancak Arl1 protein-protein ilişkisi diğer golginlere göre daha zayıftır (151). GCC185'in en önemli fonksiyonu mikrotübül düzenleme merkezi (*microtubule organizing center*, MTOC)'un organizasyonunu sağlar ve GCC185' in susturum (knockdown)' u şiddetli Golgi fragmentasyonuna neden olur. Mikrotübüller *cis*-Golgi üzerinde nükleasyona uğrarken trans-Golgi üzerinde GCC185 tarafından stabilize edilirler. Mikrotübüller ve GCC185 arasındaki etkileşim mikrotübüllerin artı ucuna bağlanan Sitoplazmik bağlayıcı ilişkili protein (*cytoplasmic linker associated proteins*, CLASP)'lar tarafından düzenlenir (152, 153). GCC185 yoluyla Golgi' ye bağlanan mikrotübüller mitoz sonrası dağılmış Golgi istiflerinin yeniden bir araya gelmesini ve füzyonunu sağlar. Giantin golgin protein ailesinin en büyük üyesidir ve *cis*-

Golgi sarnıçlarına C-terminal transmembran domaini ile bağlanır. Giantin' in p115 gibi diğer proteinlerle etkileşime girerek Kaplama Proteini kompleks 1 (*coat protein complex I*, COPI) veziküllerinin Golgi sarnıçlarına bağlanmasını sağladığı gösterilmiştir (154-156).

GK yapısının korunmasında ve GK sarnıçlarının istiflenmesinde yer alan GM130, bir cis-Golgi matris proteini olarak tanımlanır. GM130 'un, membran trafiği için gerekli olan bağlama etkileşimi yoluyla GK yapısının korunmasında dolaylı bir rol oynar (157). 130 kDa' lık GM130, cis Golgi 'nin belirteçlerinden biridir. GM130 proteini, ER ve GK zarlarından çıkan taşıma vezikülleri arasındaki füzyon, GK üzerindeki mikrotübüllerin çekirdeklenmesi, iğ düzeneği ve hücre bölünmesi ve GK'nın yapılanmasının organizasyonunun düzenlenmesinde olmak üzere çeşitli süreçlerde anahtar rol oynamaktadır (158).

GM130 *cis*-Golgi'ye lokalizedir, COPI veziküllerinin bağlanmasına dair fonksiyonlarına ek olarak, GM130 interfaz ve mitoz sırasında aktin ve mikrotübüller ile etkileşime girerek MTOC' un Golgi'de oluşumuna öncülük eder, A-kinaz çapa proteini 9 (*A-kinase anchor protein 9*, AKAP450) ile girdiği protein-protein ilişkisi mikrotübüllerin cis-Golgi'de nükleasyonu için kritiktir (159). GM130 aynı zamanda GRASP65-p115 protein kompleksi ile protein-protein ilişkisi yoluyla Golgi şerit tabakaları bir arada tutar (160-162). Yapılan çalışmalarda GM130'un genetik olarak susturumunun şerit yapısını bozarak tekil tabakalarına ayrılmasına yol açtığı gösterilmiştir (163). Fizyolojik mekanizmalar açısından ise mitoz sırasında GM130'un fosforilasyon yoluyla geçici olarak baskılanması Golgi'nin parçalara ayrılmasını ve mitoz sonrası tekrardan doğru mimaride birleştirilmesini düzenler (164). GM130'un delesyonuna veya fonksiyonel inaktivasyonuna bağlı olarak nöronlarda Golgi dispersiyonu ve hücre ölümü gözlemlenmiştir. CDK5'in GM130 fosforilasyonunun Alzheimer hastalığı primer nöron ve farklılaşmış nöron modellerinde Golgi dispersiyonu/dağılmasına neden olduğu bulunmuştur (165). Merkezi sinir sisteminde GM130'un seçici olarak susturumu farelerde Golgi fragmentasyonu ile beraber dendritlerin atrofisive nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (163).

GRASP' lar ikinci önemli Golgi yapısal protein ailesini oluştururken temel işlevleri Golgi sarnıçlarının birbiriyle sıkı biçimde yapışmasını sağlayan moleküler tutkallar olarak görev yapmayı içerir (143). GRASP65 *cis*-Golgi membranı ile etkileşimi bulunun periferel bir protein olarak karakterize edilir (166). Yapısal olarak GRASP65 evrimsel olarak korunmuş bir GRASP domainine ve bu domain'e bitişik GM130 bağlanma bölgesine sahiptir (167, 168). Golgi

membranına N-terminal ucundaki glisinin miyristoylasyonu neticesinde yönlendirilen GRASP65, GM130 ile protein-protein etkileşimi neticesinde Golgi’de lokalize kalır (169, 170). GRASP65, dimerler ve oligomerler oluşturarak sarnıç membranlarını bir arada tutar. Hücre döngüsü sırasında mitotik kinazlar tarafından fosforile edilen GRASP65, Golgi’ nin mitotik süreçte dağılması ve yeniden oluşma mekanizmalarında görev yapar (171). Bu bulguları destekleyecek biçimde GRASP65’in fosforile-edilemeyen mutant formunun HeLa hücrelerinde eksprese edilmesinin mitotik Golgi fragmentasyonunu engelleyerek, Golgi sarnıç yapısını koruduğu gösterilmiştir (167). CRISPR/Cas9 susturumu GRASP65 ise Golgi yapısında anomaliler, organize olmayan membranlar, kısalmış ve sayıları azalmış Golgi sarnıçları ile karakterize edilmiştir(172).

Bu iki grup protein ailesinin yanı sıra bir başka önemli Golgi yapısal proteini Golgi fosfoprotein 3, (*Golgi phosphoprotein 3*, GOLPH3)’ tür. Trans-Golgi’ye lokalize olan GOLPH3 yüksek fosfatidilinositol-4-fosfat içeriğine sahip TGN membranlarına bağlanır (173). GOLPH3’ün RNAi-yoluyla susturumu Golgi yapısının; aşırı sıkıştırılmış Golgi yapısı, Golgi-plazma membranı vezikül trafiğinde bozulma ve hücre ölümüne neden olurken GOLPH3 aşırı ifadenmesi özellikle DNA hasarı yaratan ajanlara karşı azalmış hücre ölümü cevabına yol açmıştır (174).

2.4.2. Golgi kompleksi stresi ve hücre ölümü

Memeli hücrelerinde GK kendine özgü sarnıç yapısına sahiptir ve bu yapı fizyolojik koşullar altında sadece hücre siklüsü sırasında çözülür ve yeniden yapılandırılır. Ancak fizyolojik olmayan stres koşulları altında, örneğin besin azlığı, DNA hasarı ve oksidatif stres gibi, bu mimari bozulabilir (175). GK yapısı bozulduğunda eşzamanlı olarak fonksiyon da zarar görebilir, GK yapısal proteinlerinin yıkımı veya kesilmesi, ortaya çıkan bu fenotipten sorumludur (176). Apoptoz (progamlı hücre ölümü) BCL-2 protein ailesi tarafından mitokondriyal dış membranın geçirgenliği kontrol edilerek düzenlenir (177, 178). Apoptozun biyokimyasal süreçlerinde mitokondriyal dış membran geçirgenliği ile birlikte ER’da kalsiyum salınımı gibi diğer organellerin etkileşimi de görülür. GK’de hücre ölümü sürecinde ilk etkilenen organellerden birisidir (179-181). Apoptoz sırasında GK’ nin yapısal proteinlerinin önemli bir kısmı aktive olan kaspazlar tarafından kesilirler (182). GRASP65, golgin-160, GM130 ve p115 gibi pek çok Golgi ilişkili proteinin yıkımı veya kesilmesi apoptoza sekonder

Golgi fragmentasyonunu etkiler. Golgin-160 vezikül bağlanması ve trafiğinde önemli rol oynayan bir golgindir (183). Golgin-160 kaspaz-2 tarafından D59 rezidüsünden kesilir, bu süreç golgin-160'ın kaspaz-3 tarafından D139 rezidüsünden kesilmesinden önce gerçekleşir (184, 185). Kaspaz-2 tarafından kesilemeyen D59A mutasyonuna uğratılmış golgin-160'ın ekspresyonu, hücre ölümünü ve Golgi dağılmasını geciktirir. Golgin-160'ın N-terminal 85 amino asitlik fragmanı Golgi lokalizasyon sinyali ile beraber nükleer lokalizasyon sinyali de içerir (182). GRASP65 iskemiye bağlı vasküler hasarında, staurosporine uygulaması sonrası veya Fas ligand angajmanına sekonder olarak kesime uğrar (186-188). Kaspaz-3 GRASP65'i D330, D375 ve D393 rezidülerinden keser. Kaspaz-3 tarafından kesilmeye dirençli hale gelecek biçimde mutasyona uğramış GRASP65'in ekspresyonu hücrelerde apoptoz sonrası GK fragmentasyonunu geciktirir ve Fas tarafından indüklenen hücre ölümüne karşı korur. İlginç olarak kaspaz-3 tarafından kesilmiş C-terminal fragmanların bir kısmı mitokondriye lokalize olarak BCL-2 proteinleri BCL-2, B hücreli lenfoma-ekstra büyük (*B-cell lymphoma-extra-large*, BCL-XL)'e bağlanabilir, ancak bu protein-protein ilişkisinin hücresel cevaptaki önemi henüz bilinmemektedir. p115 apoptotik süreçte kaspaz-3 ve kaspaz-8 tarafından kesilebilir, p115'in kaspazlar tarafından kesilmesi sonrası ortaya çıkan C-terminal fragmanı hücrelerde apoptoza ve Golgi fragmentasyonuna neden olur (189). Bu C-terminal fragman nükleusa transloke olup apoptotik sürecin şiddetini arttırabilir. Fas ligand tarafından indüklenen hücre ölümünde GK fragmentasyonu ile beraber GM130 seviyelerinin azaldığı da gösterilmiştir (190).

GOLPH3 aktin motor proteini Miyozin-XVIIIa (*Myosin-XVIIIa*, MYO18A) ile protein-protein ilişkisi yoluyla bağlantı kurar, bu sayede Golgi membranlarını aktin hücresel ağına bağlar (191). Bu bağlanma yarattığı tensil kuvvetle beraber vezikül trafiğine Golgi şeridinin yapısının korunmasına katkıda bulunur. Dolayısı ile GOLPH3'ün seviyesinin azalması bu kuvvetin kaybına neden olur, Golgi şeridi daha sıkışık bir yapıya dönüşür ve TGN üzerinden oluşan vezikül miktarı da azalır. GOLPH3 akciğer kanseri ve meme kanseri gibi birçok solid kanser tipinde aşırı ifadenme gösteren bir onkojen olarak tanımlanmıştır (192-197). DNA hasarı GOLPH3'e bağlı biçimde Golgi dağılmasına neden olabilir. DNA hasarı tarafından aktive edilen DNA-PK GOLPH3'ü T143/T148 rezidülerinden fosforile eder ve bununla beraber Golgi fragmentasyonu gözlemlenir (174). Bu süreç DNA hasarı tarafından indüklenen hücre ölümünü engelleyici fonksiyon gösterir. Sonuç olarak kanser hücrelerinde GK ile ilişkili birçok proteinin

gen ekspresyonu seviyesinde onkogen veya tümör baskılayıcı roller üstenebileceği birçok çalışmada gösterilmiştir (157, 158, 198-200).

2.4.3. Golgi kompleks stres indükleyici molekül

Brefeldin A, memeli hücrelerinde önemli etkileri olan toksik mantarlar tarafından üretilen küçük bir hidrofobik bileşik olarak tanımlanmaktadır (201). Brefeldin A uygulamasından sonra GK parçalara ayrılmaktadır. Brefeldin A, Arf aktive eden bazı proteinleri inhibe etmektedir. Arf küçük G proteinleri ailesinin aktif GTP'ye bağlı formlarında, donör membranlardan kargo moleküllerini seçimine katılarak, küçük zar veziküllerinin tomurcuklanmasını sağlamak için iskele görevi gören protein komplekslerini toplayarak birleştirmektedir. ER' dan tomurcuklanan veziküller, aktif bir sıralamanın gerçekleştiği ara bölmeleri oluşturmak için birleşmektedirler. Salgılanması gereken proteinler, sarnıç olgunlaşması ve/veya GK yoluyla anterograd veziküler taşıma ile ilerlerken, ER'ye geri alınması gereken proteinler, geri dönüşüm için retrograd veziküller halinde sınıflandırılmaktadırlar. Bu veziküllerin oluşumu, COPII kaplamasının Arf1-GTP tarafından birleştirilmesine bağlı olmaktadır. Arf1 'in inhibisyonu, COPII kaplamasının ve diğer birçok periferik membran proteininin sitozole salınmasına yol açmaktadır.

2.5. Programlanmış Hücre Ölümü

Kanser gelişimi sürecinde genetik ya da epigenetik olarak hücre ölüm yollarının baskılanması kanser oluşumunda kritik moleküler aşamalardan birisini oluşturmaktadır (54-56). Mitokondriyal hücre ölümü yolağının aktive olması kanser hücrelerinde kemoterapi ajanları ya da radyoterapi uygulamasına cevaben hücre ölümünün öncelikli yolağını oluşturmaktadır (202, 203). Bu yolaktaki bozulmalar kanser hücrelerinde kemoterapi direncine neden olabilmektedir. Mitokondriyal dış membranının geçirgen hale gelmesi ve sitokrom c'nin sitozole geçişi apoptotik yolak için geri çevrilemez moleküler basamağı işaret etmektedir. İntrinsik apoptoz mekanizması mitokondri dış zarının geçirgen hale gelmesi, sitokrom c ve diğer hücre ölümü indükleyici moleküllerin sitozole salınması, apoptozom kompleksinin oluşması ve kaspaz-3/-9 aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu süreç BCL-2 proteinleri tarafından moleküler düzeyde sıkı biçimde kontrol edilmektedir (203). BCL-2 protein ailesinin üyeleri protein-protein etkileşimiyle MOMP'u kontrol etmektedirler. Hücre hasarını takiben BCL-2 ile ilişkili X proteini, (*Bcl-2-associated X protein*, BAX) ve BCL-2 antagonisti öldürücü (*BCL-2 antagonist*

killer 1, BAK) proapoptotik proteinleri allosterik dönüşüme uğratarak, N-terminal domainleri açık hale gelmekte, oligomerize olmakta ve porlar oluşturarak mitokondriyal dış membranının geçirgenliğini sağlayarak, *sitokrom c* mitokondriden sitozole geçmektedir. Sitozoldeki *sitokrom c*, apoptozom protein kompleksi içerisinde kaspaz-9'un aktivasyonunu indüklemektedir. BAX ve BAK'ın aktivasyonu aktivatör BH3 proteinleri, örneğin BH3 etkileşimli alan ölüm agonisti, (*BH3 interacting-domain death agonist*, BID) ve Bcl-2 Hücre ölümü etkileşim aracısı (*Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*, BIM) tarafından gerçekleştirilir (204). Hücre ölümünü baskılayan BCL-XL, Miyeloid Hücreli Lösemi 1 (*Myeloid Cell Leukemia 1*, MCL-1), Bcl-2 ile ilişkili protein A1 (*Bcl-2-related protein A1*, BFL-1), BCL-2 benzeri protein (*BCL-2-like protein*, BCL-W) mitokondriyal dış membranının geçirgenliğini ya aktivatör BH3 proteinlerini bağlayarak ya da direkt olarak BAX ve BAK'a bağlanıp bu proteinleri nötralize ederek önlerler. Duyarlastırıcı BH3 proteinleri olan BCL2 hücre ölümünün ilişkili agonisti (*BCL2 associated agonist of cell death*, BAD), NOXA, p53-apoptozisin yukarı düzenlenmiş modülatörü (*p53-upregulated modulator of apoptosis*, PUMA) ve Bcl-2 ile etkileşen öldürücü (Bcl-2-interacting killer, BIK) proteinler ise hücre hasarına cevaben antiapoptotik BCL-2 proteinlerinin BCL-2 homolojisi 3 (BCL-2 homology 3, BH3) bağlanma bölgelerine yarışmacı olarak bağlanmakta ve bu proteinleri baskılayarak, hücre ölümünü indüklemektedirler. Dolayısı ile BCL-2 protein ailesi üyelerinin protein-protein bağlanma ağı mitokondriyal dış membranının geçirgenliğini kontrol eden başlıca mekanizma durumunda olmaktadır. Sağkalım mekanizması BCL-2 proteinlerinin her biri için BH3 proteinine bağlanma afiniteleri farklıdır ve bu bağlanma paterni başarılı biçimde BH3 profillemesi olarak adlandırılan bir teste dönüştürülmüştür (205-210). Bu testin temel prensibini BH3 domainlerden türetilmiş peptidlerin, hücrelerin mitokondrileri ile muamelesi sonrası mitokondriyal dış membranının geçirgenliğinin ölçülmesi sonucu oluşturulmaktadır. Bu peptidlere cevaben ortaya çıkan patern hücrenin ölüme ne denli yakın ya da yakın olduğunun kriteri olarak tespit edilebilmektedir. Bu kriter hücrelerin kemoterapi ajanlarına cevabını öngörmek üzere kullanılabilmekte ve bunun sonucunda klinikte yapılan çalışmalar BH3 profillemenin öngörü gücünü ortaya koymaktadır (205, 210). BCL-2 protein ailesi üyelerinin over kanser hücrelerinin kemoterapi ajanlarına cevabını nasıl düzenlediğine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Abed ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada over kanseri hücrelerinde BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W protein seviyelerini belirleyerek, BCL-XL'in öncelikli sağkalım rolünü üstlendiği saptanmışlardır (211).

2.6. Çalışmanın Amacı

Over kanserlerinde 5 yıllık yaşam süresi %40-50 aralığındadır ve baştan beri var olan ya da sonradan kazanılmış kemoterapi direnci, over kanseri tedavisindeki başarısızlıklarda önemli rol oynar. Kanser tedavilerinin (konvansiyonel kemoterapi, hedefleyici terapiler, radyoterapi, immunoterapi, cerrahi) amacı tümör hücrelerini etkili, seçici ve mümkünse tamamen elimine etmektir. Sıklıkla tümörler bu tedavilere yanıt vermemekte ya da tedavi sürecinde direnç ortaya çıkmakta, tümör yenilenmekte, daha agresif hale gelir. Over kanseri açısından moleküler düzeyde yapılacak çalışmalar yeni tedavi stratejilerine olanak sağlaması açısından önemlidir. Dolayısıyla over kanserinde ilaç uygulanabilir yeni ilaç hedeflerini belirlemek kritik öneme sahiptir.

Kanser sıklıkla DNA hasar tamir mekanizmasındaki bozuklukların sonucu oluşmaktadır. ATR, ATM birlikte en kritik DNA hasarı kontrol ve tamir sistemlerinden birisini kontrol eder. ATM ve ATR kinazları insan hücrelerinde DNA hasar cevabını kontrol eden önemli düzenleyicilerdir (72). ATR hücre sağkalımı için gereklidir ve fare modellerinde ATR'nin her iki kopyasının da inaktivasyonu embriyonik olarak yaşamla bağdaşmaz (83). Birçok kanser hücresinde ATR normal hücrelerle kıyaslandığında daha da önemli roller oynar. Kanser hücrelerinde ATM'nin mutasyonlar neticesinde inaktive olması bu hücreleri yine ATR inhibisyonuna duyarlı hale getirir. Birçok çalışmada p53'ün inaktive edici mutasyonlarının hücreleri ATR inhibitörü ve genotoksik molekül kombinasyonlarına duyarlı hale getirdiği ortaya konmuştur (103, 217, 218). Tüm bu bulgular özellikle ATM ve/veya p53 yolağında blokajı olan kanser hücrelerinde ATR inhibitörleri için bir terapötik pencerinin olabileceğine işaret eder. VE-822 (VX-970) ve AZD6738 (*ceralasertib*) gibi ATR inhibitörleri özellikle p53-ve/veya ATM-hasarlı kanser tiplerinde *in vitro* ve *in vivo* aktivite göstermişlerdir. Her iki ATR inhibitörü de özellikle genotoksik ajanlarla kombine olarak solid tümörlerde ve hematolojik kanserlerde faz I ve II çalışmalarında değerlendirilmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda araştırmanın temel amacı; over kanseri hücrelerinde uygun moleküller ile kombine edildiğinde ATR inhibitörlerinin hücre ölümü indükleyebileceği ve daha efektif bir kanser terapi aracı olarak kullanım olanağı bulabileceğidir. Memeli hücrelerinde Golgi kompleksi, hücresel homeostazın düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan oldukça dinamik bir organdır. Kanser hücrelerinde GK ile ilişkili birçok proteinin gen ekspresyonu seviyesinde onkogen veya tümör baskılayıcı roller üstenebileceği birçok çalışmada gösterilmiştir

(131, 136, 199). Kanser hücrelerinde GOLM1 gibi Golgi proteinleri aşırı ifadenir. Ancak GK'nin ve GK stresinin kanser hücrelerinde proliferasyon ve hücre ölümü üzerine etkisine dair çalışmalar halen çok sınırlıdır.

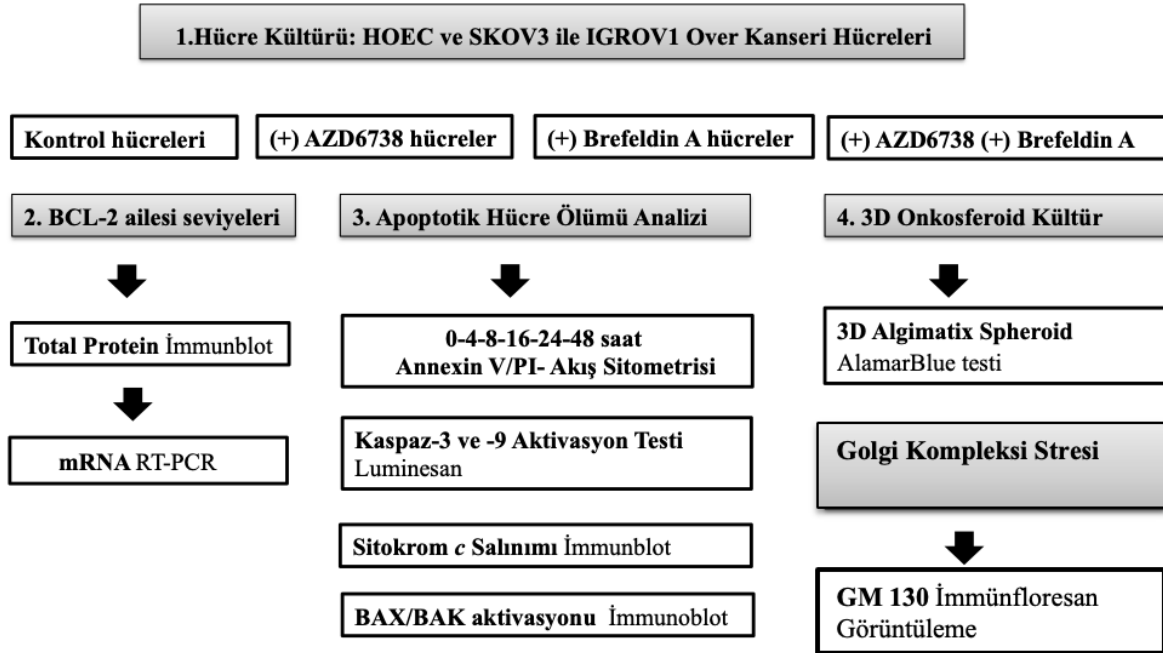
Ön çalışmalarda öncelikli olarak *CellTiter Glo* yöntemini kullanarak SKOV3 over kanseri hücrelerinde ATR inhibitörü AZD6738 için EC₅₀ değerini 48 saatlik inkübasyonu takiben belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile SKOV3 over kanseri hücrelerinin AZD6738 EC₅₀ değerinin 0.45 mikromolar olduğu ortaya koyulmuştur. Tez projesinin ön çalışmalarında over kanser hücrelerinde ilk kez bir ATR inhibitörü ile kombine olarak hücre ölümü indükleyecek bir molekülün belirlenmesi için süpervize-olmayan biçimde yüksek-kapasiteli küçük molekül kombinasyon taraması yapılmıştır. Sonuç olarak elde edilen hit seleksiyonu işleminden sonra GK stres indükleyici Brefeldin A, AZD6738 ile kullanıldığında hücre ölümü indükleme potansiyeline sahip öncelikli molekül olarak tespit edilmiş olup ve tez çalışmasında kullanılmasına karar verilmiştir. Tez proje çalışması over kanseri hücrelerinde ATR inhibitörleri ve GK stresinin eşzamanlı potansiyel terapötik kullanımını değerlendiren özgün bir çalışma niteliğindedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA23/09) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Çalışmalar *in vitro* deney sistemlerinde hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında tarama model hücresi olan SKOV3 over kanseri hücre hattı, IGROV1 over kanseri hücre hattı ve kontrol olarak insan over epitel hücre (*Human Ovarian Epithelial Cell*, HOEC) kullanılmıştır. SKOV3 hücre hattında p53 ve ATM delesyon ve/veya mutasyonlarına bağlı olarak bu genlerin inaktivasyonu belirlenmiştir. SKOV3 hücre hattı genomuna benzer olarak IGROV1 ikinci hücre hattı çalışılması planlanmıştır (https://depmap.org/portal/cell_line/ACH-000811 tab = mutation). p53 ve ATM delesyonu / mutasyonu ve ATR inhibitör duyarlılıkları nedeniyle bu hücre hatları kullanılması planlanmıştır. Çalışma planı şekil 1’de özetlenmiştir.

Çalışma Planı



Şekil 10. Çalışma Planı

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

- Biyogüvenlik Kabini Thermo Scientific / HeraSafe KS
- CO₂ İnkübatörü New Brunswick / Galaxy 170S Eppendorf
- Likit Aspirasyon Sistemi- L İntegra
- Otomatik Pipetler (0.5-10 µl- 2-20 µl- 20-200 µl / 100-1000 µl) Eppendorf
- Santrifüj Soğutmasız Eppendorf / 5702
- Santrifüj Soğutmalı Eppendorf / 5424R
- Santrifüj Spin- Minispınplus Eppendorf
- NanoDrop 1 Spektrofotometre cihazı
- Thermo Block -Eppendorf
- Dijital Mikroskop (Fluoid Cell Imaging Station) -Life Technologies
- Inverted Mikroskop- Leica / DMI1
- Çalkalayıcı -Bnech Rocker 2D
- Karıştırıcı -Benchmak Scientific / BR2000
- Su Banyosu -Bio-rad
- FACSCanto II akış sitometrisinde
- LightCycler 480 II -Roche
- iMark Microplate Reader-Biorad
- Elektroforez- Biorad
- Blot Görüntüleme Cihazı -C-Digit, Licor
- Vortex-Thermoline
- Hassas Terazı -440/45N Kern

3.1.2. Çalışmada kullanılan malzemeler

3.1.2.1. Hücre kültürü

- Brefeldin A #9972 Cell Signaling Catalog no. Life Technologies Catalog No.B7450
- Ceralasertib (AZD6738) Selleckchem Catalog No. S7693 Batch: S769305
- RPMI1640 Medium (1X) (REF 21875-034, 500 ml, Gibco)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) ph 7.4 (1X) (REF 10010-015, 500ml, Gibco)
- FBS, Qualified, HI (Fetal Bovine Serum, Heat Inactivated, REF 10500-064, 500 ml, Gibco,)
- Pen/Strep (Penicillium Streptomycin, REF 15140-122, 100 ml Gibco,)
- 0.25% Trypsin-EDTA (1X) (REF 25200-056, 100 ml, Gibco)

3.1.2.2. Immunblot analiz

- Coomassie Brilliant Blue
- PageRuler Plus Prestained Protein Ladder
- Sample Buffer (Sigma)
- Running Buffer
- Transfer Buffer
- Temed
- Bis-Acrylamid
- Tween 20
- Süttozu (Pınar)
- Whatman Chromatography Paper (Cat no: 3030-392)
- PVDF membran (Millipore)
- Pierce TM ECL Western Blotting Substrate (thermo scientific)
- Primer Antikorlar (PUMA, BCL-2 (#2872), BCL-XL (#2762), BAX (#2774), BAK (#3814), MCL-1, BIM, NOXA (#14766) ve ACTIN (#8457) (Cell Signalling))
- Sekonder Antikor (Mouse /Rabbit)

3.1.2.3. RT-qPCR analiz

- Gerçek Zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) Roche Firmasının Light Cyclers 480 II cihazı kullanılmıştır.
- RNEASY Mini Kit (50 Test) Qiagen ATQ Katalog no:74104
- QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit 204143 (Qiagen)
- LightCycler 480 II 96 Well Plate
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR BCL-2 NM_000633 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00025011
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR BCL XL NM_001191 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00236712
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR MCL1 NM_001197320 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00094122
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR PUMA NM_001127240 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00082859
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR BIM NM_001204108 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00050344
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR NOXA NM_021127 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT01006138
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR BMF NM_033503 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00049315
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR BIK NM_001197 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00070777
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR BAX NM_004324 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00031192
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR BAK NM_001188 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00228508
- QuantiTect primer assay ATQ Qiagen RTqPCR GAPDH NM_002046 Katalog no: 249900 GeneGlobe ID- QT00040894

3.1.2.3. Apoptotik hücre ölüm analizi

- Apoptotik hücre ölümü analizi Annexin V/PI (BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I) kiti kullanılarak, FACSCanto II akış sitometrisi cihazı kullanılmıştır.
- Kaspaz-3 (Caspase-Glo 3/7 Assay, Promega) ve kaspaz 9 (Caspase-Glo 9 assay, Promega) Kitleri PARP (#9532, Cell Signaling), Cleaved PARP (Asp214) (#5625, Cell Signaling), Cleaved Caspase-3 (Asp175) (#9661, Cell Signaling), Cleaved Caspase-9 (Asp315) (#9505, Cell Signaling)
- Sitokrom C (#4272, Cell Signaling) Antikor- COXIV (#4844, Cell Signaling) Antikor
- BAX (6A7, BD Pharmingen) ve BAK (NT) (Ab-2, Millipore) antikorları- 1/1000 BAX (D2E11)- BAK (D4E4) primer antikorları- Dynabead protein G - 1/2000 tavşan sekonder HRP antikor

3.1.2.4. 3D Algimatrix tümör sferoid kültürleri

- AlgiMatrix 3D Culture System (Gibco)
- CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay testi
- Hoechst 33342 Boya
- PARP (#9532, Cell Signaling), Cleaved PARP (Asp214) (#5625, Cell Signaling), Cleaved Caspase-3 (Asp175) (#9661, Cell Signaling), Cleaved Caspase-9 (Asp315) (#9505, Cell Signaling)

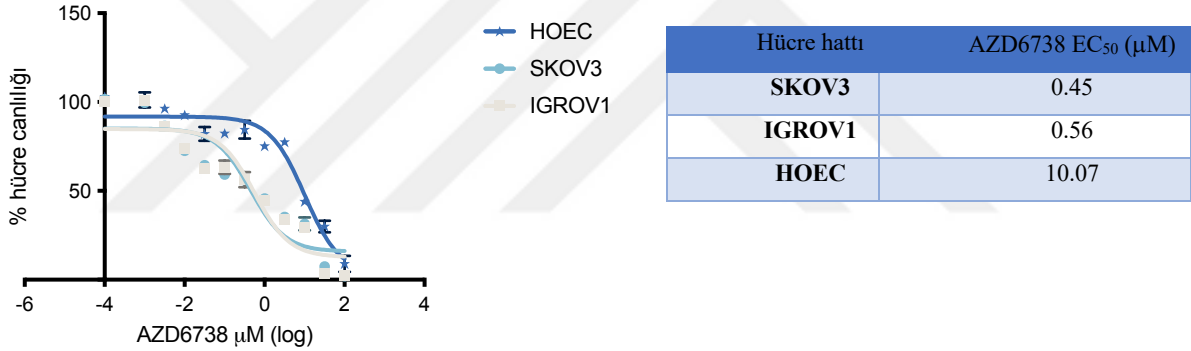
3.1.2.5. Golgi stresi analizi

- GM130 Alexa Fluor 488 antikor (1/300, BD Biosciences, Cat no:560257)
- Phospho-Histone H2AX (S139) (#9718, Cell Signaling, Cat no: 539865-B2)
- Axiocam 503 mono, Zeiss Mikroskop
- Çalışmalarda kullanılan tüm pipet uçları filtreli ve steril kullanılmıştır. 0.2 ml, 1.5 ml, 15 ml ve 50 ml'lik falcon deney tüplerinin hepsi steril olarak kullanılmıştır.

3.2. Araştırma Planı ve Yöntemler

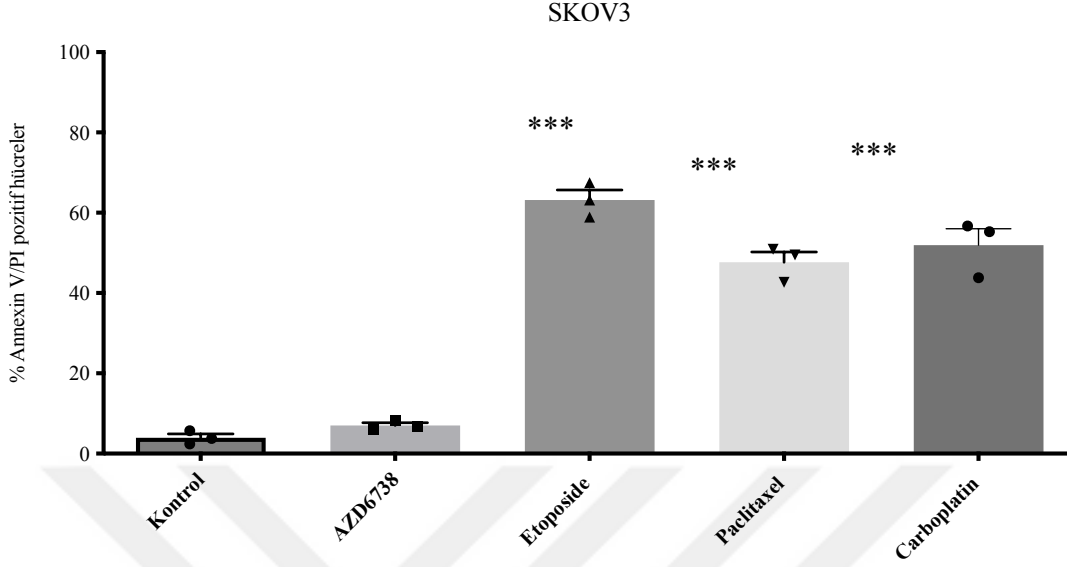
3.2.1. Araştırma Ön Çalışma

Ön çalışmalar da öncelikli olarak *CellTiter Glo* yöntemini kullanılmış olup, SKOV3 ve IGROV1 over kanseri hücrelerinde ve normal over epitel hücrelerinde ATR inhibitörü AZD6738 için EC₅₀ değeri 48 saatlik inkübasyonu takiben belirlenmiştir. Veriler 3 teknik tekrar olarak ölçülmüş ve GraphPad Prism programında non lineer regresyon analizi kullanılarak EC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, SKOV3 over kanseri hücrelerinin AZD6738 EC₅₀ değerinin 0.45 mikromolar, IGROV1 için 0.56 mikromolar olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 11). Eşzamanlı olarak kullanılan normal over epitel hücreleri (HOEC) için EC₅₀ değeri 10 mikromolar'ın üzerinde bulunmuştur. AZD6738'in SKOV3 ve IGROV1 over kanseri hücreleri için bir terapötik penceresinin var olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 11. SKOV3, IGROV1 ve HOEC hücrelerinin AZD6738 için EC₅₀ değerleri.

CellTiter Glo ATP seviyesini ölçen lusiferaz-temelli bir hücre sağkalım değerlendirme yöntemidir, direkt olarak hücrelere uygulanarak ölçüm alınmaktadır. Ancak *CellTiter Glo* hücrelerin canlılığındaki azalmanın hücre ölümüne mi bağlı yoksa anti-proliferatif/hücre döngüsü blokajına mı bağlı olduğunu ayırt edememektedir. Dolayısı ile SKOV3 hücrelerinde hücre ölümü cevabını 48 saatlik AZD6738 uygulaması sonucunda Annexin V/PI boyaması ve akış sitometrisi ile değerlendirildiğinde *CellTiter Glo* ile görülen etkinin hücre ölümüne değil hücre proliferasyonunda baskılanmaya bağlı olduğunu tespit edilmiştir (Şekil 12). Bu deneyde *etoposide*, *paclitaxel* ve *carboplatin* SKOV3 hücrelerinde hücre ölümü için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (***p<0.001, kontrol (3.9) vs. “*etoposide*” (63.2), kontrol (3.9) vs. “*paclitaxel*” (47.7), kontrol (3.9) vs. “*carboplatin*” (51.9) Student's *t*-test)



Şekil 12. SKOV3 hücrelerinin AZD6738, Brefeldin A, AZD6738/Brefeldin A kombinasyonu ve diğer kemoterapi ilaçlarına apoptotik yanıtı.

Bu sonuçlar ATR inhibitörlerinin over kanseri hücrelerinde ve diğer kanser hücre tiplerinde gösterdiği anti-proliferatif/hücre döngüsü baskılayıcı etkisini doğrulamıştır. Bu bulguların doğrultusunda yüksek-kapasiteli küçük molekül kütüphane tarama sisteminde, SKOV3 hücrelerinde hücre ölümü cevabını direkt olarak ölçebilen NUCLEAR-ID Red/Green hücre canlılığı floresan deney sistemi kullanılmaya karar verilmiştir. Tarama yöntemi ve model hücre belirledikten sonra Selleck Natural Product Library L1400 (2054 ayrı molekülden müteşekkil) kütüphanesi kullanılarak tarama gerçekleştirilmiştir (219).

96-kuyucuklu plakalarda (10^4 hücre/kuyucuk) RPMI1640 içerisinde büyütülen SKOV3 hücreleri robotik transfer sistemi (Beckman Biomek FX) kullanılarak $0.1 \mu\text{M}$ tarama molekülü (eşzamanlı olarak her 96 kuyucuk molekül uygulaması için 4 bağımsız kuyucukta negatif kontrol %0.01 DMSO) ile 0.45 mikromolar AZD6738 uygulamasına maruz bırakılmıştır. Hücre ölümü cevabı NUCLEAR-ID testi ile SpectraMax Gemini XPS floresan mikropilaka okuyucu sisteminde değerlendirilmiştir. NUCLEAR-ID Red/Green hücre canlılığı testi iki-renkli floresan prob kullanılan ve hücre membran bütünlüğünü değerlendiren bir testtir. Green prob'un hücre ölümünü takiben bütünlüğünü kaybeden membrandan geçip nükleik asitlere bağlanması ve floresan ışınması (ex/em: $503 \text{ nm}/524 \text{ nm}$) testin ana prensibini oluşturmaktadır.

Hücre canlılığı % negatif kontrol kuyucuklarına göre normalize edilmiş floresan ışıma değerleri x %100 formülü ile hesaplanmıştır. Ham data eldesinden sonra her bir tarama molekülü ve AZD6738 kombinasyonu hesaplanmıştır. Ham data eldesinden sonra her bir tarama molekülü ve AZD6738 kombinasyonu için duyarlılık indeksi değeri (sensitizing index value; SI) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (219).

SI değeri: beklenen total hücre canlılığı etkisi-gözlemlenen kombinasyon etkisi

Beklenen total hücre canlılığı etkisi=(Rc/Cc*Cd/Cc),

Rc/Cc: tarama molekülünün negatif kontrol DMSO ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerine etkisi

Cd/Cc: AZD6738'in negatif kontrol DMSO ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerine etkisi

Gözlemlenen kombinasyon etkisi: Rd/Cc

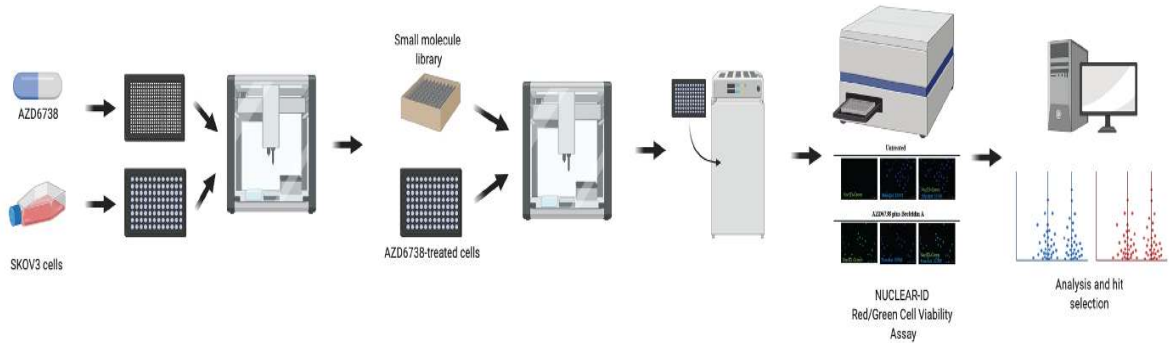
Rd/Cc: tarama molekülünün AZD6738 ile kombine uygulamasının negatif kontrol DMSO ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerine etkisi.

z-skorlar ise;

hedef siRNA SI değeri-plakadaki tüm siRNA duplekslerinin ortalama SI değeri

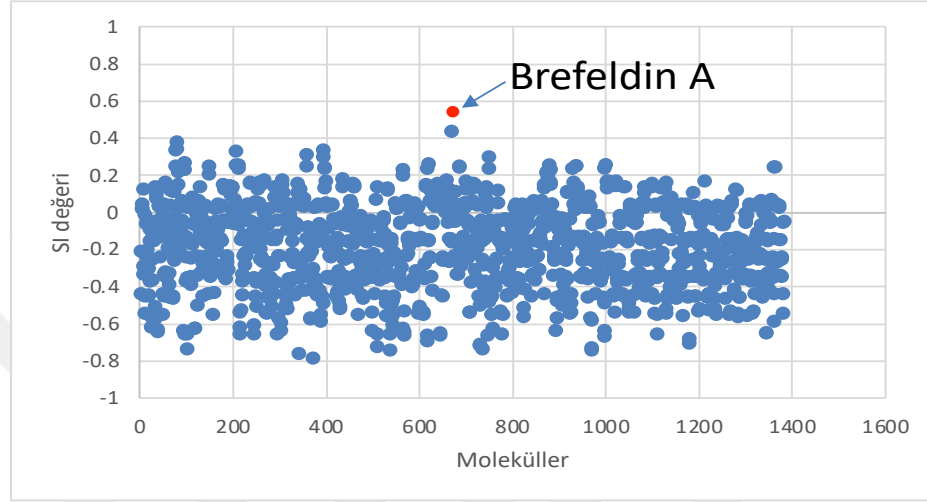
z-skor= -----
plakadaki tüm siRNA duplekslerinin standart sapması

formülü ile hesaplanmıştır. Deneyler üç biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Z-skoru >3 ve SI değeri ≥0.15 olan tarama hit' leri anlamlı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Tarama stratejisi Şekil 13'te özetlenmiştir.



Şekil 13. Küçük molekül tarama stratejisi

Sonuç olarak elde edilen hit seleksiyonu işleminden sonra Golgi stres indükleyici Brefeldin A AZD6738 ile kullanıldığında hücre ölümü indükleme potansiyeline sahip öncelikli molekül olarak tespit edilmiş olup bundan sonraki çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Örnek tarama sonucunda Brefeldin A öncelikli moleküler hit olarak belirlenmesi

3.2.2. Hücre kültürü

Tez çalışmasında SKOV3 ile IGROV1 over kanseri hücre hatları ve kontrol olarak insan over epitel hücresi (HOEC) kullanılmıştır. Hücreler Dana-Farber Kanser Enstitüsünden Prof. Dr. Anthony Letai' nin laboratuvarından (<https://www.dfhcc.harvard.edu/insider/member-detail/member/anthony-g-letai-md-phd/>) temin edilmiştir. Over kanseri hücreleri deney planında gereken formattaki hücre kültürü flasklarında RPMI1640, %10 'Fetal Bovine Serum' (FBS) ve 'Penisillin/Streptomisin' kullanılarak 37°C, %5 karbondioksit ortamında büyütülmüştür. Hücrelerin ilk pasaj sıvı nitrojen stokları çalışma için yeterli biçimde yapılmıştır.

3.2.2.1. Hücrelerin çözündürülmesi

'Freezing Medium' ile dondurulmuş olan *cryovialler* -80°C dolabından çıkarılarak, 37°C su banyosunda 1-2 dakika bekletilmiştir. Steril 15 ml Falcon tüpüne 4 ml RPMI1640 tam medyum eklenip, *cryovial* içerisindeki hücrelere yavaşça pipetaj yapılarak 15 ml'lik falcon tüpe aktarılmıştır. 15 ml'lik falcon tüp 3600 rpm'de 2 dakika santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant aspirasyon sistemi ile alınarak atılmıştır. Tüpün dip kısmında kalan pellet üzerine 2 ml

RPMI1640 eklenerek yavaşça pipetaj sonrası, 75'lik flask içerisine ekim yapılmıştır. 75'lik flask hücrelerin ekimi yapılmadan önce 14 ml RPMI eklenmiş olup, 2 ml hücrelerin ekimiyle toplam 16 ml olarak tamamlanmıştır. İnverted mikroskop (Leica / DMI1 10X büyütme) ile hücreler gözlenerek 37°C, %5 CO2 inkübatörüne yerleştirilmiştir.

3.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması

SKOV3, IGROV1 ve HOEC hücrelerinin çoğaltılması için inaktive edilmiş %10 *Fetal Bovine Serum* ve *Penisillin/Streptomisin* eklenmesiyle hazırlanan RPMI1640 kullanılmıştır. 37°C, %5'lik CO₂ inkübatörde haftada 2 kere medyum değiştirilmesiyle 75'lik flasklarda büyütülmeleri sağlanmıştır. Flasklar inverted mikroskop ile günlük olarak takip edilerek; hücre canlılığı, çoğalma ve kontaminasyon riski açısından değerlendirilmiştir. Hücreler ekilmiş oldukları flaskları kapladıklarında (%90 konfluensiye ulaştıktan sonra) %0.25 Tripsin-EDTA ile pasajlanmışlardır. Pasajlama sonrası yeterli sayıya ulaştıklarında ilaç uygulaması için 1 adet 75'lik flask' tan 4 adet 100 mm'lik dish olacak şekilde ekim yapılmıştır.

3.2.2.3. Hücrelere ilaç uygulanması

SKOV3, IGROV1 ve HOEC hücreleri için *CellTiter Glo* yöntemi ile AZD6738 EC₅₀ değerleri sırasıyla 0.45, 0.56 ve 10.07 olarak belirlenmiştir. 100 mm'lik dishlere alınan bu hücreler için uygulanacak ilaç miktarı hesaplanmıştır. Hücrelere sadece BFA, sadece AZD6738 ve kombine BFA+AZD6738 ilaç uygulamaları yapılarak; zamana bağımlı olacak şekilde 0.,4.,8.,16.,24. ve 48. saatlerde total protein izolasyonu yapılmış olup, immunblot değerlendirilmesi için -80°C dolapta muhafaza edilmişlerdir.

Hücre Hatları için her bir 10 ml medium içeren dish için 10 milimolar stoktan hazırlanacak AZD6738 hesaplaması;

10 milimolar stok AZD6738 1/10 DMSO ile yapılmıştır.

10 mM x ilaç dozu = 10 ml x 0,45 µM (SKOV3)

Her bir 100 mm'lik dish için 4,5 µl AZD6738 uygulanmıştır.

10 mM x ilaç dozu = 10 ml x 0,56 µM (IGROV1)

Her bir 100 mm'lik dish için 5,6 µl AZD6738 uygulanmıştır

Hücre Hatları için her bir 10 ml medium içeren dish için 40 milimolar stoktan hazırlanacak BFA hesaplaması;

40 milimolar stok BFA 1/100 DMSO ile yapılmıştır.

0,40 mM x ilaç dozu = 10 ml x 100 nM

Her bir 100 mm' lik dish için 2,5 µl BFA uygulanmıştır.

3.2.2.4. Hücrelerden total protein izolasyonu

100 mm'lik dishlere ekilmiş olan hücrelere zamana bağımlı ilaç uygulamaları yapıldıktan sonra, 4 adet 100 mm'lik dishden 1 adet 1,5 ml eppendorf tüpe aktarılacak şekilde protein izolasyonu planlanmıştır. 4 adet 100 mm'lik dishlerdeki hücrelerin RPMI'ları suction pipet ile çekilerek, hücrelerin 3ml +4°C PBS ile yıkaması yapılmıştır. Hücrelerin bulunduğu dishe 1 ml +4°C PBS eklenerek kazıyıcı (scraper) ile hücreler dishlerden toplanmış olup, 1,5 ml eppendorf tüpe aktarılmıştır. Eppendorf Minispinplus Santrifüj 13400 rpm de santrifüjleme işlemi sonrası üstte kalan süpernatant vacutener ile alınarak atılmıştır. Tüpün dip kısmında kalan pellet miktarına göre 1/3 olacak oranda 1% CHAPS buffer (50 µl pellet + 150 µl Chaps buffer) eklenerek homojen pipetaj yapılmıştır. Eppendorf soğutmalı santrifüjde +4°C 20 dakika bekleme sonrasında, 13400 rpm 10 dakika santrifüjleme işlemi yapılmış olup, süpernatant 1,5 ml eppendorf tüpe aktarılarak total protein izolasyonu tamamlanmıştır. Örnekler immunblot değerlendirilmesi için -80°C dolapta muhafaza edilmişlerdir.

3.2.3. İmmunblot analiz

3.2.3.1. Bradford yöntemi

Bradford yöntemi, total protein izolasyonu yapılan örneklerin SDS PAGE elektroforez işlemi öncesinde protein konsantrasyonunu belirlemek, jelin kuyucuklarında bulunan protein miktarını homojenize etmek ve proteinlerin nicelleştirilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bradford yönteminde, proteinlere bağlanabilen ve 465-595 nm dalga boyunda renk değişimine sebep olan 'Coomasie Brilliant Blue' boyası kullanılmaktadır.

Zamana bağlı ilaç uygulaması sonrası total protein izolasyonu yapılan örnekler +4°C' de beklemesi koşuluyla, her bir 1.5 ml eppendorf tüp içerisine; 2 µl protein + 498 µl Bradford reaktifi ve 1 tüpe de blank okuma için sadece Bradford reaktifi hazırlanmıştır. Örneklerden 96'lık plate 300 µl konularak, Biorad iMark Microplate Okuyucu cihazında 595 nm dalga boyunda okuma yaptırılmıştır. Sonuçlar blank okuma ile normalize edilmiştir.

Bradford Yöntemi Excel Hesaplama Tablosunda, 2 µl'deki protein miktarı cihaz sonuçları doğrultusunda hesaplanmıştır. Örneklerin 2 µl'deki protein miktarı hesaplaması yapıldıktan sonra, SDS-PAGE Elektroforez çalışması için 20 µg standart alınarak, her bir kuyucuk için protein miktarı µl olarak hesaplanmıştır.

3.2.3.2. İmmunblot yöntemi

İmmunblot yöntemi; Proteinlerin Membrana Aktarımı, Bloklama, Primer Antikor Uygulaması, Sekonder Antikor Uygulaması ve ECL görüntüleme olarak beş aşamadan oluşmaktadır. İmmunblot çalışmaları için PUMA, BCL-2, BCL-XL, BAX, BAK, MCL-1, BIM, NOXA ve Actin antikorları Cell Signalling firmasından sipariş edilmiştir. Membranlardaki protein sinyalleri Luminata Crescendo Western HRP kiti ve C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Germany) kullanılarak kemiluminesan modunda tespit edilmiştir

Bradford yöntemi ile belirlenen protein miktarı µl + 4 µl sample buffer karışımının, 95°C'de 1 dakika denatürasyonu yapılmıştır. SDS-PAGE yönteminde tankın içine jel miktarı kadar running buffer eklenerek; ilk kuyucuk PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, diğer kuyucuklara , protein+sample buffer olacak şekilde kuyucuklara protein yüklemesi yapılmıştır. Elektroforez 170V 40 dakika olarak yürütülmüş olup, protein örneklerinin seperating gel ve stacking gel kısımlarından ayrılması sağlanmıştır. Jelin membrana aktarımı aşamasında; jel, Whatmann kağıdı ve PVDF membran arasına yerleştirilerek, tank içerisine konulmuş olup, transfer buffer eklenmiştir. Elektroforez 240 MA 90 dakika olarak yürütülmüş olup, protein örneklerinin jelden membrana aktarımı yapılmıştır. Membrana aktarılan proteinler, uygulanacak olan antikorlarla aralarındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için 2 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde ve yağsız süttozunda blokaj işlemine tabi tutulmuştur. Blokaj işlemi sonrasında 3X5 dakika olacak şekilde PBS-Tween 20 karışımında yıkama yapılmıştır. Primer antikor 1/1000 sulandırma (dilasyon) oranında +4°C 16 saat, sekonder antikor 1/2000 dilasyon oranında +4°C 16 saat çalkalayıcı üzerinde işleme tabi tutulmuştur. Membran protein sinyalleri ECL Görüntüleme kiti kullanılarak C Digit Blot Scanner cihazında kemiluminesan yöntemiyle tespit edilmiştir.

3.2.4. RT-qPCR analiz

3.2.4.1. Hücre kültürü materyalinden total RNA izolasyonu

SKOV3 ve IGROV1 hücreleri 100 mm'lik hücre kültürü kaplarında büyütülmüştür. Hücreler 0-4-8-16-24-48 saat aralıklarında AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A ile muamele edilmiştir. mRNA düzeyinde gen ekspresyon seviyelerini qRT-PCR ile değerlendirmek üzere RNA RNeasy mini kit ile iki deney seti olacak şekilde RNA izole edilmiştir.

Total RNA izolasyonu için aşağıdaki protokol takip edilerek yapılmıştır;

1. 100 mm'lik dishlerde inkübe edilen hücrelerden mediumu aspire edildikten sonra, hücreler 2 kere 3 ml +4°C PBS ile yıkanıp, uzaklaştırılmıştır. Hücrelere 1 ml +4°C PBS eklenip, hücreler kazıyıcı (scraper) ile kazınarak toplanıp, pipetleme yapılarak 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. 1 dakika 13500 rpm de santrifüj yapıp, süpernatant atılmıştır.
2. 1,5 ml' lik steril eppendorf tüplerin dip kısmında kalan pelletin üzerine 350 µl Buffer RLT eklenip, pipetaj yapılarak pellet homojen hale getirilmiştir. Üzerine 350 µl %70'lik etil alkol eklenip, pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Toplam 700 µl'lik karışım 2 ml'lik toplama tüpüne takılan kolona aktarılmıştır. 15 saniye 13500 rpm'de santifüj yapılmıştır. Toplama tüpünde biriken sıvı lizat uzaklaştırılmıştır.
3. 700 µl RW1 Buffer eklenip, 15 saniye 13500 rpm'de santifüj yapılmıştır. Toplama tüpünde biriken sıvı lizat uzaklaştırılmıştır.
4. 500 µl RPE Buffer eklenip, 15 saniye 13500 rpm'de santifüj yapılmıştır. Toplama tüpünde biriken sıvı lizat uzaklaştırılmıştır.
5. 500 µl RPE Buffer eklenip, 15 saniye 13500 rpm'de santifüj yapılmıştır. Toplama tüpünde biriken sıvı lizat uzaklaştırılmıştır.
6. Kolon yeni 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilerek 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
7. Kolon 1,5 ml'lik toplama tüpüne alınarak, 50 µl *RNAase-free* su eklenip, 1 dakika 13500 rpm' de santrifüj yapılmıştır. İzole edilen total RNA, miktarının ölçümü ve RT-qPCR analizi için -80°C dolapta muhafaza edilmişlerdir.

3.2.4.2. RNA saflığının ve miktarının tayini

İzole edilen RNA'ların saflığının kontrolü 260/280 nm'deki absorbans oranı ile saptanmıştır. Spektrofotometre cihazı olarak NanoDrop 1000 Data Viewer yazılım programı kullanılmıştır. DNA ve protein kontaminasyonu taşımayan, iyi kalitede izole edilmiş RNA' da beklenen 260/280 nm absorbans oranı 1,8-2,1'dir. İzole edilen RNA'dan 2µl alınarak, nanodrop cihazında 260/280 nm absorbans ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonrası elde edilen veriler ile RT-PCR analizi için RNA miktarları hesaplanmıştır.

3.2.4.3. İzole edilen RNA'ların RT-PCR analizi

SKOV3 ve IGROV1 hücrelerinden izole edilen RNA örnekleri kullanılarak BCL-2 ailesinin tamamının mRNA seviyelerindeki değişimlerin takibi için RT-qPCR çalışması yapılmıştır. QuantiTect Primer Assay, Qiagen, BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX, BAK, NOXA, PUMA, BIM, BIK, BMF ve GAPDH primerleri kullanılmıştır. QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, Qiagen kullanılarak mRNA seviyesindeki değişimler tespit edilmiştir. Çalışma, steril PCR tüpleri kullanılarak buz üzerinde çalışılmıştır. Her tüp için template RNA -primer karışımı aşağıdaki tabloda verilen miktarlara göre hazırlanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. RT-qPCR Çalışma Döngüsü

İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Miks	25 µl	1x
Primer	5 µl	0.5 µM
QuantiTect RT Miks	0,5 µl	0.5 µM
Kalıp RNA	Değişken	500 ng/reaksiyon
RNaz-serbest su	Değişken	Son hacim 50 µl olacak şekilde ayarlanır
Toplam Reaksiyon Hacim	50 µl	

QuantiTect Probe RT-PCR Handbook, Protocol: Real-Time One-Step RT-PCR Using Applied Biosystems® Cyclers and Other Cyclers

LightCycler 480 II Roche cihazında 50 °C'de 30 dakika reverse transkripsiyon , 95 °C'de 15 dakika PCR başlama aktivasyon basamağı sonrası 94 °C'de 15 saniye denatürasyon , 50-60°C' de 30 saniye, 72°C' de 30 saniye 35-45 döngü yapılmış olup, PCR 72 °C' de bitirilmiştir.

3.2.5. Apoptotik hücre ölüm analizi

3.2.5.1. Annexin V/PI testi

SKOV3, IGROV1 ve HOEC hücreleri 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarında büyütülmüştür. Hücreler 0-4-8-16-24-48 saat aralıklarında AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A ile muamele edilmiştir. Apoptotik hücre ölümü analizi Annexin V/PI (BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I) kiti kullanılarak, FACSCanto II akış sitometrisinde 1 biyolojik tekrar, 3 teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.2. Kaspaz -3 ve -9 aktivasyon testi

SKOV3, IGROV1 ve HOEC hücreleri luminometrik kaspaz3 ve kaspaz 9 aktivasyonlarını değerlendirmek için 96-kuyucuklu beyaz opak hücre kültürü plakalarında büyütülmüştür. Hücreler 0-4-8-16-24-48 saat aralıklarında AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A ile muamele edilmiştir. Hücreler santrifüj ile toplanarak, PBS ile yıkanmıştır. Hücreler snap frozen edilerek kuru buza alınmıştır. NYU Langone'da kaspaz-3 ve kaspaz-9 analizi aktivasyon analizi yapılmak üzere kargolanmıştır (FedEx No:780766207925) The Pirbright Institute, Ashroad Pirbright Woking, GU24 0NI UK +44(0)1483232441). Kaspaz-3 (Caspase-Glo 3/7 Assay, Promega) ve kaspaz-9 (Caspase-Glo 9 assay, Promega) aktivasyon deneyleri 1 biyolojik tekrar, 3 teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar GraphPad yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.2.5.3. Sitokrom c salınım testi

SKOV3 ve IGROV1 hücreleri 100 mm hücre kültürü kapları içerisinde büyütülmüştür. 48 saat boyunca AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A ile muamele edildikten sonra sitoplazmaya sitokrom c salınımını analiz etmek için sitoplazmik ve mitokondriyal hücre fraksiyonları ayrıştırılmıştır. Sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonlarda sitokrom c ve COXIV seviyeleri immunblot ile tespit edilmiştir. Membranlardaki protein sinyalleri Luminata

Crescendo Western HRP kiti ve C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Germany) kullanılarak kemiluminesan modunda tespit edilmiştir.

3.2.5.4. BAX/BAK aktivasyon testi

SKOV3 ve IGROV1 hücreleri 36 saat süresince AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A ile muamele edilmiştir. BAX ve BAK aktivasyonlarını immünopresipitasyon ile değerlendirmek üzere total protein %1 CHAPS tamponu ile izole edilmiştir. Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonlarının belirlenmesinin takiben her bir örnek için 1.2 mg total protein 5 mikrogram BAX (6A7) ve BAK (NT) antikorları ile +4°C'de 16 saat immünopresipitasyona tabi tutulmuştur. Sonrasında immünopresipitatlar %10'luk SDS-PAGE ile ayrılmış, PVDF membrana geçirilmiştir. Membranlar 5% yağsız süt tozu tamponunda oda sıcaklığında 2 saat bloklanmış, +4°C'de 16 saat 1/1000 BAX (D2E11) ve BAK (D4E4) antikorları ve 16 saat 1/2000 tavşan sekonder HRP antikoruna ile muamele edilmiştir. Membranlardaki protein sinyalleri Luminata Crescendo Western HRP kiti ve C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Germany) kullanılarak kemiluminesan modunda tespit edilmiştir.

3.2.6. 3D Algimatrix sferoid kültürleri

SKOV3 ve IGROV1 over kanseri hücre hatları kullanılarak 3-boyutlu onkosferoid kültürleri 3D Algimatrix sisteminde oluşturulmuştur. Hücreler Algimatrix 3D büyütme sistemine aktararak, sferoidlerin büyümesi sırasında her 24 saatte bir tekrardan büyüme medyumunu yenilenmiştir. Sferoidler yaklaşık 12 ila 16 gün içerisinde morfolojik olarak büyümelerini tamamladıktan sonra AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738/Brefeldin A ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir ve hücre ölümü cevabı CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay testi ile takip edilmiştir. Molekül uygulamalarından önce Algimatrix 3D platformunda büyütülen tümör sferoidleri Hoechst 33342 ile boyanmış, sferoid morfolojileri EvosFluor dijital mikroskopi sistemi ile görüntülenmiştir. Eşzamanlı olarak kontrol ve muamele görmüş onkosferoidler Algimatrix ağı yapısından (skafoldundan) Algimatrix çözündürme/ayırıştırma solüsyonu kullanılarak izole edilmiştir. Örnekler apoptotik hücre ölümünü takip etmek için aktif/kesilmiş kaspaz-3, aktif/kesilmiş kaspaz-9 ve kesilmiş PARP immüno blot analizlerinde kullanılmak üzere %1 CHAPS tamponu kullanılarak protein izole edilmiştir. Total protein

miktarı Bradford yöntemi ile kantifiye edildikten sonra SDS-PAGE ile ayrılarak, PVDF membrana geçirilerek ve immunoblot yöntemi ile primer (kesilmiş PARP, kesilmiş kaspaz-3 ve kesilmiş kaspaz-9) ve HRP ile işaretli sekonder antikorlar kullanılarak işaretleme yapılmış, ECL sistemi ile değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir. İmmunoblotlarda aktin yükleme kontrolü olarak problemlenmiştir.

3.2.7. Golgi kompleksi stres

3.2.7.1. GM130 immunfloresan görüntüleme

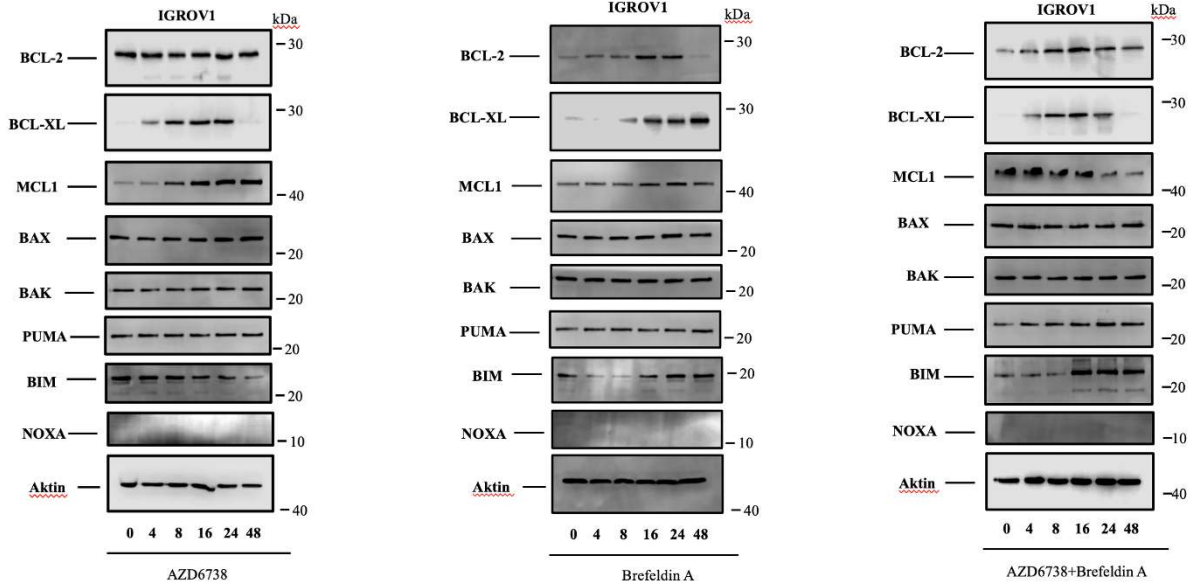
SKOV3 hücrelerinde Golgi stresi GM130 immünofloresan boyama ile belirlenmiştir. Hücreler steril lameller üzerinde 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarında büyütülmüştür. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra hücreler 4% (v/v) PFA ile 10 dakika fikse edilip, sonrasında tekrardan 1 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler 0.05% Triton100-X ile permeabilize edildikten sonra beş dakika PBS ile yıkanmış olup, sonrasında %0.1 BSA ile oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bloke edilmiştir. GM130 Alexa Fluor 488 antikor (1/300, BD Biosciences, Cat no:560257) ile karanlık ortamda 100 nM Brefeldin A ile 4 saat inkübasyonu takiben hücreler ProLong SlowFade kullanılarak cam slaytlar üzerine gömülerek görüntüleme için hazırlanmıştır. Zeiss mikroskopta 40X görüntüleme yapılmıştır.

3.3. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 6.2 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *P < 0.05, **P < 0.01 ve ***P<0.001 Student's t-test analizi için anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel görüntü analizlerinde Adobe Photoshop yazılımı kullanılmıştır.

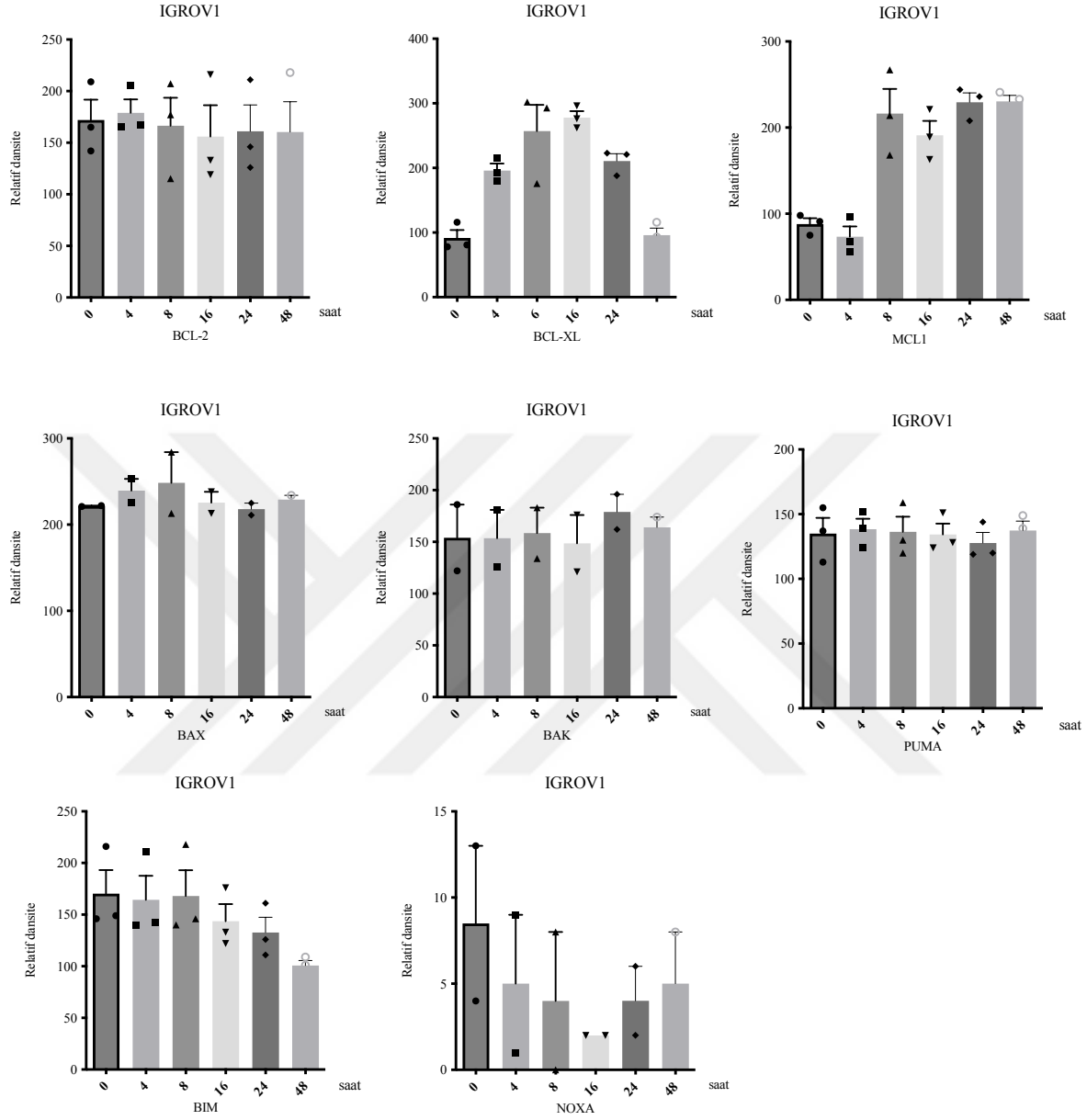
4. BULGULAR

4.1. BCL-2 Ailesi Immunblot Bulgular

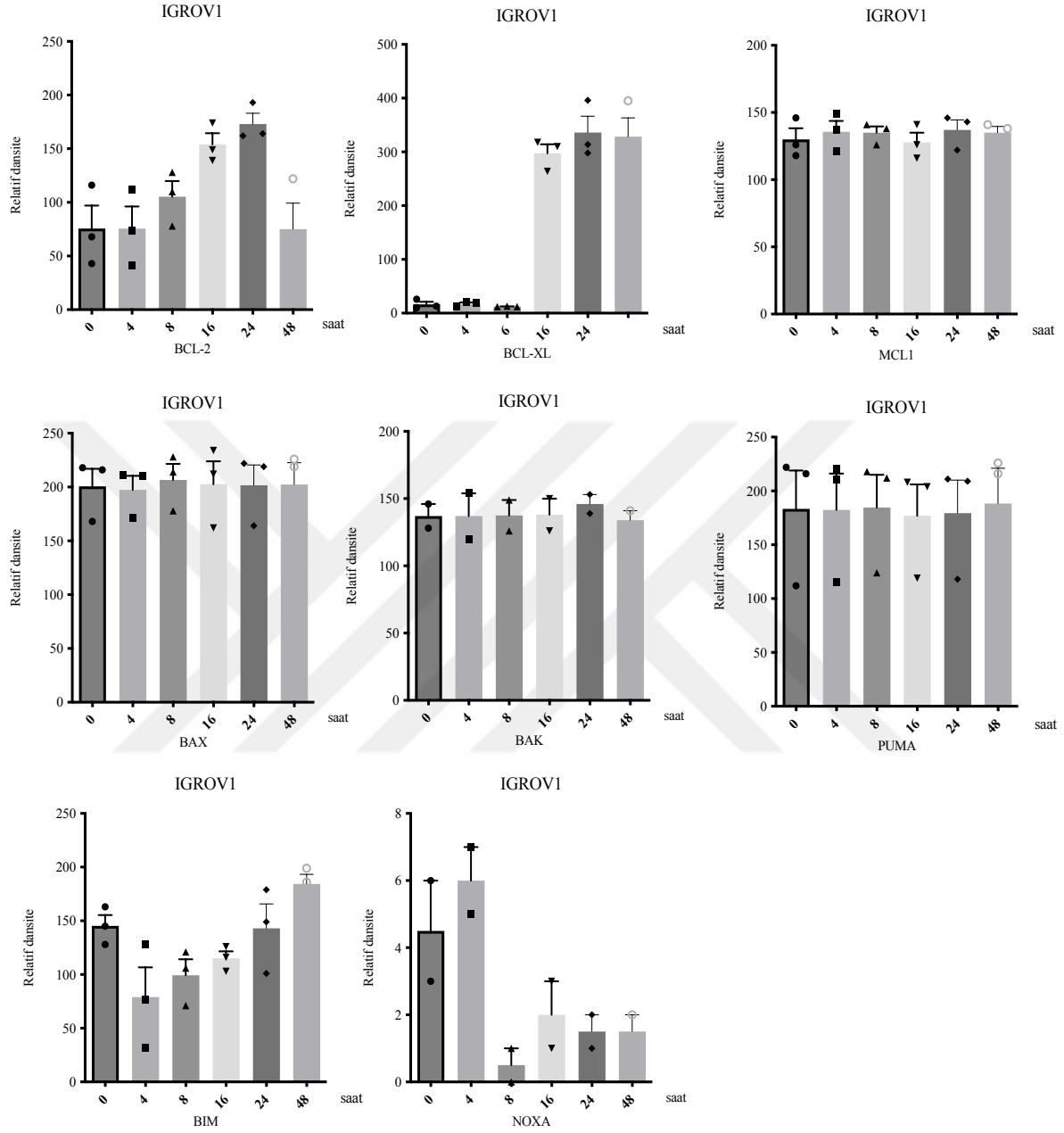


Şekil 15. IGROV1 Hücre Hattı BCL-2 Protein seviyeleri.

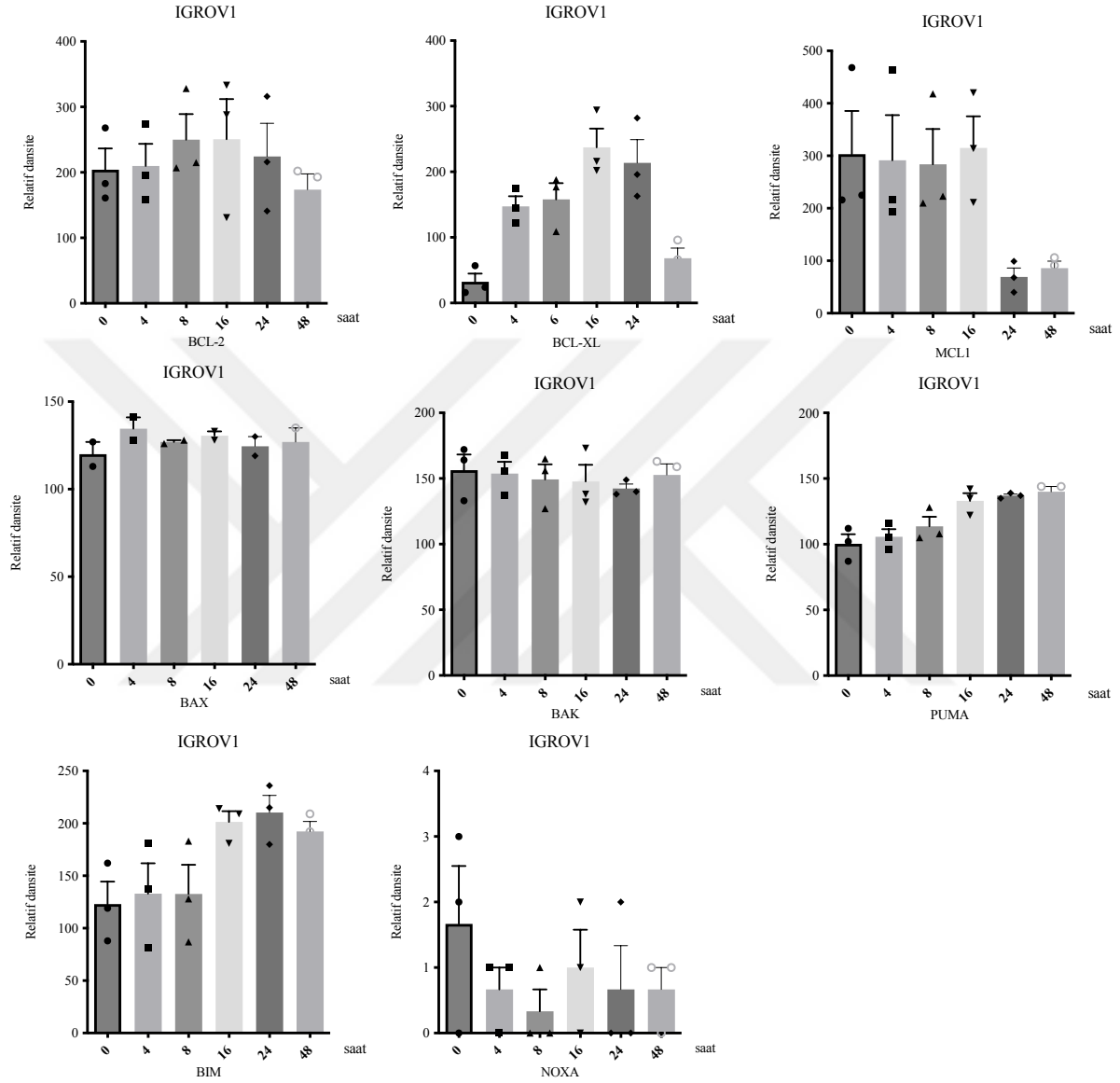
IGROV1 hücrelerinde AZD6738 öncelikli olarak BCL-XL seviyelerini bifazik olarak etkilerken zamana bağlı olarak MCL-1 seviyelerinde de artış gözlemlenmiştir. Yine özellikle 48. saatte BIM protein seviyelerinde düşüş belirlenmiştir. Bu bulgular IGROV1 hücrelerinin AZD6738'e bağlı hücresel strese karşı antiapoptotik yolları aktive ettiğine işaret etmektedir. Brefeldin A uygulaması da BCL-2 ve BCL-XL seviyelerinde progresif bir artışa neden olurken MCL1 seviyelerinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. BIM protein seviyelerinde 4. ve 8. saatlerde görülen düşüş sonrasında BIM'in bazal seviyelerine geri dönmesi ile sonuçlanmıştır. IGROV1 hücrelerinde AZD6738+Brefeldin A kombine uygulaması BCL-2 seviyelerinde özellikle 8. ve 16. artışa neden olurken 48. saatte BCL-2 seviyeleri tespit edilemeyecek düzeye düşmüştür. IGROV1 hücrelerinde AZD6738+Brefeldin A uygulaması MCL1 seviyelerinde 24. ve 48. saatlerde azalmaya neden olurken, antiapoptotik proteinlerdeki bu düşümlere paralel olarak artan BIM ve PUMA protein seviyeleri apoptotik sinyal ileti sisteminin aktivasyonunu sağlamıştır.



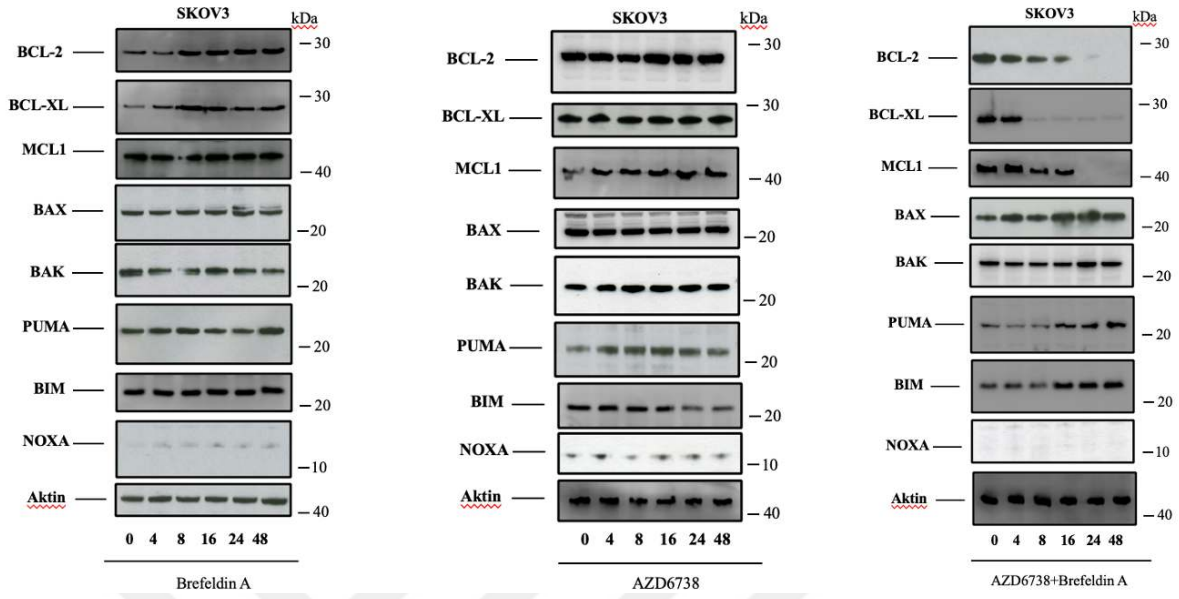
Şekil 16. IGROV1 Hücre Hattı AZD6738 Cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi (İstatiksel görüntü analizinde Adobe Photoshop yazılımı kullanılmıştır).



Şekil 17. IGROV1 Hücre Hattı BFA Cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi (İstatiksel görüntü analizinde Adobe Photoshop yazılımı kullanılmıştır).

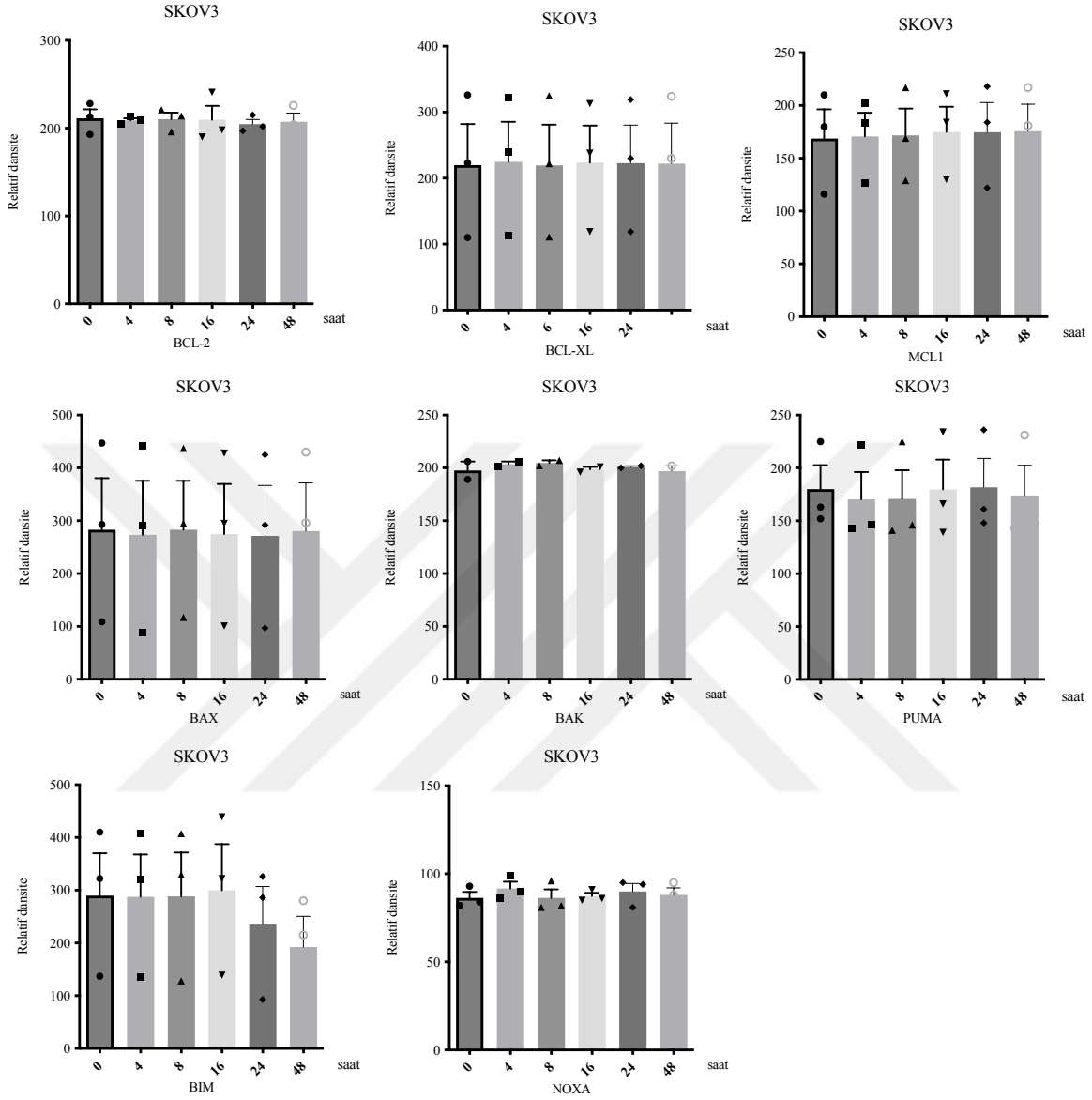


Şekil 18. IGROV1 Hücre Hattı AZD6738 ve BFA cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi (İstatiksel görüntü analizinde Adobe Photoshop yazılımı kullanılmıştır).

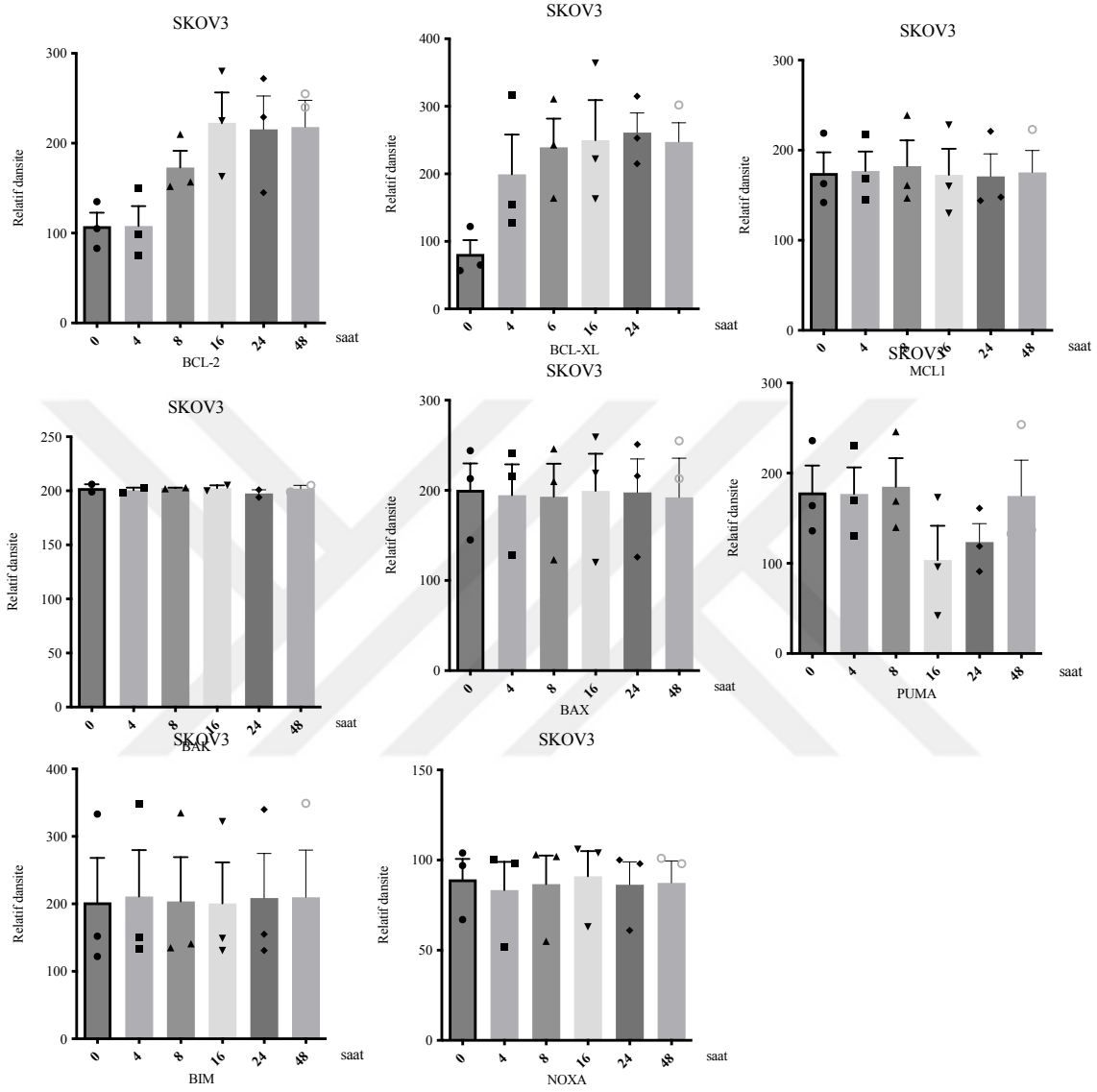


Şekil 19. SKOV3 Hücre Hattı BCL-2 Protein seviyeleri.

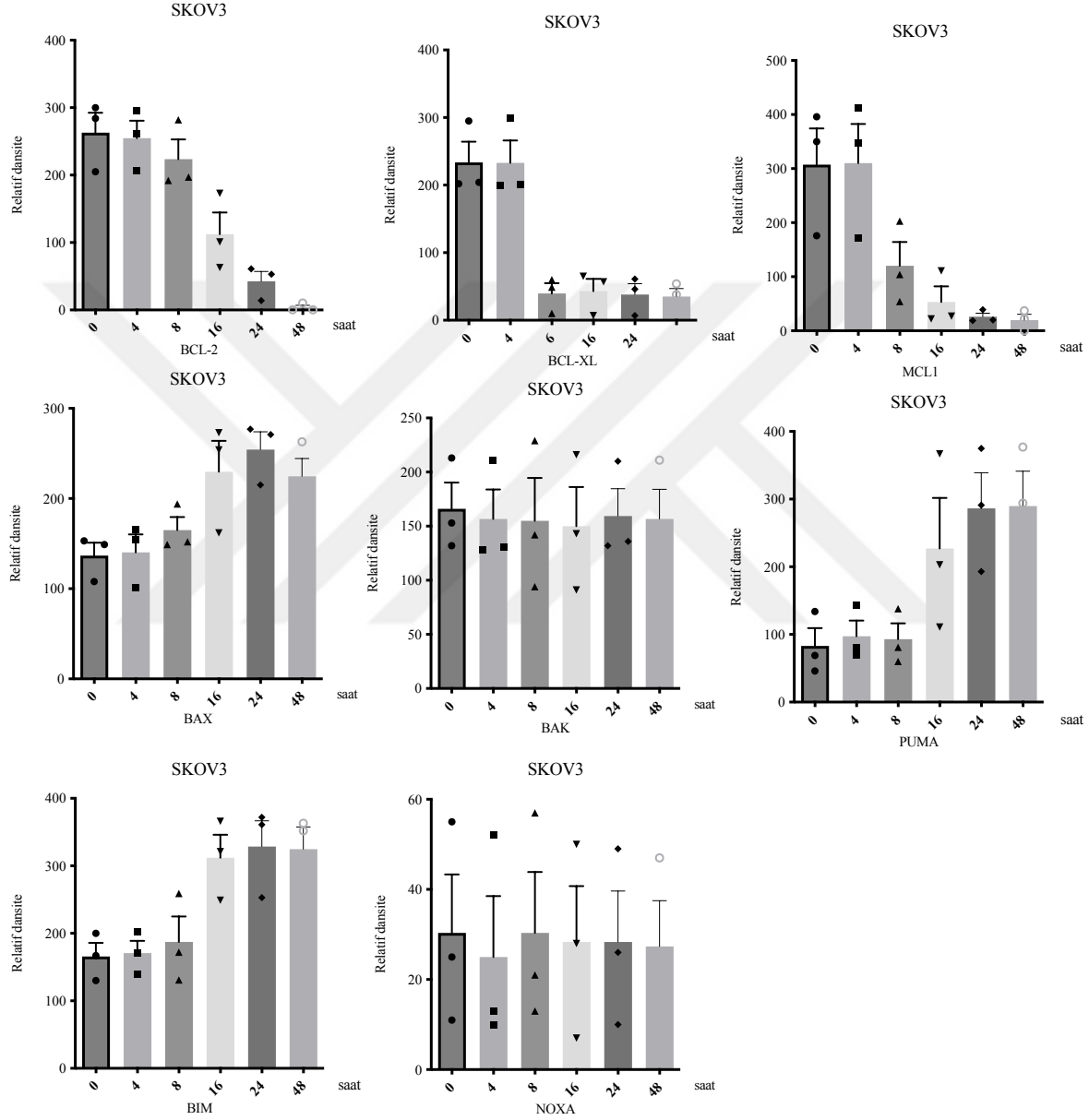
SKOV3 hücrelerinde ise AZD6738 antiapoptotik BCL-2, BCL-XL ve MCL-1 seviyelerinde majör bir değişikliğe neden olmazken, BIM seviyelerinde 24. ve 48. saatlerde belirgin hale bir düşüşe yol açmıştır. PUMA seviyelerinde 8. ve 16. saatlerde görülen artış ise 24. ve 48. saatlerde bazal seviyelerine dönmüştür. SKOV3 hücrelerinde Brefeldin A uygulaması progresif olarak 48. saate kadar artan BCL-2 ve BCL-XL seviyelerine yol açarken MCL1 seviyelerinde bir değişiklik görülmemiştir. PUMA seviyelerinde ise 16. ve 24. saatlerde görülen düşüş 48. saatte bazal seviyesine dönmüştür. SKOV3 hücrelerinde AZD6738+Brefeldin A uygulaması BCL-2, BCL-XL ve MCL1 antiapoptotik proteinlerinde şiddetli seviye azalmasına neden olurken eşzamanlı olarak proapoptotik BIM, PUMA ve BAX protein seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu protein ifadelene seviyeleri görülen apoptotik cevapla uyumludur.



Şekil 20. SKOV3 Hücre Hattı AZD6738 cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi (İstatiksel görüntü analizinde Adobe Photoshop yazılımı kullanılmıştır).



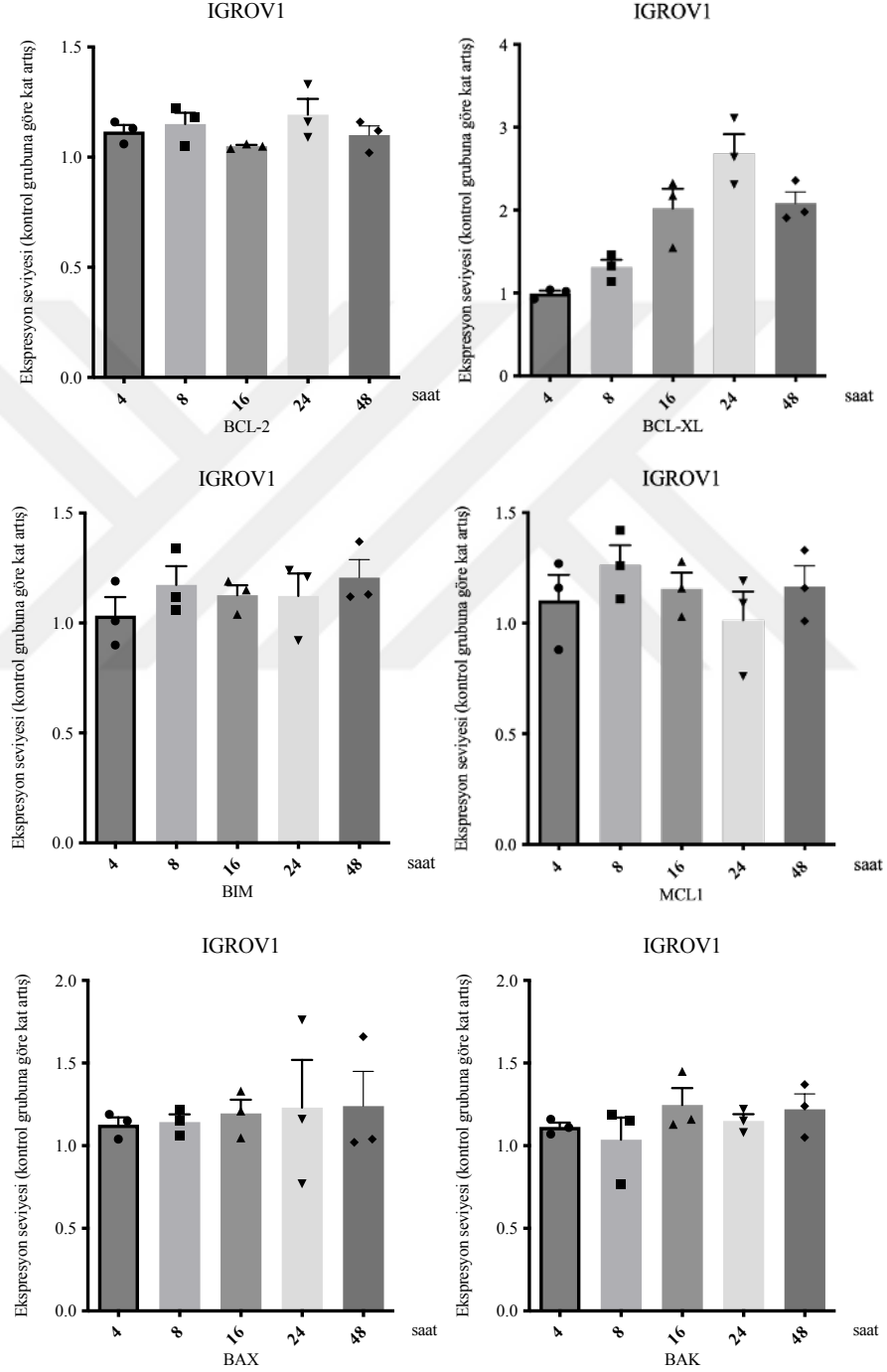
Şekil 21. SKOV3 Hücre Hattı BFA cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Dansitometrik Analizi (İstatiksel görüntü analizinde Adobe Photoshop yazılımı kullanılmıştır).

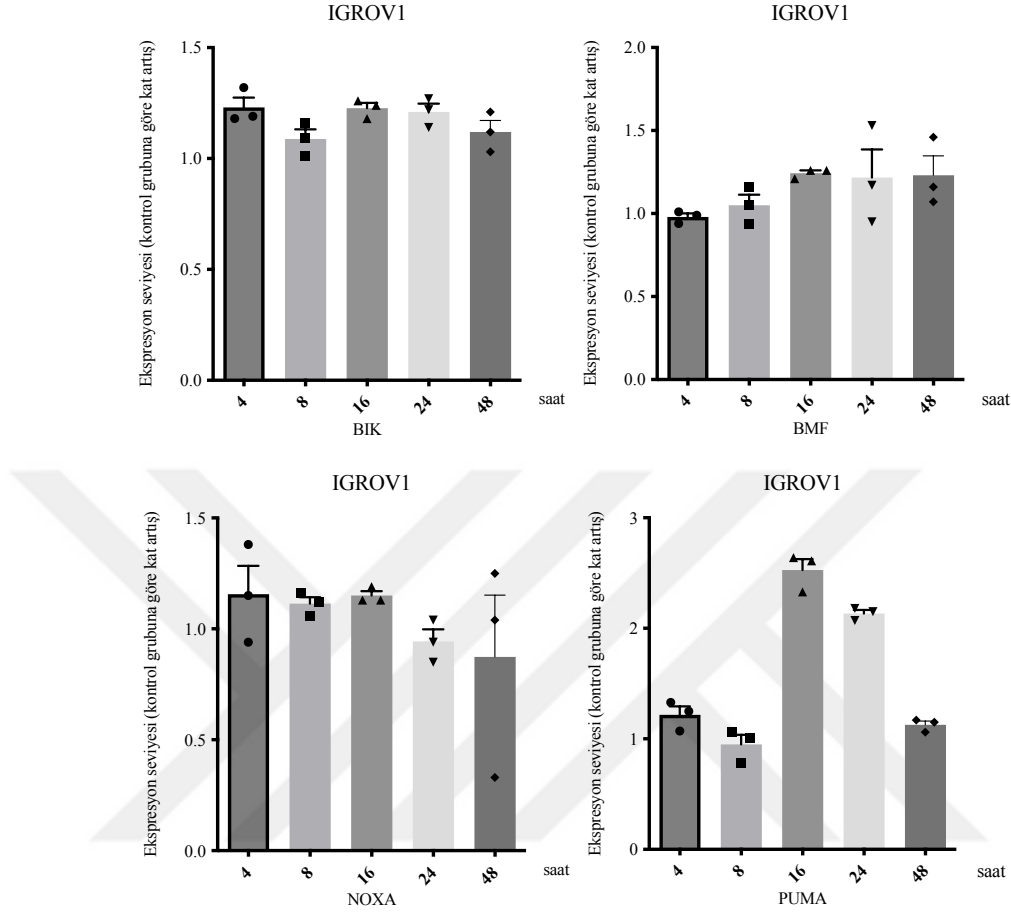


Şekil 22. SKOV3 Hücre Hattı AZD6738 ve BFA cevaben BCL-2 Protein seviyeleri Densitometrik Analizi (İstatiksel görüntü analizinde Adobe Photoshop yazılımı kullanılmıştır).

4.2. RT-PCR Analiz Bulguları

4.2.1. IGROV1 hücrelerinde AZD6738 uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları

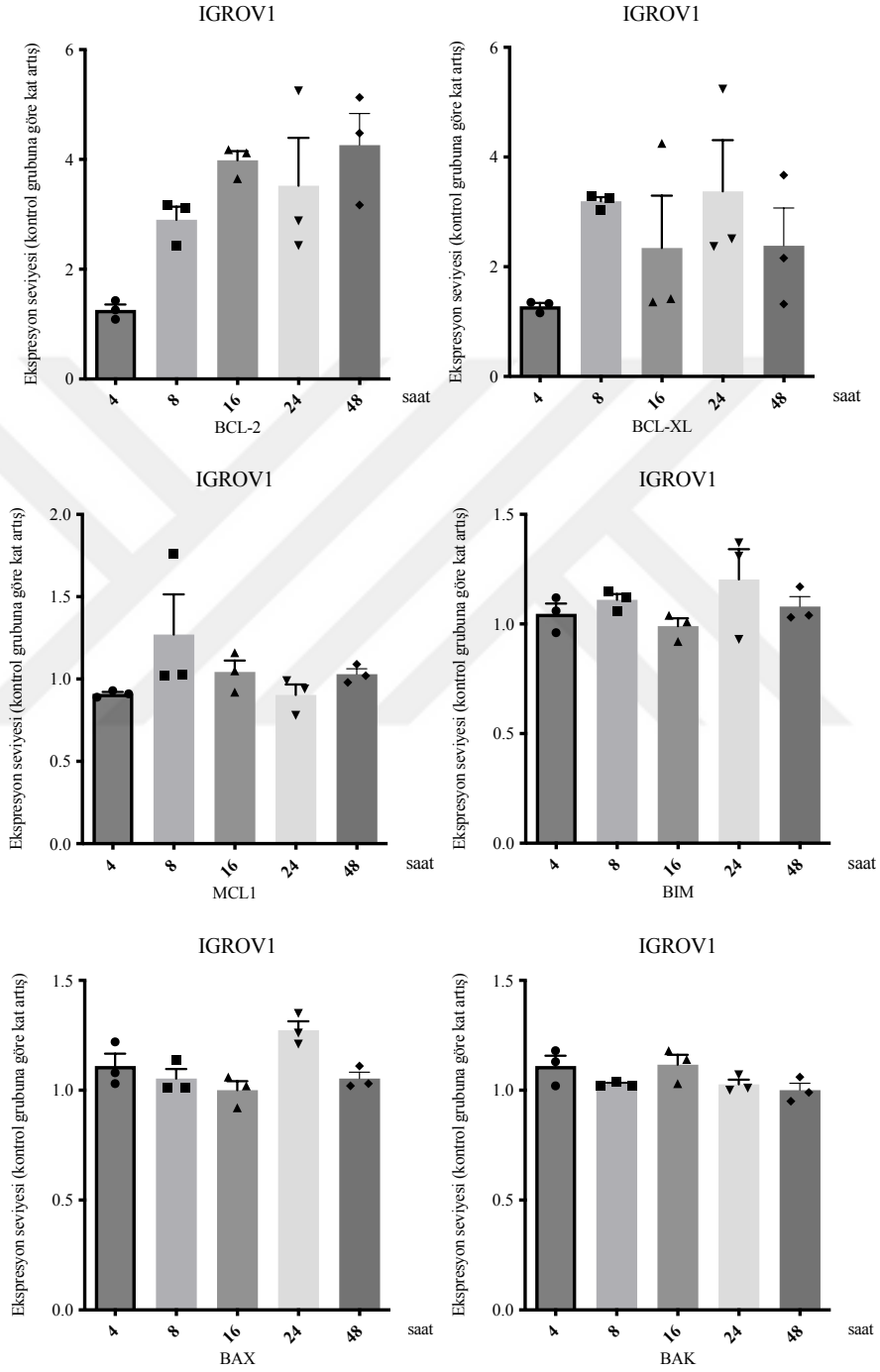


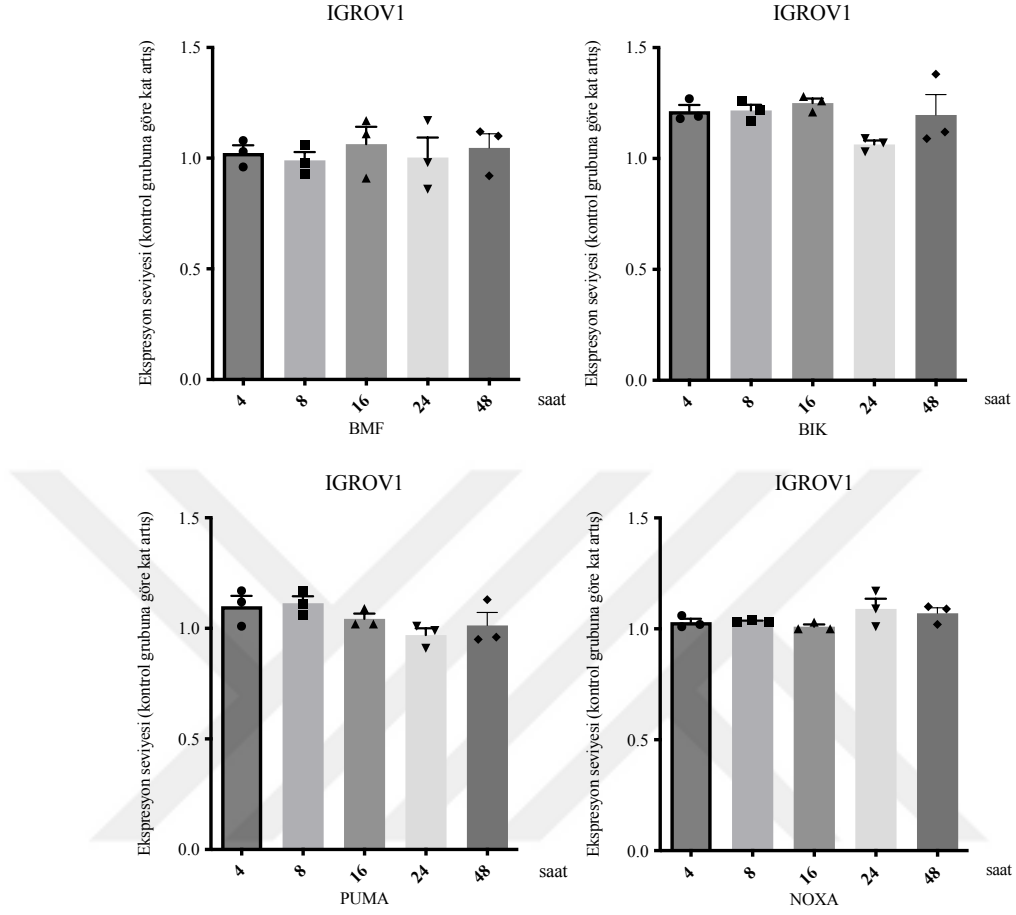


Şekil 23. IGROV1 AZD6738 cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu.

IGROV1 hücrelerinde 0-48 saat arası AZD6738 uygulaması sonrasında BCL-2 protein ailesinin mRNA ekspresyon seviyelerini qPZR yöntemi ile değerlendirilmiştir. BCL-2, MCL1, BIM, BAX, BAK, BIK, BMF ve NOXA seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. BCL-XL mRNA seviyesinin 8. saatten itibaren progresif olarak 24. saate kadar yükselirken 48. saatte bir miktar düşüş gösterdiğini belirlenmiştir (Şekil 23). PUMA mRNA seviyeleri ise 8. saatte bir miktar düşüşü 16. ve 24. saatte artış takip ederken PUMA mRNA seviyeleri 48. saatte tekrardan bazal seviyesine dönmüştür.

4.2.2. IGROV1 hücrelerinde BFA uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları

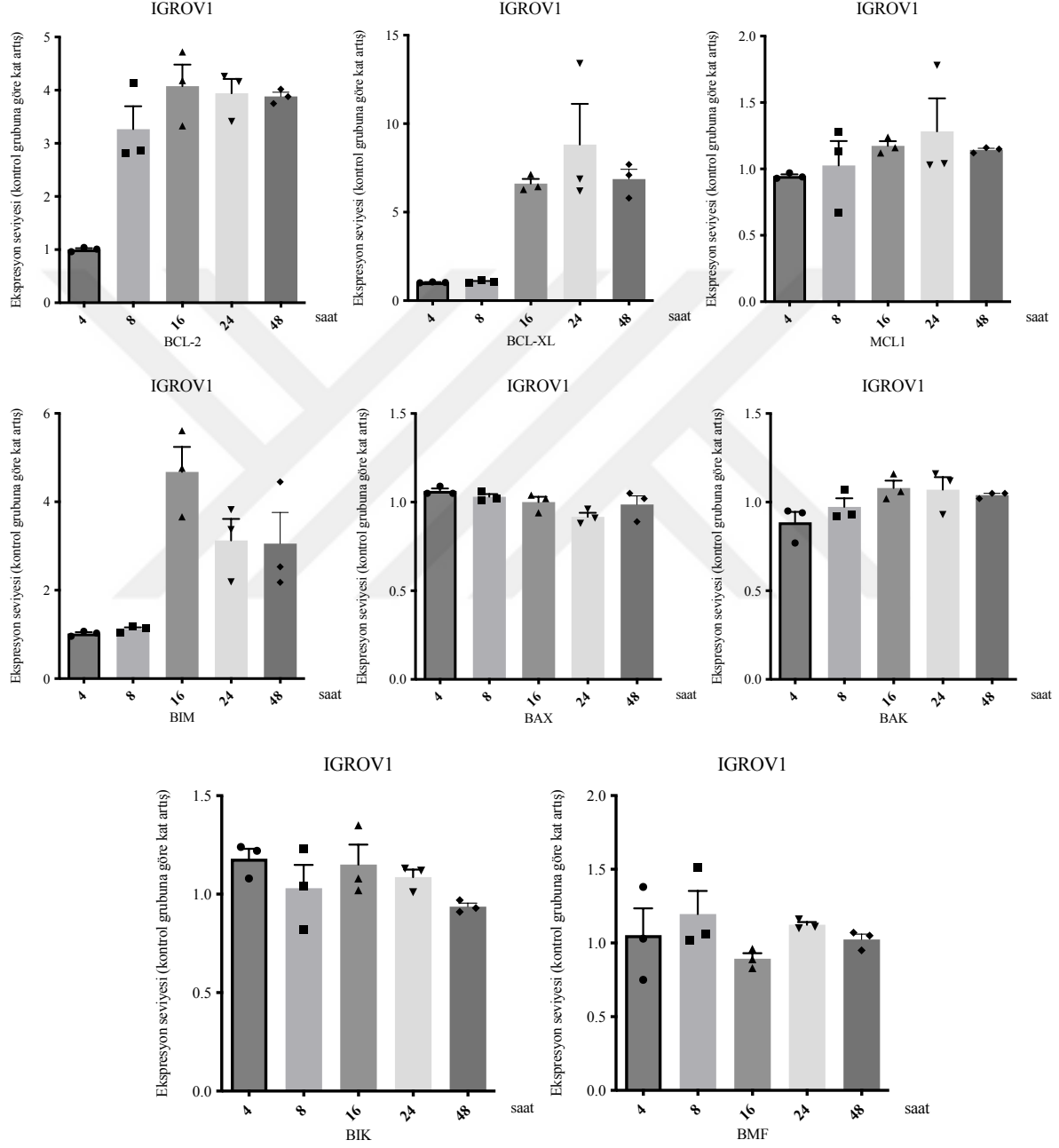


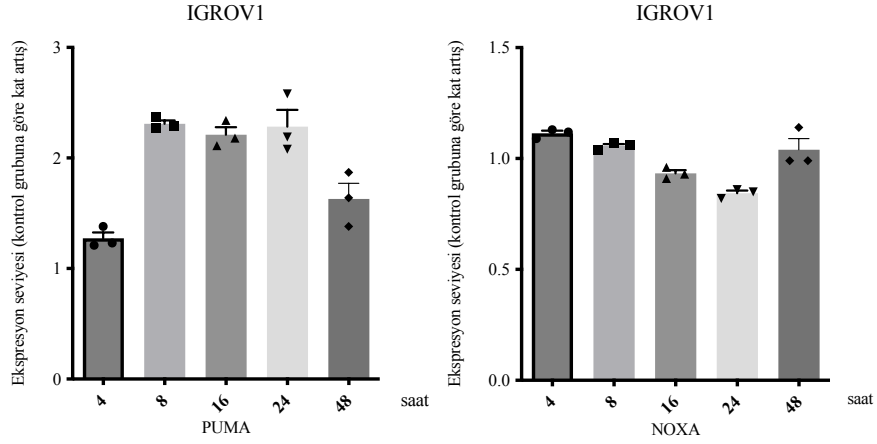


Şekil 24. IGROV1 BFA cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu.

IGROV1 hücrelerinin 0-48 saat aralığında Brefeldin A uygulamasından sonra BCL-2 protein ailesinin mRNA seviyelerini qPCR ile değerlendirilmiştir. BIM, BAX, BAK, BIK, BMF, PUMA ve NOXA mRNA seviyelerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. BCL-2 ve BCL-XL seviyeleri 8. saatten itibaren artış gösterirken bu artış 48. saate kadar devam etmiştir. MCL1 mRNA seviyesinde ise 8. saatte görülen artışın devamında bazal seviyede ekspresyona döndüğünü belirlenmiştir.

4.2.3. IGROV1 hücrelerinde AZD6738+BFA uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları

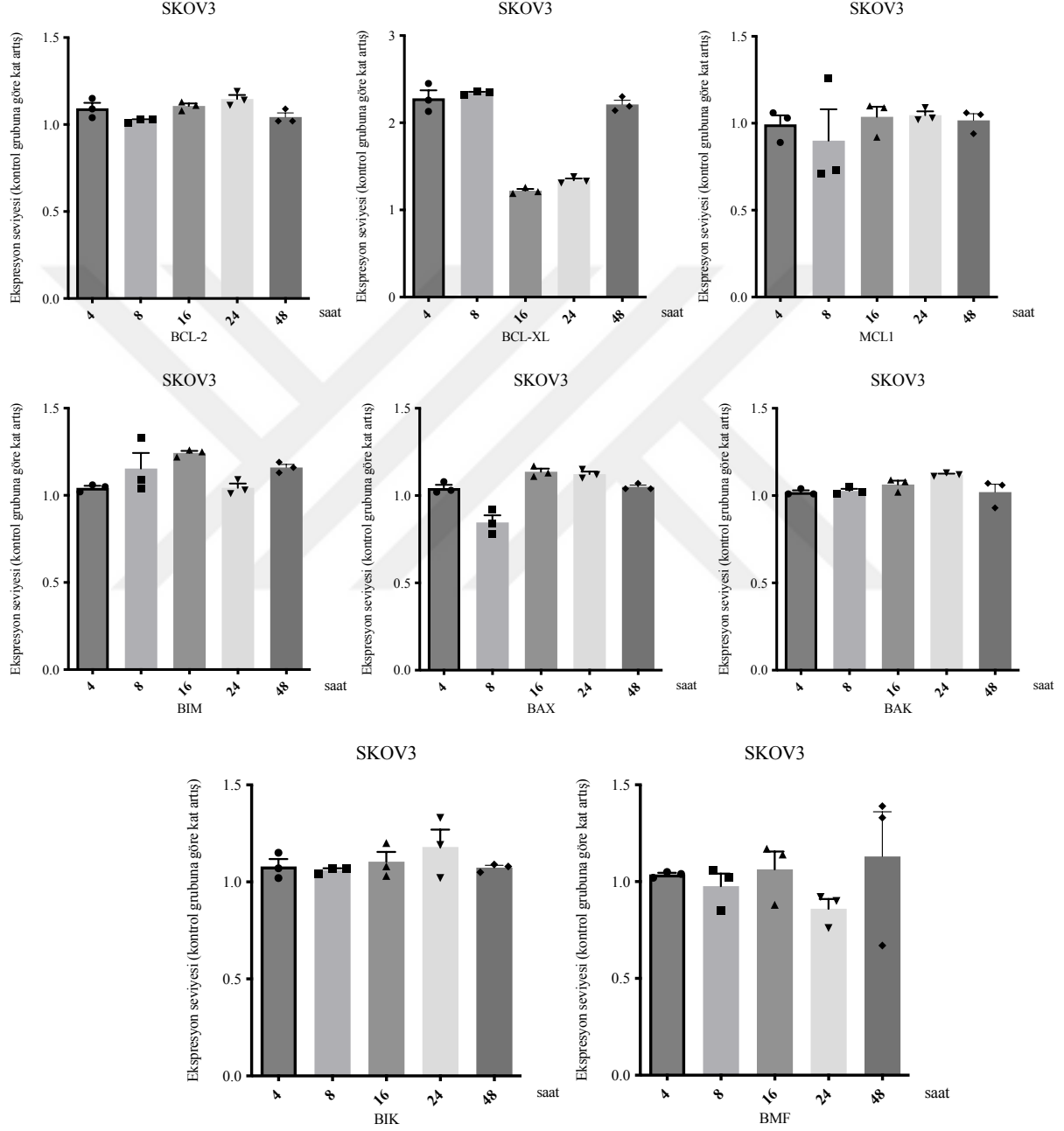


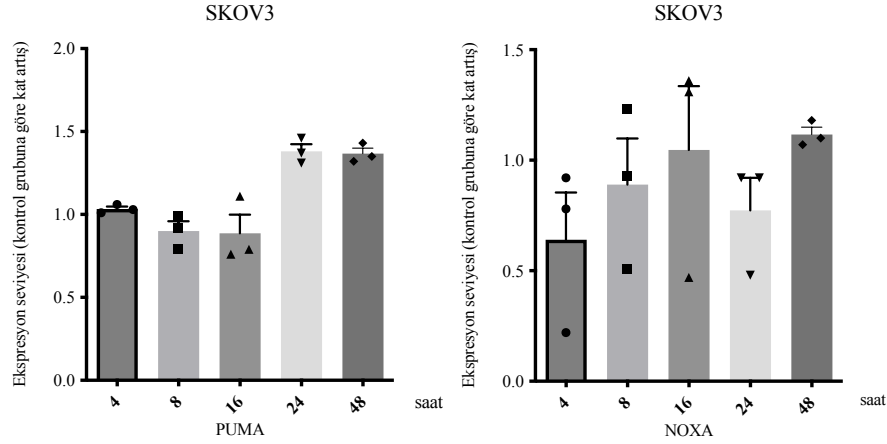


Şekil 25. IGROV1 AZD6738+BFA cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu.

IGROV1 hücrelerinde 0-48 saat aralığındaki AZD6738+Brefeldin A uygulamasını takiben BCL-2 protein ailesi mRNA seviyelerini qPCR ile değerlendirilmiştir. BAX, BAK, BIK ve NOXA seviyelerinde anlamlı bir değişiklik belirlenememiştir. BCL-2 seviyeleri 8. saatten itibaren artış gösterirken bu artışın 48. saate kadar devam ettiğini belirlenmiştir. BCL-XL mRNA düzeyi 16. saat itibariyle artış gösterirken bu artışın 48. saate kadar sürdüğünü tespit edilmiştir. MCL1 mRNA seviyesinde ise kısıtlı miktardaki artış 48. saat sonuna kadar devam etmiştir. En önemli bulgu olarak proapoptotik BIM seviyeleri 16. saatte dramatik yükseliş göstermektedir. Diğer proapoptotik PUMA mRNA düzeyleri de 8. saatten itibaren artışa geçerken bu artış inkübasyon süresinin sonuna kadar sürmüştür.

4.2.4. SKOV3 hücrelerinde AZD6738 uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları

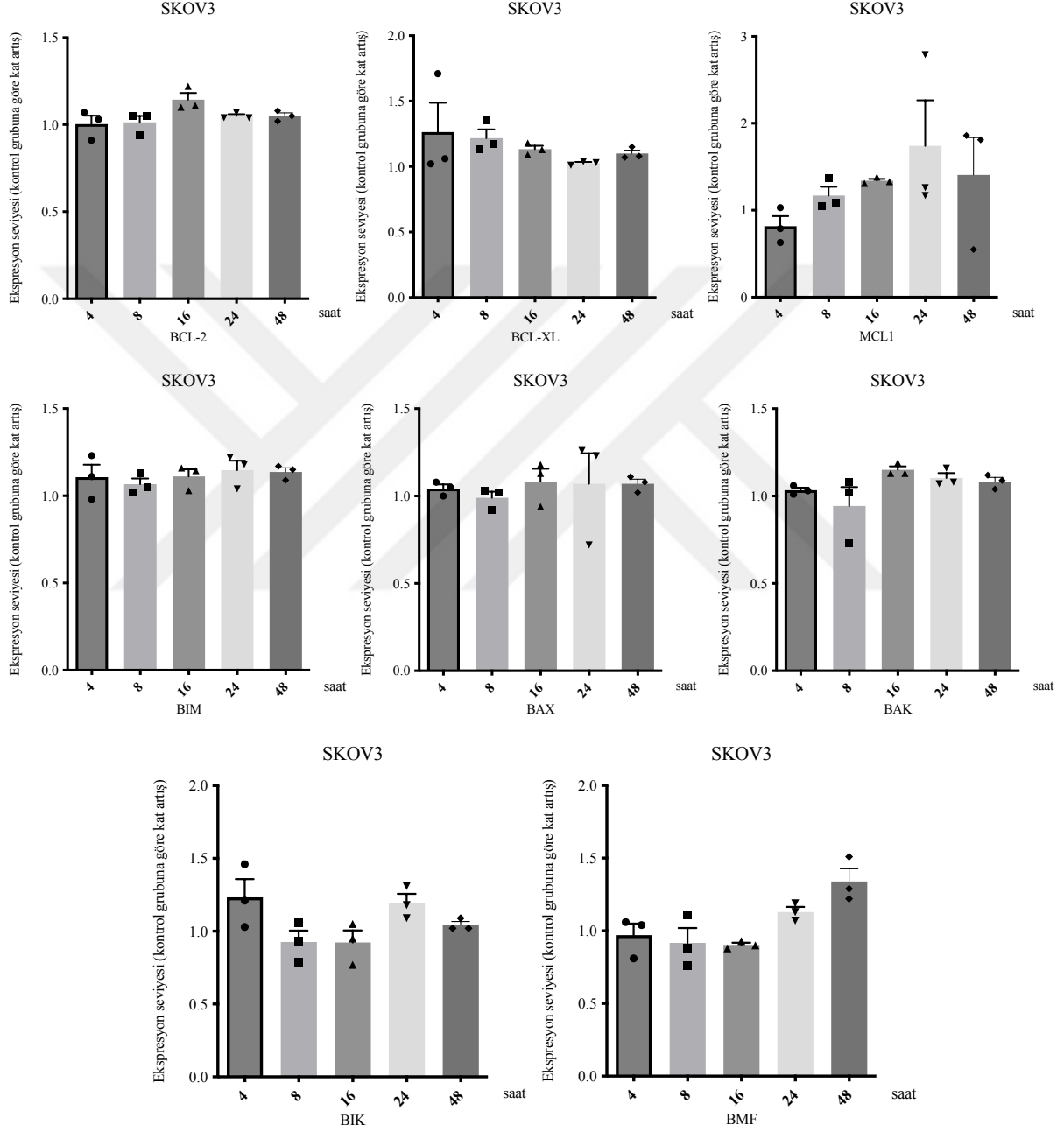


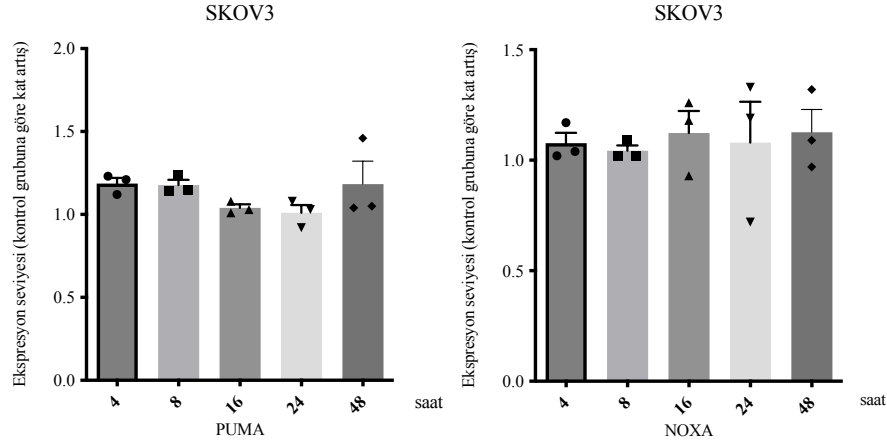


Şekil 26. SKOV3 AZD6738 cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu.

0-48 saat aralığında AZD6738 uygulaması sonrasında SKOV3 hücrelerinde BCL-2 protein ailesi üyelerinin mRNA seviyelerini qPCR ile değerlendirilmiştir. Şekil 26’da görüldüğü üzere BCL-2, MCL-1, BIM, BAK, BIK ve BMF mRNA ekspresyon seviyelerinde herhangi bir değişim görülmemiştir. BCL-XL seviyelerinde 4. ve 8. saatlerde artış, 16. ve 24. saatlerde düşüş ve yine 48. saatte artış gözlemlenmiştir. BAX seviyesinde ise 8. saatte düşüş, ancak sonrasında bazal ekspresyon seviyesine yakın ekspresyon takip edilmiştir. PUMA düzeyleri 24. ve 48. saatlerde artış gösterirken, NOXA ekspresyonu birçok nedene bağlı olarak düşüş göstermiştir.

4.2.5. SKOV3 hücrelerinde BFA uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları

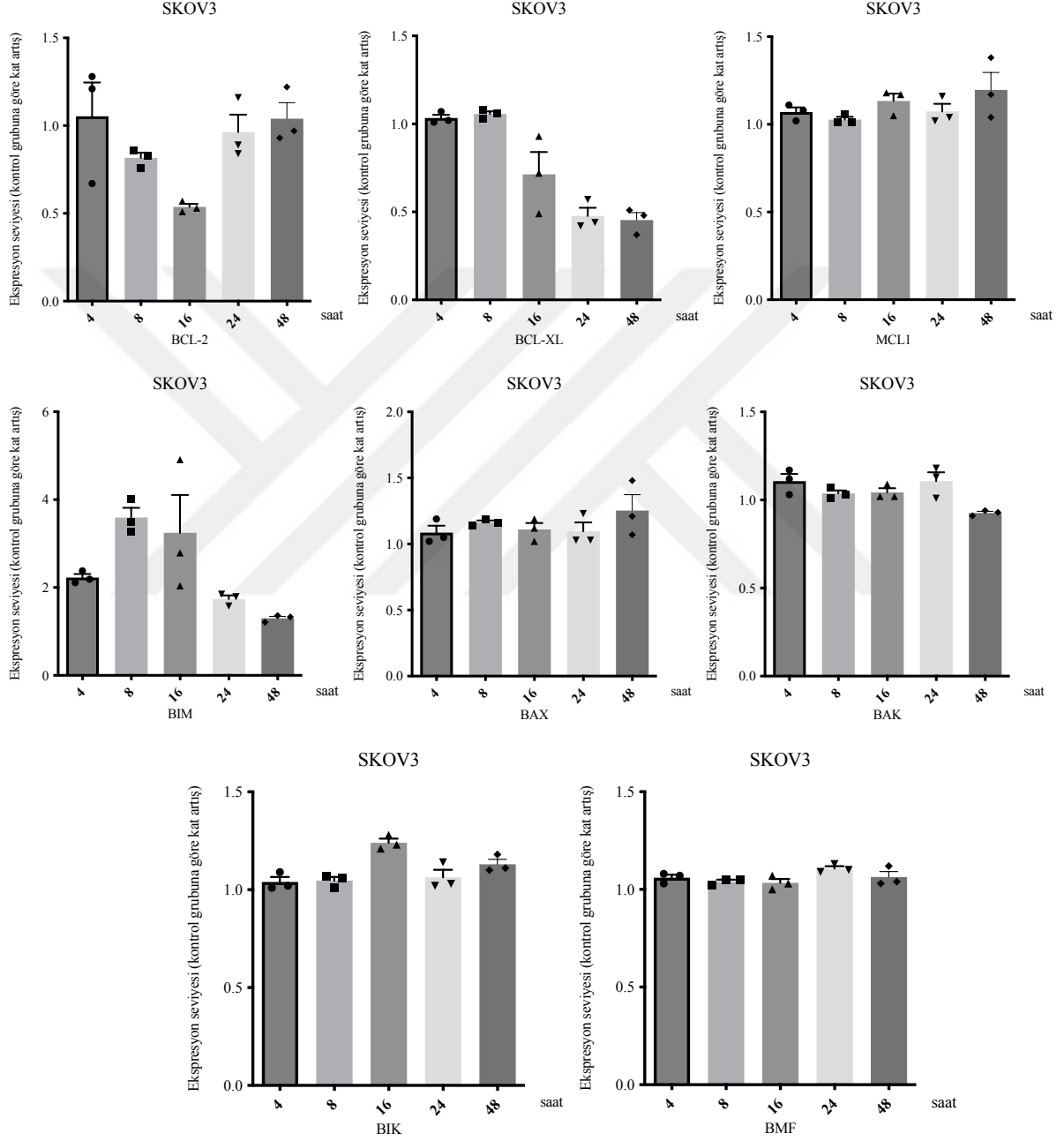


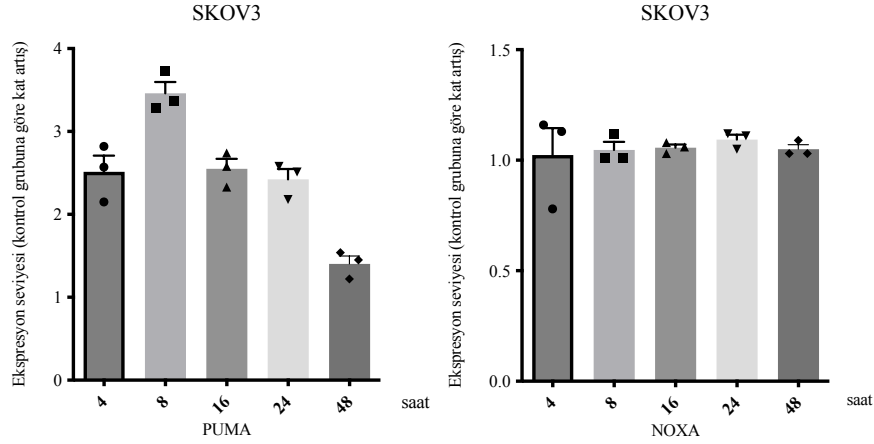


Şekil 27. SKOV3 BFA cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu.

SKOV3 hücrelerinde 0-48 arası Brefeldin A uygulaması sonrasında BCL-2 protein ailesi üyelerinin mRNA seviyelerini qPCR yöntemi ile test edilmiştir. BCL-2, BCL-XL, BIM, BAX, BAK, PUMA ve NOXA mRNA seviyelerinde herhangi bir değişim saptamamıştır. MCL1 mRNA seviyesi ise 8. saatten itibaren inkübasyon süresinin sonuna kadar artış göstermiştir. BIK mRNA seviyesi 8. ve 16. saatlerde düşüş gösterirken 24. ve 48. saatlerde bazal ekspresyon seviyelerine gerilemiştir. BMF mRNA seviyelerinde ise 24. ve 48. saatlerde artış gözlemlenmiştir (Şekil 27).

4.2.6. SKOV3 hücrelerinde AZD6738+BFA uygulamasına cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyon seviyeleri bulguları



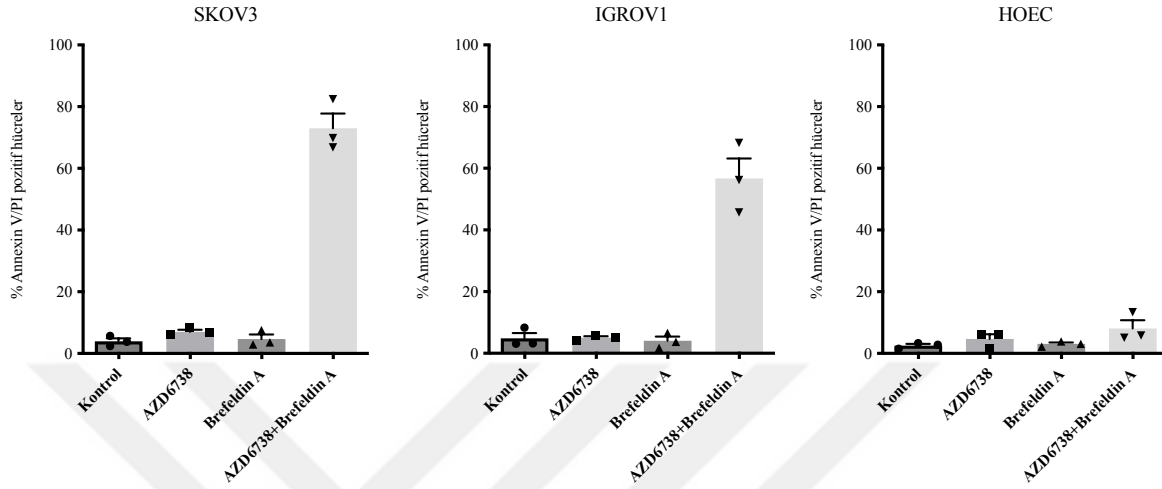


Şekil 28. SKOV3 AZD6738+BFA cevaben BCL2 ailesi mRNA ekspresyonu.

0-48 saat aralığında AZD6738+Brefeldin A kombinasyonu sonrasında da SKOV3 hücrelerinde BCL-2 protein ailesi üyelerinin mRNA ekspresyon seviyelerine qPCR yöntemi ile bakılmıştır. MCL1, BAX, BAK, BMF ve NOXA mRNA seviyelerinde bir değişim belirlenmemiştir. BCL-2 mRNA seviyelerinin ise 8. ve 16. saatlerde düşüş gösterirken, 24. ve 48. saatlerde tekrardan yükseldiğini gözlemlenmiştir. BCL-XL seviyeleri ise 16. saatten başlayarak düşmeye başlarken bu düşüş, 24. ve 48. saatlerde de devam etmiştir. Yine önemli olarak proapoptotik BIM mRNA seviyesi 4. saatten itibaren yükselmeye başlarken 8. ve 16. saatlerde yüksek kalmaya devam etmiştir. BIK mRNA seviyeleri 16. saatte artış gösterdikten sonra tekrar bazal ekspresyon seviyelerine gerilemiştir. BIM mRNA seviyelerinin 24. ve 48. saatlerde bazal seviyeye yaklaşacak şekilde düşüşe geçtiği gözlemlenmiştir. Bir diğer etkin proapoptotik BCL-2 proteini olan PUMA mRNA seviyesi ise 4. saatten itibaren başlayan ekspresyon artışını inkübasyon süresince devam etmiştir (Şekil 28).

4.3. Apoptotik Hücre Ölüm Analiz Bulguları

4.3.1. Annexin V/ PI bulguları

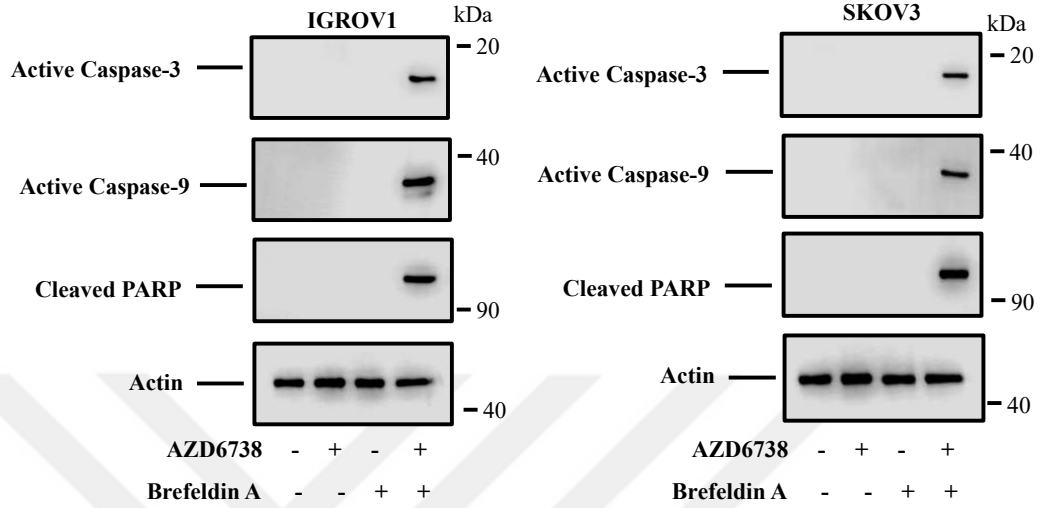


Şekil 29. IGROV1, SKOV3 ve HOEC hücreleri AZD6738, BFA, AZD6738+BFA Annexin V/PI apoptotik hücre yanıtları.

(Kontrol ve AZD6738+BFA gruplarının karşılaştırılması GraphPad Prism istatistik programında Student's two-tailed *t*-test kullanılarak yapılmıştır. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, SKOV3 hücreleri kontrol (3.9) vs AZD6738+BFA (73), IGROV1 hücreleri kontrol (4.8) vs AZD6738+BFA (56.7).

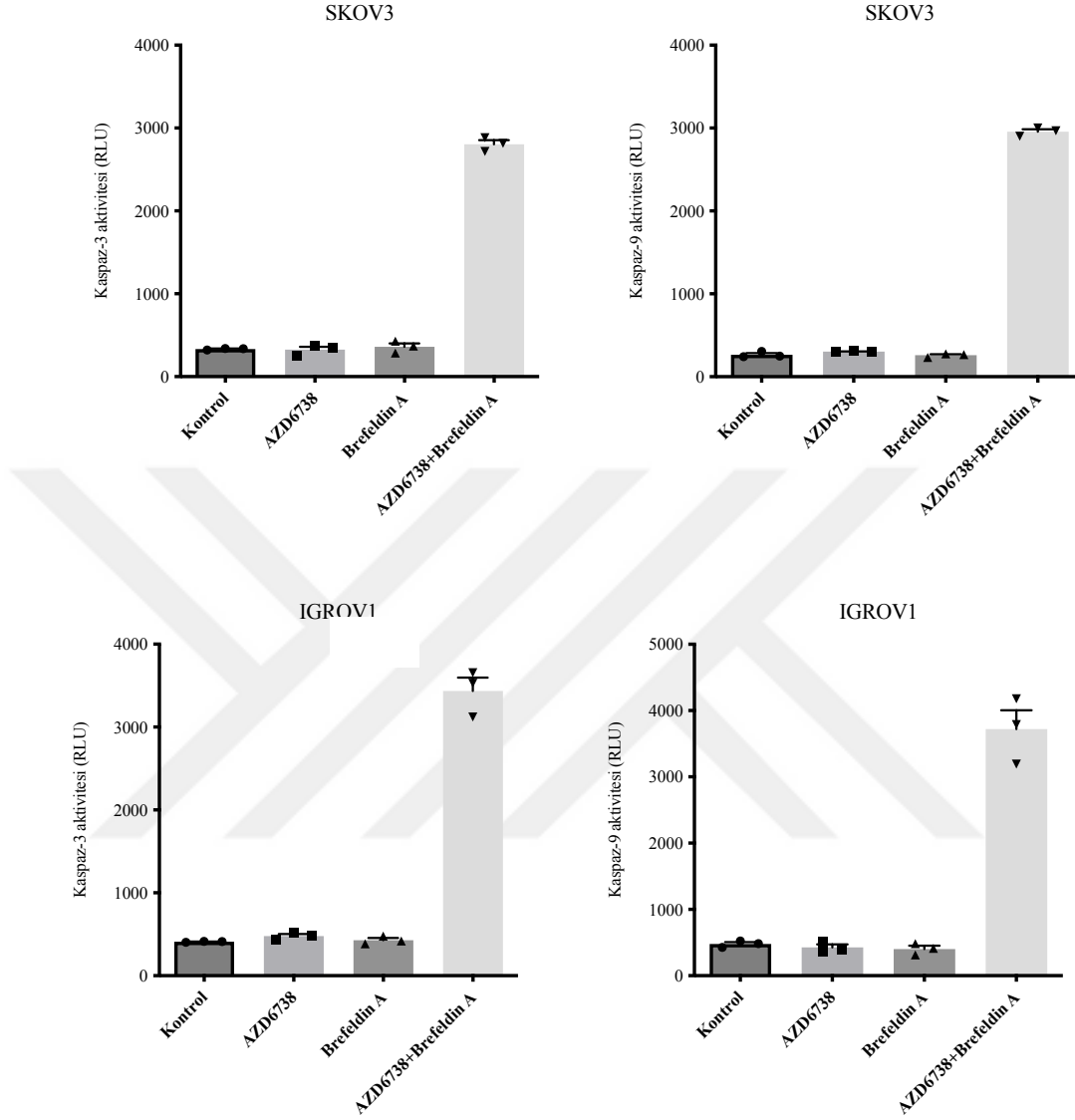
AZD6738, Brefeldin A (BFA) ve AZD6738+Brefeldin A kombinasyonunun hücre ölümü üzerindeki etkinliğini analiz etmek amacıyla SKOV3, IGROV1 ve HOEC hücreleri 48 saat boyunca AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A'ya maruz bırakılmıştır. Hücre ölümü cevabı Annexin V/PI boyaması sonrası FACS Canto II akış sitometrisinde değerlendirildiğinde AZD6738+BFA uygulamasının IGROV1 ve SKOV3 hücrelerinde anlamlı biçimde apoptotik hücre ölümünde neden olduğu belirlenmiştir (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, SKOV3 hücreleri kontrol (3.9) vs AZD6738+BFA (73), IGROV1 hücreleri kontrol (4.8) vs AZD6738+BFA (56.7) (Şekil 29). HOEC hücrelerinde benzer bir etki görülmemiştir. AZD6738 veya BFA tekil ajan olarak uygulandığında hücre ölümü üzerinde herhangi bir etkisin olmadığı bulunmuştur.

4.3.2. Kaspaz -3 ve -9 aktivasyon bulguları



Şekil 30. IGROV1 ve SKOV3 hücreleri AZD6738, BFA, AZD6738+BFA cevaben, Immunblot Kaspaz Apoptotik Hücre Yanıtı (Actin yükleme kontrolü olarak blotlanmıştır).

SKOV3 ve IGROV1 hücrelerinde apoptotik belirteçler olan kesilmiş kaspaz-3, kesilmiş kaspaz-9 ve kesilmiş PARP seviyelerini belirlemek için SKOV3 ve IGROV1 hücreleri AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A ile 48 saat inkübe edilmiştir. Total protein izolasyonu sonrasında kesilmiş kaspaz-3, kesilmiş kaspaz-9 ve kesilmiş PARP seviyeleri immunblot ile belirlenmiştir (Şekil 30). Sonuçlar IGROV1 ve SKOV3 hücrelerinde sadece AZD6738+Brefeldin A kombinasyonunun kesilmiş kaspaz-3, kesilmiş kaspaz-9 ve kesilmiş PARP fragmanlarının ortaya çıkmasına neden olduğunu göstermiştir.



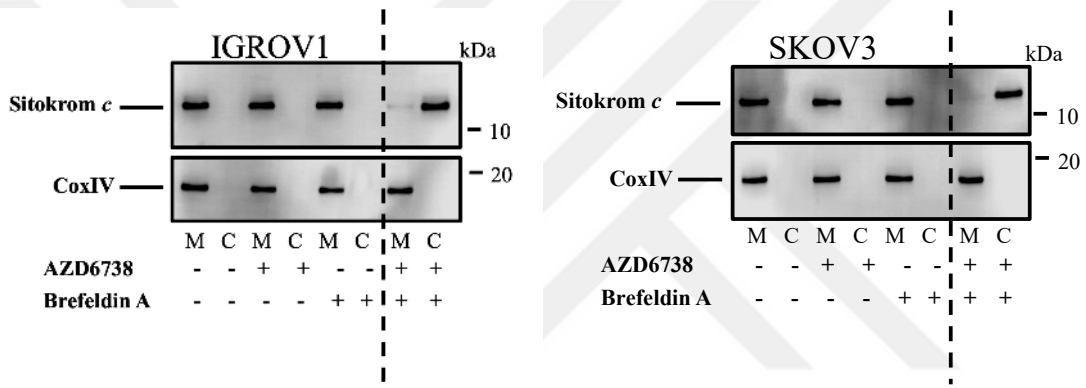
Şekil 31. SKOV3 ve IGROV1 hücreleri AZD6738, BFA, AZD6738+BFA cevaben, Luminometrik Kaspaz Apoptotik Hücre Yanıtı.

(*** $p < 0.001$, Kaspaz-3 aktivitesi (RLU), SKOV3 kontrol (333.3) vs. AZD6738+BFA (2805), IGROV1 kontrol (409.7) vs. AZD6738+BFA (3436), Kaspaz-9 aktivitesi (RLU), SKOV3 kontrol (264.5) vs. AZD6738+BFA (2957), IGROV1 kontrol (487.7) vs. AZD6738+BFA (3720). Kontrol ve AZD6738, BFA, AZD6738+BFA gruplarının karşılaştırılması GraphPad Prism istatistik programında Student's two-tailed t-test kullanılarak yapılmıştır.

SKOV3 ve IGROV1 hücrelerinde immunblot testleri ile tespit edilen kesilmiş kaspaz-3 ve kaspaz-9'un (Şekil 30), biyokimyasal aktivasyonları luminometrik kaspaz aktivasyon testleri ile doğrulanmıştır. SKOV3 ve IGROV1 hücrelerine 48 saat boyunca AZD6738, Brefeldin A

veya AZD6738+Brefeldin A uygulandıktan sonra uygulanan kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyon testleri immünblot sonuçları ile uyumlu biçimde AZD6738+Brefeldin A kombinasyonunun kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu anlamlı biçimde arttırdığını göstermiştir (** $p < 0.001$, Kaspaz-3 aktivitesi (RLU), SKOV3 kontrol (333.3) vs. AZD6738+BFA (2805), IGROV1 kontrol (409.7) vs. AZD6738+BFA (3436), Kaspaz-9 aktivitesi (RLU), SKOV3 kontrol (264.5) vs. AZD6738+BFA (2957), IGROV1 kontrol (487.7) vs. AZD6738+BFA (3720) (Şekil 31).

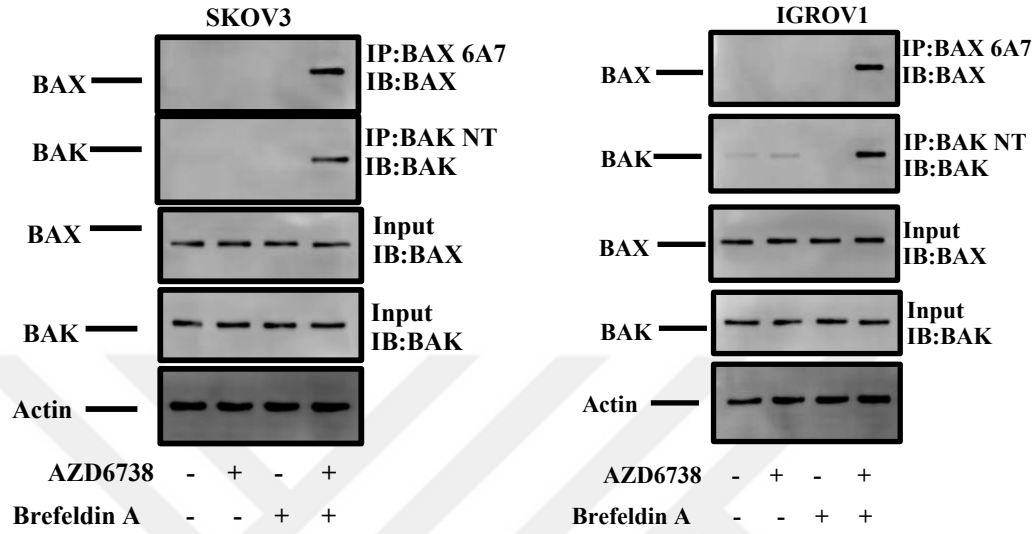
4.3.3. Sitokrom c salınım bulguları



Şekil 32. SKOV3 ve IGROV1 hücreleri AZD6738, BFA veya AZD6738+BFA cevaben, Sitokrom c Apoptotik Hücre Yanıtı (CoxIV mitokondriyal belirteç olarak blotlanmıştır).

Mitokondriyal dışı membran geçirgenliğinin artması ve sitokrom c'nin sitozole geçişi mitokondriyal apoptotik yolak için geri dönülemez hücresel noktayı belirtmektedir. SKOV3 ve IGROV1 hücreleri AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A ile 48 saat boyunca muamele edildikten sonra sitozolik ve mitokondriyal fraksiyonlarda sitokrom c mitokondriyal/sitozolik lokalizasyonun miktarı immünblot ile belirlenmiştir. Sonuçlar her iki hücre türünde de tekil ajan uygulamalarının bir etkisinin olmadığını ancak AZD6738+Brefeldin A uygulamasının anlamlı seviyede sitozolik sitokrom c salınımına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 32).

4.3.4. BAX/BAK aktivasyon bulguları

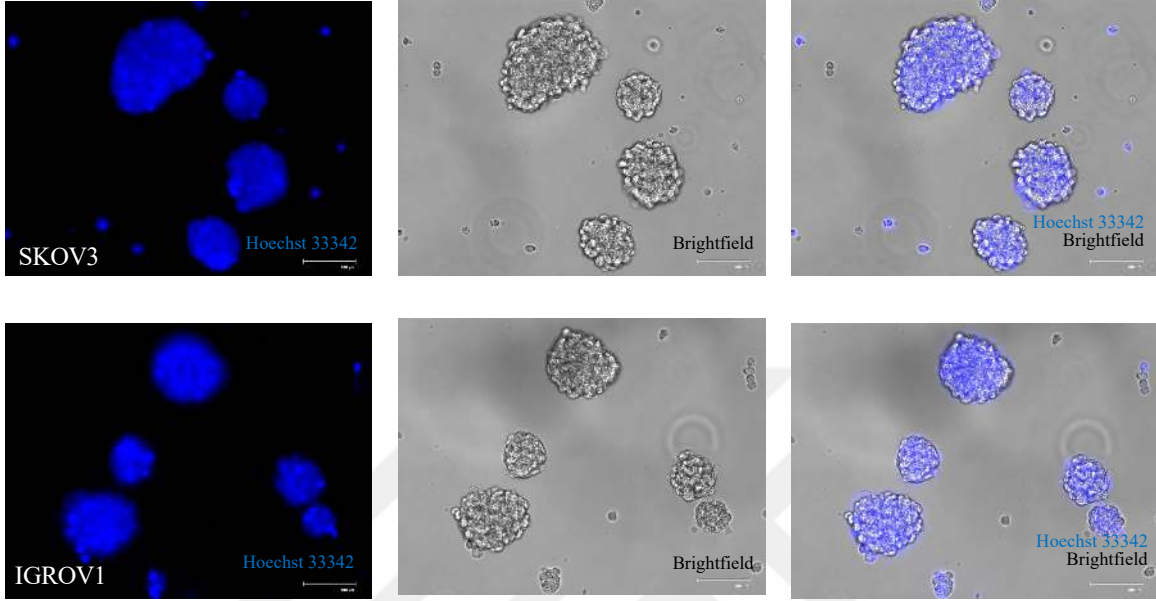


((IP: immünopresipitasyon, IB: immünoiblot) BAX ve BAK input kontrolleri olarak, Aktin yükleme kontrolü olarak blotlanmıştır).

Şekil 33. IGROV1 ve SKOV3 hücreleri AZD6738, BFA, AZD6738+BFA cevaben, BAX ve BAK Apoptotik Hücre Yanıtı.

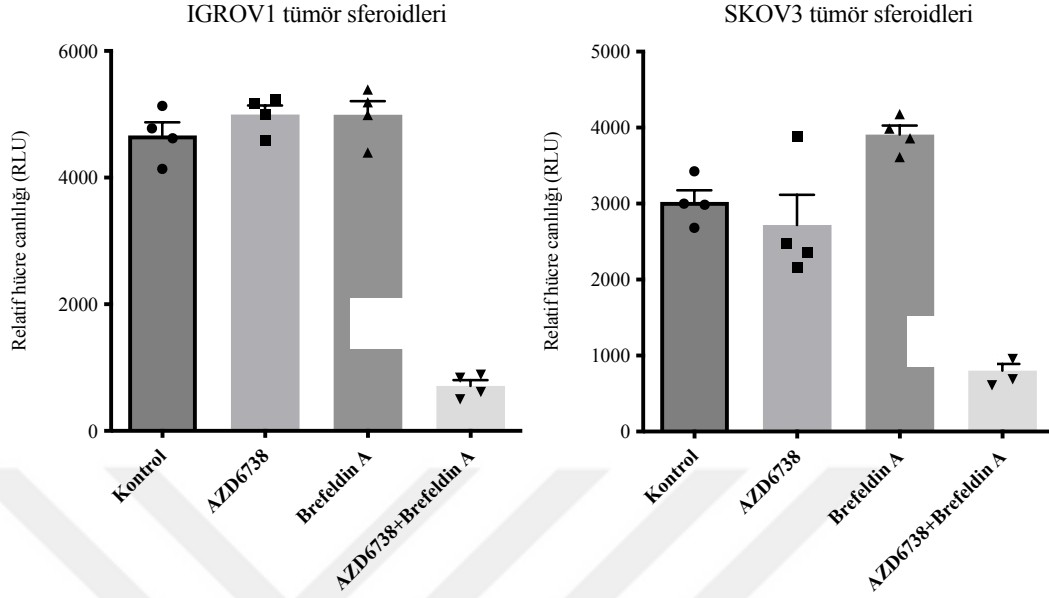
Mitokondriyal apoptotik yolağın ilk aşamalarında BAX ve BAK konformasyonel değişikliğe uğrayarak N-terminal uçlarını açığa çıkarırlar(177). Bu değişikliğin IGROV1 ve SKOV3 hücrelerinde de gerçekleşip gerçekleşmediğini değerlendirmek için IGROV1 ve SKOV3 hücreleri 16 saat boyunca AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A kombinasyonu ile muamele edilmiştir. Total protein izolasyonu sonrasında eşit miktarda protein (1 mg) BAX 6A7 ve BAK NT konformasyon-spesifik antikorlar ile 16 saat boyunca +4 C'de 200 rpm rotasyonla inkübe edilmiştir. İmmünopresipitasyon sonrası Dynabeads Protein G/Dynabeads protein G ile toplanan immünopresipitatlarda BAX ve BAK aktivasyon immunblotları AZD6738 veya Brefeldin A ile BAX veya BAK aktivasyonu görülmezken AZD6738+Brefeldin A kombinasyonunun BAX ve BAK aktivasyonunu indüklediğini göstermiştir (Şekil 33).

3.2.5. 3D Algimatrix Sferoid Kültür Bulguları



Şekil 34. SKOV3 ve IGROV1 hücrelerinin 3D Tümör Sferoid Kültürleri

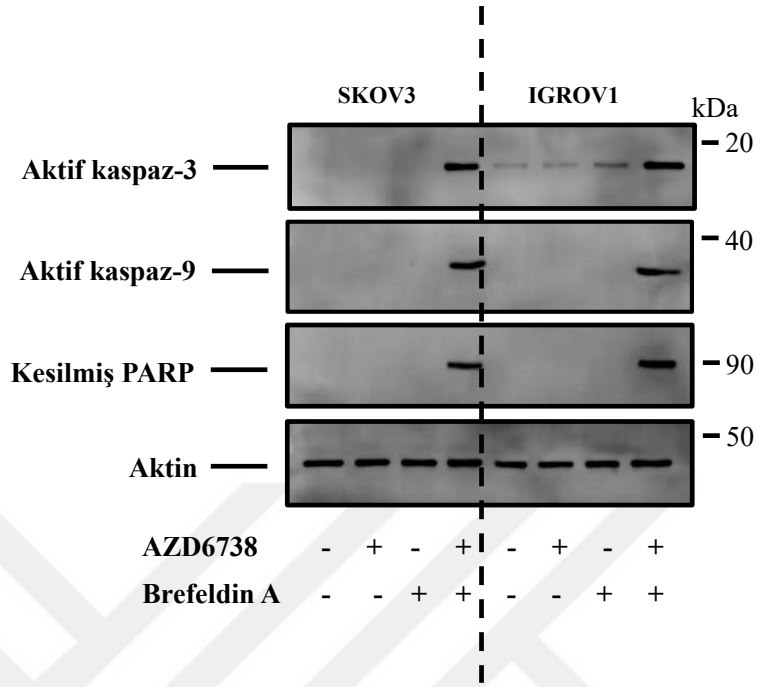
Tümör yapısını daha iyi görüntüleyebilmek için SKOV3 ve IGROV1 hücreleri 3D tümör sferoidleri Algimatrix sistemi kullanılarak büyütülmüştür. Onkosferoidlerin yapısı 14. günün sonunda mikroskopi ile değerlendirilmiştir, çekirdekler Hoechst 33342 ile işaretlenmiştir (Şekil 34).



(Kontrol vs. AZD6738+Brefeldin A gruplarının karşılaştırılması GraphPad Prism istatistik programında Student's two-tailed *t*-test kullanılarak yapılmıştır. *** $p < 0.001$, SKOV3 kontrol (3023) vs. AZD6738+BFA (801.4), IGROV1 kontrol (4668) vs. AZD6738+BFA (710.4)).

Şekil 35. SKOV3 ve IGROV1 Tümör Sferoidleri AZD6738, BFA veya AZD6738+BFA cevaben Hücre Canlılığı Sonuçları.

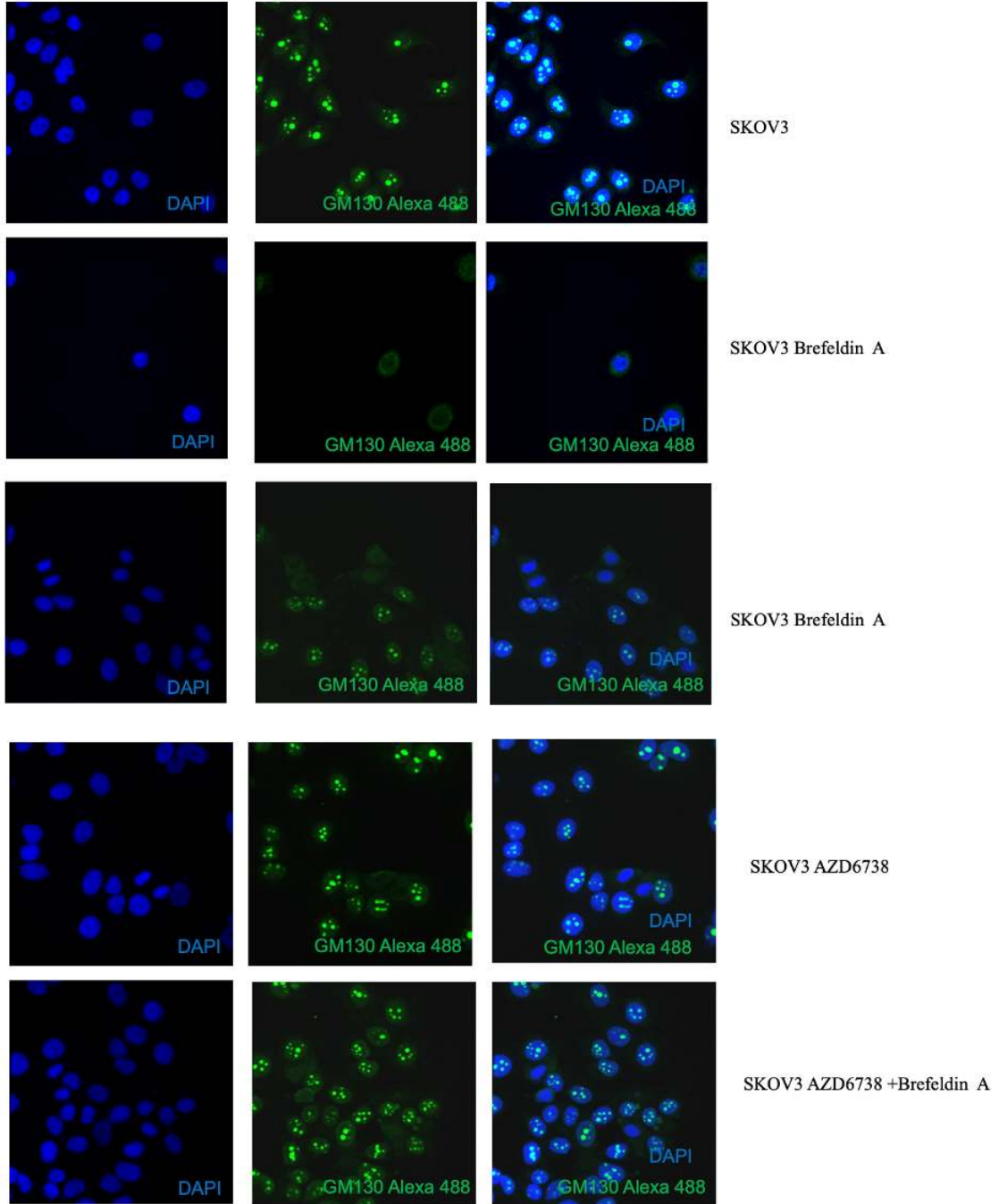
Tümör sferoidleri olarak büyütülen SKOV3 ve IGROV1 hücrelerine 48 saat boyunca AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A uygulanmıştır. 48. saatin sonunda hücre canlılığı 3D-Glo testi ile değerlendirilmiş, 2D kültür modellerinde gözlemlediğimiz etkiye paralel biçimde tekil ajanların anlamlı bir etkisi olmadığı, ancak AZD6738+Brefeldin A uygulamasının anlamlı biçimde tümör sferoidlerinin canlılığını azalttığı bulunmuştur (*** $p < 0.001$, SKOV3 kontrol (3023) vs. AZD6738+BFA (801.4), IGROV1 kontrol (4668) vs. AZD6738+BFA (710.4)) (Şekil 35).



Şekil 36. SKOV3 ve IGROV1, AZD6738, BFA, AZD6738+BFA cevaben tümör sferoidlerinde kaspaz-3, kaspaz-9 PARP fragmanlarının değerlendirilmesi (Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır).

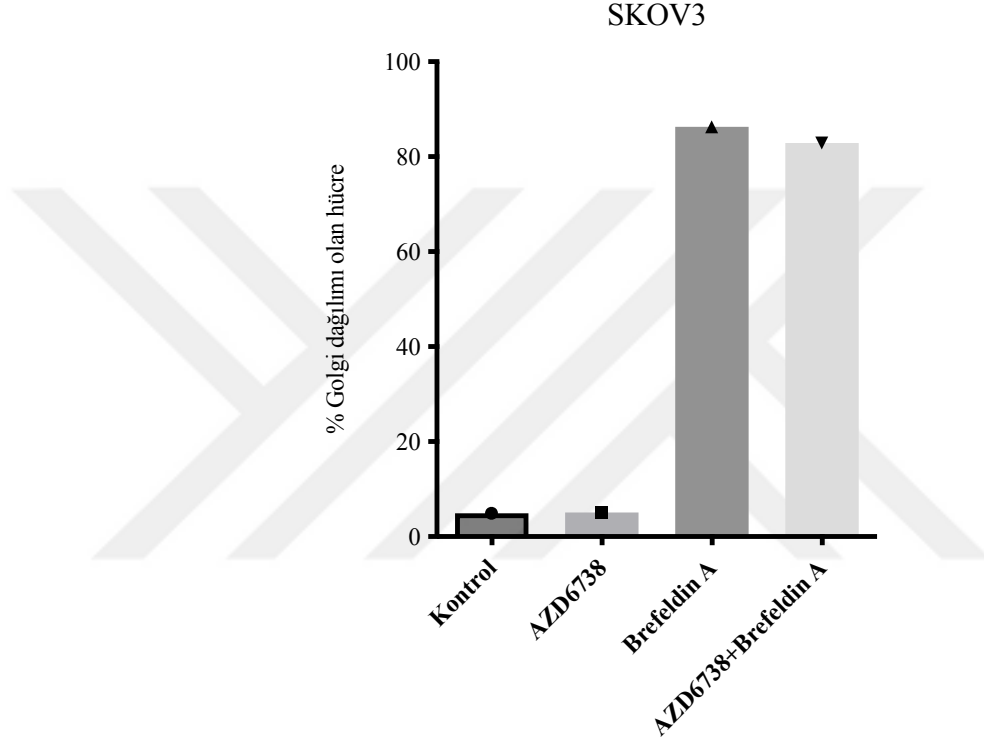
Şekil 30'da gözlenen etkinin apoptotik hücre ölümüne bağlı olarak geliştiğini doğrulamak için SKOV3 ve IGROV1 tümör sferoidlerinde 48 saatlik AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A uygulaması sonrasında total protein örneklerinde kesilmiş/aktif kaspaz-3, kesilmiş/aktifkaspaz-9 ve kesilmiş PARP seviyeleri immünblot ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar AZD6738+Brefeldin A uygulamasının SKOV3 ve IGROV1 tümör sferoidlerinde aktif/kesilmiş kaspaz-3, aktif/kesilmiş kaspaz-9 ve kesilmiş PARP fragmanlarını ortaya çıkardığını göstermiştir (Şekil 36).

3.2.6. GM130 Immunofloresan Boyama



Şekil 37. SKOV3 BFA, AZD6738 ve BFA+ AZD6738 cevaben Golgi Morfolojisi değerlendirilmesi.

100 nM Brefeldin A, AZD6738 ve BFA +AZD6738 ile 4 saat inkübasyon sonrası GM130 Immunofloresan boyama yapılmıştır. GM130-AlexaFluor 488 antikoru ile (1/300 konsantrasyon, Axiocam 503 mono, Zeiss Mikroskop 40X görüntüleme) uygulama sonrası BFA, Golgi dağılımına neden olmuştur.



Şekil 38. SKOV3 BFA, AZD6738 ve BFA+ AZD6738 cevaben Golgi Morfolojisinin istatistiksel değerlendirilmesi.

Brefeldin A, AZD6738 ve BFA +AZD6738 ile 4 saat inkübe edilen hücreler, apoptoza gitmeden önce Golgi morfolojisi yapısal proteini ve belirteci olan GM130 proteini Immunofloresan boyaması sonrasında, 5 alandan alınan görüntülerin GraphPad yazılımı ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. BFA'nın tekil ajan olarak kullanıldığında Golgi dağılımına neden olduğu, tekil ajan AZD6738'nin herhangi bir etkisi olmadığı ve BFA+AZD6738 kombinatoryal uygulama da ise BFA'nın etkisi ile Golgi dağılımı olduğu tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının amacı; over kanseri hücrelerinde ATR inhibitörü olan AZD6738 molekülüne uygun moleküler kombinasyon ile etkin, yenilikçi, uygulanabilir bir molekül bulup, over kanser hücrelerindeki apoptotik sinyal ileti yollarının etkinliğini belirlemek olmuştur.

ATR inhibitör tekil uygulamaları olmakla birlikte kombine tedavi uygulamalar da spesifik hedefler olarak etkinlik gösterirler. AZD6738 saflaştırılmış protein kinaz üzerinde 0.001 μ M, hücresel düzeyde 0.074 μ M IC₅₀ baskılayıcı konsantrasyonu ile oldukça seçici bir ATR inhibitörüdür (220). Aynı çalışmada AZD6738'in KRAS mutant NSCLC kanser hatları olan H23, H460, A549 ve H358'de etkin biçimde antiproliferatif etki gösterdiği ve bu etkinliğin pChk1 (S345) fosforilasyonunda azalma ile paralel gerçekleştiği bulunmuştur. Benzer biçimde AZD6738'in H23, H460, A549 ve H358 NSCLC hücre hatlarında *cisplatin*, *gemcitabine* ve *docetaxel* ile kombine kullanıldığında sinerjistik etki gösterdiği tespit edilmiş, AZD6738+*cisplatin* kombinasyonunun mitokondriyal apoptotik yolağı aktive ettiği belirlenmiştir (220). Bir başka çalışmada ise AZD6738 *olaparib*-dirençli PEO1-OR over kanseri hücrelerinde *olaparib* ile kombine biçimde kullanılmış, bu kombinasyonun hücrelerde kaspaz-3/-7-bağımlı hücre ölümü cevabını indüklediği gösterilmiştir (221). Yine bir başka ATR inhibitörü olan VE-821'in kombin olarak kullanıldığında OVCAR-8'i *cisplatin*, *topotecan*, *veliparib* ve *gemcitabine* gibi DNA hasarı indükleyici ajanlara daha duyarlı hale getirdiği bulunmuştur (122). ATR inhibitörü VE-821'in tekil ajan kullanıldığında etkisinin sınırlı olmasına rağmen MDA-MB-231, HT29, HCT116 parental ve HCT116 p53^{-/-} hücrelerinde *camptothecin* ve LMP-400'ün sitotoksik etkisini arttırdığı ortaya konulmuştur ve bu etkinin mitokondriyal apoptotik yolağın aktivasyonu ile gerçekleştiği belirlenmiştir (111).

Son derece önemli çalışmalardan birisinde ATR inhibitörü VE-821, 14 farklı kanser hücresinde ve 6 normal hücre hattında *cisplatin* ile eşzamanlı olarak uygulanmıştır, yaban tipi p53'e sahip olan hücreler (H460, A549, MCF7 ve RKO) en zayıf cevabı veren hücreler olurken, diğerlerinden farklı şekilde daha duyarlı olan HCT116 hücrelerin ATM yolağında defekti mevcuttur (103). Bu fenotip 161BR parental ve AT1BR (ATM null) hücrelerinde de doğrulanmıştır. Bu bulgularla uyumlu biçimde AZD6738'in ATM-defektif/mutant kanser hücrelerinde *olaparib* ile daha kuvvetli sinerjistik etki gösterdiği, AZD6738'in *olaparib* tarafından indüklenen G2/M hücre siklüsü kontrol noktasını ortadan kaldırdığı ve hücre

ölümüne neden olduğu bulunmuştur (222). ATR inhibitörlerinin çoğunlukla sentetik letalite gösterdiği ve hücre ölümünü indüklediği diğer çalışmalar da mevcuttur, ancak tekil ajan olarak kullanıldıklarında veya kombinatorial olarak kullanıldıklarında aktive ettikleri mitokondriyal hücre ölümü sinyal yolağı çalışmaları son derece kısıtlıdır (110, 128, 217, 223, 224).

Bu tez çalışmasıyla over kanseri hücrelerinde etkinlik gösterebilecek yeni bir moleküler kombinasyon tedavisinin, hem de bu kombinatorial uygulamanın moleküler çalışma mekanizmalarının bulunması hedeflenmiştir. Yüksek kapasiteli tarama sistemi ile AZD6738 ile kombine olarak kullanılabilir moleküllü Brefeldin A olarak belirlenmiştir. Tüm deneysel tarama sisteminin koşullanmaya bağlı tek dezavantajı, ekonomik kısıtlar nedeniyle molekül kütüphanesinin tek konsantrasyon olarak taramasının yapılabilmesi olmuştur.

Mitokondriyal apoptotik yolak temel olarak antiapoptotik ve proapoptotik BCL-2 protein ailesi üyeleri tarafından kontrol edilir. AZD6738, Brefeldin A ve AZD6738+Brefeldin A uygulaması mitokondriyal hücre ölümü yollarını farklı biyokimyasal ve hücre analitik teknikleri gerçekleştirilmiştir. Hücre ölümü cevabı Annexin V/PI boyaması sonrası değerlendirildiğinde AZD6738+BFA uygulamasının IGROV1 ve SKOV3 hücrelerinde anlamlı biçimde apoptotik hücre ölümünü indüklediğini gösterilmiştir (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, SKOV3 hücrelerinde kontrol (3.9%), AZD6738+BFA (73%) ve IGROV1 hücrelerinde kontrol (4.8%), AZD6738+BFA (56.7%) (Şekil 29). HOEC hücrelerinde benzer bir etki görülmemiştir. AZD6738 veya BFA tekil ajan olarak uygulandığında hücre ölümü üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Normal over yüzey epitel hücreleri olan HOEC hücrelerinde benzer bir cevap gözlenmemiş, bu da AZD6738+Brefeldin A kombinasyonunun terapötik penceresinin varlığını doğrulamıştır. Buna ek olarak konformasyon-spesifik antikorlarla immünopresipitasyon çalışmaları BAX ve BAK aktivasyonunu, mitokondriyal/sitozolik subfraksiyon çalışmaları da *sitokrom c'* nin SKOV3 ve IGROV1 hücrelerinde sitozole geçtiğini göstermiştir (Şekil 32). Tüm bu bulgular AZD6738 veya Brefeldin A'nın tekil ajan olarak değil ama kombine olarak uygulandığında mitokondriyal apoptotik sinyal ileti yolağını aktive ettiğini göstermiştir. Tümör sferoidleri olarak büyütülen SKOV3 ve IGROV1 hücrelerine 48 saat boyunca AZD6738, Brefeldin A veya AZD6738+Brefeldin A uygulanmıştır. 48. saatin sonunda hücre canlılığı 3D-Glo testi ile değerlendirilmiş, 2D kültür modellerinde gözlemlediğimiz etkiye paralel biçimde tekil ajanların anlamlı bir etkisi olmadığı, ancak AZD6738+Brefeldin A uygulamasının anlamlı biçimde tümör sferoidlerinin canlılığını azalttığı bulunmuştur

(*** $p < 0.001$, SKOV3 kontrol (3023 RLU), AZD6738+BFA (801.4 RLU) ve IGROV1 kontrol (4668 RLU), AZD6738+BFA (710.4 RLU)) (Şekil 35). Benzer bulguları 3D hücre kültürü modelleme de birebir olarak doğrulanmıştır (Şekil 36). Böylece hem 2D kültürü modellerinde hem de 3D tümör sferoidlerinde AZD6738+Brefeldin A kombinasyonunun kanonik mitokondriyal hücre ölümü yolağını aktive ettiği gösterilmiştir.

Brefeldin A'nın tekil ajan olarak kullanıldığında, BCL-2 inhibitörü HA14-1 veya Fas ligandı ile kombine olarak uygulandığında foliküler lenfoma hücrelerinde mitokondriyal apoptotik yolağı indüklediği ve kaspaz-2 aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (225). Brefeldin A ve benzer bir Golgi stresi indükleyici olan AMF-26'nın 13 farklı kanser hücre hattı üzerindeki etkisi incelenmiş, Brefeldin A'nın IC_{50} değeri kanser hücrelerinin çoğunda tez çalışmasın da kullanılmış olan $0.1 \mu M$ konsantrasyona yakın bulunmuştur (226). 100 nM konsantrasyonda Brefeldin A, Golgi kompleksinin dağılmasını indüklerken ARF GTPazların seviyelerinin hem Brefeldin A uygulaması sonrası hücre canlılığını hem de Golgi yapısının bütünlüğünü etkilediği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise Brefeldin A'nın HeLa hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin seviyesinin artışına ve glutatyon konsantrasyonunun düşüşüne neden olduğu, redoks dengesini bozarak ferroptosis'i indüklediği belirlenmiştir (227). Tez çalışmasın da Brefeldin A'nın oksidatif stres üzerine etkisine bakılmamıştır, ancak benzer bir etkinin SKOV3 ve IGROV1 hücrelerinde de görülebileceğini öngörülmüştür. Bir başka çalışmada ise tez çalışmasına benzer biçimde DNA hasarı ve Golgi stresi arasındaki ilişki araştırılmıştır. HEK293 hücrelerine *camptothecin*, *doxorubicin* ve iyonize radyasyon uygulanmasının Golgi yapısının dağılmasına neden olduğu GM130 immünofloresan boyamaları ile gösterilmiştir (174). Golgi yapısının dağılmasının apoptotik cevaptan bağımsız olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Golgi yapısının dağılmasının ise GOLPH3'ün DNA-PK tarafından fosforillenmesi olduğu tespit edilmiştir. Ancak bir başka çalışmada ise GOLPH3'ün *in vivo* akut karaciğer ve böbrek hasarı modellerinde protein ve mRNA seviyesinde artış gösterdiği ve GOLPH3'ün siRNA-yoluyla seviyesinin azaltılmasının lipopolisakkarit (LPS) ile muamele edilmiş hepatositlerde ve renal tübüler hücrelerde Golgi stresini ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (228). Bir başka çalışmada ise α SNAP'in siRNA-yoluyla ekspresyon seviyesinin azaltılmasının veya baskın negatif α SNAP'in ekspresyonunun SK-CO15, DU145 ve PC3 epitelyal hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü indüklediği aktif kaspaz-3 ve kesilmiş PARP fragmanlarının varlığıyla gösterilmiştir (229). Bu hücre ölümü sürecinin BAX ve p53'ten bağımsız olarak gerçekleştiği bulunurken, α SNAP'in RNAi-temelli susturumunun BCL-2 protein seviyesinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur. SK-CO15 hücrelerinde α SNAP'in

siRNA-yoluyla susturumu BAX seviyesinde azalmaya yol açarken BAK, BID, BIM ve NOXA gibi diğer proapoptotik BCL-2 proteinlerinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Yine bu çalışmada SK-CO15 insan kolon epitelyal hücrelerinde α SNAP'in susturumunun Golgi fragmentasyonunu indüklediği GM130 immünfloresan boyaması ile gösterilmiştir, bu fragmentasyonla beraber de KDEL-R immünfloresan boyaması ile Golgi-ER transport fonksiyonunun bozulduğu tespit edilmiştir. SK-CO15 hücrelerine BFA 2 μ M konsantrasyonda ve 24 saat süresince uygulandığında da benzer şekilde BCL-2 protein seviyesinde azalma ve %40 oranda apoptotik hücre ölümü görülmüştür. Brefeldin A, AZD6738 ve BFA +AZD6738 ile 4 saat inkübe edilen hücreler, apoptoza gitmeden önce Golgi morfolojisi yapısal proteini ve belirteci olan GM130 proteini Immunofloresan boyaması sonrasında, istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. BFA'nın tekil ajan olarak kullanıldığında Golgi dağılımına neden olduğu, tekil ajan AZD6738'nin herhangi bir etkisi olmadığı ve BFA+AZD6738 kombinatoryal uygulama da ise BFA'nın etkisi ile Golgi dağılımı olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasındaki verilerle karşılaştırıldığında BFA'nın Golgi dağılmasına neden olmasına rağmen tekil ajan olarak kullanıldığında hücre ölümünü indüklemediği gösterilmiştir (Şekil 15, Şekil 19). Şekil 15 ve şekil 19'da gösterildiği üzere BFA uygulaması IGROV1 ve SKOV3 over kanseri hücrelerinde BCL-2 ve BCL-XL seviyelerinde artışa neden olmuştur, benzer şekilde Golgi dağılmasına neden olsa da tekil ajan olarak kullanıldığında mitokondriyal apoptotik yolağı aktive edememiştir. Buradaki önemli bir başka nokta da bu tez çalışmasında bahsedilen çalışmaya göre daha düşük konsantrasyonda BFA (0.1 μ M) kullanılmış olmasıdır. Golgi stresi hücrede protein ve veziküllerin post-translasyonel olarak modifikasyonu gibi biyolojik işlevler için talebin artması ve Golgi işleme kapasitesinin aşılması olarak tanımlanabilir. Bu durumu takiben de Golgi'nin örneğin transkripsiyon faktör E3 (*transcription factor E3*, TFE3) yolağını aktive ederek hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir (175). XhCRC ve SW620 kolorektal kanser hücrelerine *irinotecan* uygulanması perinükleer Golgi şeridinin dağılmasına ve Golgi'nin sitoplazmada noktasal gruplar halinde görüntülenmesine neden olmuştur (230). Golgi'nin morfolojik olarak dağılmasına DNA-PK aktivasyonu eşlik etmiştir. Yine bu çalışmada *irinotecan* uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan Golgi dağılmasının apoptotik süreçten bağımsız olarak gerçekleştiği bulunmuştur. XhCRC hücrelerinde GOLPH3 veya MYO18A'nın shRNA-yoluyla susturumunun *irinotecan*'a bağlı olarak görülen Golgi dağılmasını baskımlarken *irinotecan*'a cevaben apoptotik hücre ölümünü de arttırmıştır. Çalışmada Golgi stres yanıtının ve Golgi yapısının dağılmasının hücre canlılığı koruyucu etkisinin TFE3 yolağının aktivasyonu yoluyla gerçekleştiği bir başka Golgi stres indükleyici olan *monensin* kullanılarak

doğrulanmıştır (230). Ancak bu çalışmada BCL-2 proteinlerine ve mitokondriyal apoptotik hücre ölümü yollarına bakılmamıştır. SKOV3 ve A2780 over kanseri hücrelerine *dihydromyricetin* (DHM) uygulamasının her iki hücrede de artan BAX ve azalan BCL-2 protein seviyelerine, kaspaz-3 aktivasyonuna ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (231). Ek olarak DHM uygulamasının SKOV3 ve A2780 hücrelerinde GRASP65 protein seviyesinde azalmaya yol açtığı ve GRASP65'in siRNA-yoluyla susturumunun DHM tarafından indüklenen apoptotik cevabı arttırdığı tespit edilmiştir. Bu modelde de Golgi stresi cevabının hücre canlılığını koruma yönünde fonksiyon gösterdiği belirlenmiştir. Golgi stresi ve hücre ölümü arasındaki ilişkiyi araştıran bir başka çalışmada ise BFA'nın A549, HCT116 ve MCF7 hücrelerine 8-200 nM aralığında ve 0-72 saat boyunca uygulandığında anlamlı biçimde hücre ölümü indüklediği gösterilmiş ve indüklenen hücre ölümü yolağının da apoptotik hücre ölümü yolağı olduğu kesilmiş PARP fragmanlarının tespit edilmesiyle belirlenmiştir (232). Moleküler çalışmalarla ise BFA'nın özellikle DR4 hücre ölümü reseptörünün ekspresyonunu artırarak hücre ölümünü aktive ettiği belirlenmiştir. Bu çalışmadan reseptör aktivasyonu yoluyla aktive edilen ve kısmi olarak mitokondriyal apoptotik yolakla fonksiyonel ortaklaşma gösteren programlanmış hücre ölümü çalışıldığı için BCL-2 proteinlerinden sadece BID kesilmiş fragmanlarının seviyesine bakılmıştır, ancak BID' in mekanistik rolü ile ilgili bir bulgu sunulmamıştır. Tüm bu çalışmalar Golgi stresi ve mitokondriyal apoptotik yolak arasındaki ilişkinin halen oldukça belirsiz olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında IGROV1 ve SKOV3 hücrelerinde BFA uygulaması sonrasında BCL-2 ve BCL-XL protein seviyelerinde tespit edilen artışlar eş zamanlı olarak mRNA seviyesinde de bulunmuştur (Şekil 24, Şekil 27). Bu bulgular BFA tarafından indüklenen Golgi stresinin öncelikli olarak hücreleri apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir. Aynı zamanda BFA'nın BCL-2 ve BCL-XL ekspresyonunu transkripsiyonel düzeyde indüklediğini göstermektedir.

Tez çalışmasında direkt olarak DNA hasarı ve Golgi stresi arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçlamasa da AZD6738 ve Brefeldin A kombinasyonu ile her iki yolağı da aktive ederek over kanseri hücrelerinde mitokondriyal apoptotik yolağın tam olarak aktivasyonuna neden olduğunu açık biçimde ortaya koyulmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

ATR inhibitör ilaçları oldukça etkin kullanıma sahip terapötik ajanlardır. Özellikle kombine tedavi uygulamalarında spesifik hedefleri olan ATR'i baskılayarak etkinlik gösterirler. Birçok kanser hücre hattı çalışmalarında kullanılmış olup farklı hücre ölüm yollarını indüklediği doğrulanmıştır. Yapılan literatür çalışmasında ATR kullanımının tekil ajan olarak kullanımının kısıtlı olduğu saptanmış olup, çalışmalarımızda ATR ile uyumlu olabilecek bir molekül taraması sonucunda Brefeldin A molekülünün etkinliğini tespit edilmiştir. Bu doğrultuda yapılan ön çalışmalarımız da AZD6738 ve BFA ilaç uygulamalarının, SKOV3 hücre hattında hücre ölüm yolağını doğrulamıştır. Deneyler bu yönde planlanarak çalışmalar tamamlanmıştır. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre;

- IGROV1 ve SKOV3 hücrelerinde kombine ilaç uygulaması sonrası immunblot sonuçlarına göre antiapoptotik BCL-2 proteinlerinin seviyelerinde azalış, proapoptotik BCL-2 proteinlerinin seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Aynı zamanda mRNA seviyesinde BCL-2 ailesi seviyeleri tespit edilerek değerlendirilmiştir.
- Kombine ilaç uygulaması sonrası hücre ölümü cevabı Annexin V/PI boyaması sonrası akış sitometrisinde değerlendirildiğinde, IGROV1 ve SKOV3 hücrelerinde anlamlı biçimde apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur, ancak normal over epitel hücrelerde farklılık gözlenmemiştir.
- IGROV1 ve SKOV3 hücrelerinde kombine ilaç uygulaması sonrası; immunblot ile uyumlu olarak lüminetrik kaspaz aktivasyonu, sitoplazma ve mitokondriyal sitokrom c miktarı, BAX ve BAK aktivasyonu tespit edilmiş olup; hücre ölüm yollarının indüklendiği doğrulanmıştır.
- 2D kültürü modelleri ile 3D tümör sferoidlerinde AZD6738+Brefeldin A kombinasyonunun mitokondriyal hücre ölümü yolağını aktive ettiği gösterilmiştir.
- Tüm bu bulgular AZD6738 veya Brefeldin A'nın tekil ajan olarak değil ama kombine olarak uygulandığında mitokondriyal apoptotik sinyal ileti yolağını aktive ettiğini gösterilmiştir.
- Yenilikçi ATR inhibitörü ile kombinasyon terapi yaklaşımının, moleküler düzeyde kliniğe uyarlanması ile önemli bir basamak oluşturabileceğini ve yeni araştırma projelerine öncülük edebileceğini öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(4):284-96.
2. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med.* 2017;14(1):9-32.
3. Marth C, Abreu MH, Andersen KK, Aro KM, de Lurdes Batarda M, Boll D, et al. Real-life data on treatment and outcomes in advanced ovarian cancer: An observational, multinational cohort study (RESPONSE trial). *Cancer.* 2022;128(16):3080-9.
4. Gaitskell K, Hermon C, Barnes I, Pirie K, Floud S, Green J, et al. Ovarian cancer survival by stage, histotype, and pre-diagnostic lifestyle factors, in the prospective UK Million Women Study. *Cancer Epidemiol.* 2022;76:102074.
5. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48.
6. Wentzensen N, Poole EM, Trabert B, White E, Arslan AA, Patel AV, et al. Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium. *J Clin Oncol.* 2016;34(24):2888-98.
7. Veneziani AC, Gonzalez-Ochoa E, Alqaisi H, Madariaga A, Bhat G, Rouzbahman M, et al. Heterogeneity and treatment landscape of ovarian carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2023;20(12):820-42.
8. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins & Cotran pathologic basis of disease. Tenth edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2021. xii, 1379 pages p.
9. Cho KR, Shih Ie M. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:287-313.
10. Alsop K, Fereday S, Meldrum C, deFazio A, Emmanuel C, George J, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 2012;30(21):2654-63.
11. Zhang S, Royer R, Li S, McLaughlin JR, Rosen B, Risch HA, et al. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2011;121(2):353-7.
12. Kossai M, Leary A, Scoazec JY, Genestie C. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology.* 2018;85(1-2):41-9.

13. Azzalini E, Stanta G, Canzonieri V, Bonin S. Overview of Tumor Heterogeneity in High-Grade Serous Ovarian Cancers. *Int J Mol Sci.* 2023;24(20).
14. O'Mahony DG, Ramus SJ, Southey MC, Meagher NS, Hadjisavvas A, John EM, et al. Ovarian cancer pathology characteristics as predictors of variant pathogenicity in BRCA1 and BRCA2. *Br J Cancer.* 2023;128(12):2283-94.
15. Corzo C, Iniesta MD, Patrono MG, Lu KH, Ramirez PT. Role of Fallopian Tubes in the Development of Ovarian Cancer. *J Minim Invasive Gynecol.* 2017;24(2):230-4.
16. Karnezis AN, Cho KR, Gilks CB, Pearce CL, Huntsman DG. The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(1):65-74.
17. Lim D, Oliva E. Precursors and pathogenesis of ovarian carcinoma. *Pathology.* 2013;45(3):229-42.
18. Nakamura K, Nakayama K, Ishibashi T, Ishikawa N, Ishikawa M, Katagiri H, et al. KRAS/BRAF Analysis in Ovarian Low-Grade Serous Carcinoma Having Synchronous All Pathological Precursor Regions. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5).
19. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol.* 2009;16(5):267-82.
20. Voutsadakis IA. Low-grade serous ovarian carcinoma: an evolution toward targeted therapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2020;30(10):1619-26.
21. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16061.
22. Handley KF, Sims TT, Bateman NW, Glassman D, Foster KI, Lee S, et al. Classification of High-Grade Serous Ovarian Cancer Using Tumor Morphologic Characteristics. *JAMA Netw Open.* 2022;5(10):e2236626.
23. Yin X, Jing Y, Cai MC, Ma P, Zhang Y, Xu C, et al. Clonality, Heterogeneity, and Evolution of Synchronous Bilateral Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(23):6551-61.
24. Smebye ML, Haugom L, Davidson B, Trope CG, Heim S, Skotheim RI, et al. Bilateral ovarian carcinomas differ in the expression of metastasis-related genes. *Oncol Lett.* 2017;13(1):184-90.
25. Kommos F, Gilks CB. Pathology of Ovarian Cancer: Recent Insights Unveiling Opportunities in Prevention. *Clin Obstet Gynecol.* 2017;60(4):686-96.
26. Kurnit KC, Frumovitz M. Primary mucinous ovarian cancer: options for surgery and

- chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer*. 2022.
27. Perren TJ. Mucinous epithelial ovarian carcinoma. *Ann Oncol*. 2016;27 Suppl 1:i53-i7.
 28. Frumovitz M, Schmeler KM, Malpica A, Sood AK, Gershenson DM. Unmasking the complexities of mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2010;117(3):491-6.
 29. Li XS, Sun J, He XL. Expression of c-myc and mutation of the KRAS gene in patients with ovarian mucinous tumors. *Genet Mol Res*. 2015;14(3):10752-9.
 30. Matsuo K, Machida H, Mandelbaum RS, Grubbs BH, Roman LD, Sood AK, et al. Mucinous borderline ovarian tumor versus invasive well-differentiated mucinous ovarian cancer: Difference in characteristics and outcomes. *Gynecol Oncol*. 2019;153(2):230-7.
 31. Jain A, Ryan PD, Seiden MV. Metastatic mucinous ovarian cancer and treatment decisions based on histology and molecular markers rather than the primary location. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012;10(9):1076-80.
 32. La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev*. 2017;26(1):55-62.
 33. Kurman RJ, Shih Ie M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(3):433-43.
 34. Gadducci A, Multinu F, Cosio S, Carinelli S, Ghioni M, Aletti GD. Clear cell carcinoma of the ovary: Epidemiology, pathological and biological features, treatment options and clinical outcomes. *Gynecol Oncol*. 2021;162(3):741-50.
 35. Collins KE, Wang X, Klymenko Y, Davis NB, Martinez MC, Zhang C, et al. Transcriptomic analyses of ovarian clear-cell carcinoma with concurrent endometriosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1162786.
 36. Struzinska I, Hajkova N, Hojny J, Krkavcova E, Michalkova R, Dvorak J, et al. A comprehensive molecular analysis of 113 primary ovarian clear cell carcinomas reveals common therapeutically significant aberrations. *Diagn Pathol*. 2023;18(1):72.
 37. Turgay B, Koyuncu K, Taskin S, Ortac UF. Features of ovarian Brenner tumors: Experience of a single tertiary center. *Turk J Obstet Gynecol*. 2017;14(2):133-7.
 38. Tafe LJ, Muller KE, Ananda G, Mitchell T, Spotlow V, Patterson SE, et al. Molecular Genetic Analysis of Ovarian Brenner Tumors and Associated Mucinous Epithelial Neoplasms: High Variant Concordance and Identification of Mutually Exclusive RAS Driver Mutations and MYC Amplification. *Am J Pathol*. 2016;186(3):671-7.
 39. Roma AA, Masand RP. Ovarian Brenner tumors and Walthard nests: a histologic and immunohistochemical study. *Hum Pathol*. 2014;45(12):2417-22.

40. Costeira FS, Felix A, Cunha TM. Brenner tumors. *Br J Radiol.* 2022;95(1130):20210687.
41. Nasioudis D, Sisti G, Holcomb K, Kanninen T, Witkin SS. Malignant Brenner tumors of the ovary; a population-based analysis. *Gynecol Oncol.* 2016;142(1):44-9.
42. Pageaux JF, Laugier C, Pal D, Pacheco H. Development of the oviduct in quail during sexual maturation in relation to plasma concentrations of oestradiol and progesterone. *J Endocrinol.* 1984;100(2):167-73.
43. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet.* 1971;2(7716):163.
44. Colgan TJ, Murphy J, Cole DE, Narod S, Rosen B. Occult carcinoma in prophylactic oophorectomy specimens: prevalence and association with BRCA germline mutation status. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(10):1283-9.
45. Leeper K, Garcia R, Swisher E, Goff B, Greer B, Paley P. Pathologic findings in prophylactic oophorectomy specimens in high-risk women. *Gynecol Oncol.* 2002;87(1):52-6.
46. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Jansen JW, Poort-Keesom RJ, Menko FH, et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol.* 2001;195(4):451-6.
47. Gilks CB, Irving J, Kobel M, Lee C, Singh N, Wilkinson N, et al. Incidental nonuterine high-grade serous carcinomas arise in the fallopian tube in most cases: further evidence for the tubal origin of high-grade serous carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(3):357-64.
48. McCluggage WG, Hirschowitz L, Gilks CB, Wilkinson N, Singh N. The Fallopian Tube Origin and Primary Site Assignment in Extrauterine High-grade Serous Carcinoma: Findings of a Survey of Pathologists and Clinicians. *Int J Gynecol Pathol.* 2017;36(3):230-9.
49. Marquez RT, Baggerly KA, Patterson AP, Liu J, Broaddus R, Frumovitz M, et al. Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium, and colon. *Clin Cancer Res.* 2005;11(17):6116-26.
50. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol.* 2012;13(4):385-94.
51. King CM, Barbara C, Prentice A, Brenton JD, Charnock-Jones DS. Models of endometriosis and their utility in studying progression to ovarian clear cell carcinoma. *J Pathol.* 2016;238(2):185-96.

52. Anglesio MS, Yong PJ. Endometriosis-associated Ovarian Cancers. *Clin Obstet Gynecol*. 2017;60(4):711-27.
53. Wang Y, Duval AJ, Adli M, Matei D. Biology-driven therapy advances in high-grade serous ovarian cancer. *J Clin Invest*. 2024;134(1).
54. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
55. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
56. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46.
57. Suski JM, Braun M, Strmiska V, Sicinski P. Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell*. 2021;39(6):759-78.
58. Ovejero-Sanchez M, Gonzalez-Sarmiento R, Herrero AB. DNA Damage Response Alterations in Ovarian Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)*. 2023;15(2).
59. O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*. 2015;60(4):547-60.
60. Sancar A. Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016;55(30):8502-27.
61. Ramirez-Gamboa D, Diaz-Zamorano AL, Melendez-Sanchez ER, Reyes-Pardo H, Villaseñor-Zepeda KR, Lopez-Arellanes ME, et al. Photolyase Production and Current Applications: A Review. *Molecules*. 2022;27(18).
62. Bai P, Fan T, Sun G, Wang X, Zhao L, Zhong R. The dual role of DNA repair protein MGMT in cancer prevention and treatment. *DNA Repair (Amst)*. 2023;123:103449.
63. Poletto M, Legrand AJ, Dianov GL. DNA Base Excision Repair: The Achilles' Heel of Tumour Cells and their Microenvironment? *Curr Pharm Des*. 2017;23(32):4758-72.
64. Dianov GL, Hubscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(6):3483-90.
65. D'Souza A, Kim M, Chazin WJ, Scharer OD. Protein-protein interactions in the core nucleotide excision repair pathway. *DNA Repair (Amst)*. 2024;141:103728.
66. Apelt K, Lans H, Scharer OD, Luijsterburg MS. Nucleotide excision repair leaves a mark on chromatin: DNA damage detection in nucleosomes. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(24):7925-42.

67. Scharer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(10):a012609.
68. Li Q, Qian W, Zhang Y, Hu L, Chen S, Xia Y. A new wave of innovations within the DNA damage response. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):338.
69. Brooksbank K, Martin SA. DNA mismatch repair deficient cancer - Emerging biomarkers of resistance to immune checkpoint inhibition. *Int J Biochem Cell Biol.* 2023;164:106477.
70. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(11):698-714.
71. Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell.* 2012;47(4):497-510.
72. Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2018;293(27):10524-35.
73. Zhao B, Rothenberg E, Ramsden DA, Lieber MR. The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(12):765-81.
74. Rossi MJ, DiDomenico SF, Patel M, Mazin AV. RAD52: Paradigm of Synthetic Lethality and New Developments. *Front Genet.* 2021;12:780293.
75. Luedeman ME, Stroik S, Feng W, Luthman AJ, Gupta GP, Ramsden DA. Poly(ADP) ribose polymerase promotes DNA polymerase theta-mediated end joining by activation of end resection. *Nat Commun.* 2022;13(1):4547.
76. Ramsden DA, Carvajal-Garcia J, Gupta GP. Mechanism, cellular functions and cancer roles of polymerase-theta-mediated DNA end joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(2):125-40.
77. Pilie PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(2):81-104.
78. Lecona E, Fernandez-Capetillo O. Targeting ATR in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(9):586-95.
79. Karnitz LM, Zou L. Molecular Pathways: Targeting ATR in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2015;21(21):4780-5.
80. Kumagai A, Dunphy WG. Repeated phosphopeptide motifs in Claspin mediate the regulated binding of Chk1. *Nat Cell Biol.* 2003;5(2):161-5.
81. Cimprich KA, Shin TB, Keith CT, Schreiber SL. cDNA cloning and gene mapping of a

- candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(7):2850-5.
82. Cliby WA, Roberts CJ, Cimprich KA, Stringer CM, Lamb JR, Schreiber SL, et al. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J*. 1998;17(1):159-69.
 83. de Klein A, Muijtjens M, van Os R, Verhoeven Y, Smit B, Carr AM, et al. Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol*. 2000;10(8):479-82.
 84. Brown EJ, Baltimore D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev*. 2003;17(5):615-28.
 85. Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, Cotsarelis G, et al. Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell*. 2007;1(1):113-26.
 86. O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet*. 2003;33(4):497-501.
 87. Ogi T, Walker S, Stiff T, Hobson E, Limsirichaikul S, Carpenter G, et al. Identification of the first ATRIP-deficient patient and novel mutations in ATR define a clinical spectrum for ATR-ATRIP Seckel Syndrome. *PLoS Genet*. 2012;8(11):e1002945.
 88. Murga M, Bunting S, Montana MF, Soria R, Mulero F, Canamero M, et al. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet*. 2009;41(8):891-8.
 89. Couch FB, Bansbach CE, Driscoll R, Luzwick JW, Glick GG, Betous R, et al. ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse. *Genes Dev*. 2013;27(14):1610-23.
 90. Davies SL, North PS, Hickson ID. Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(7):677-9.
 91. Wu L, Davies SL, Levitt NC, Hickson ID. Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem*. 2001;276(22):19375-81.
 92. Pichierri P, Rosselli F, Franchitto A. Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene*. 2003;22(10):1491-500.

93. Lossaint G, Larroque M, Ribeyre C, Bec N, Larroque C, Decaillet C, et al. FANCD2 binds MCM proteins and controls replisome function upon activation of s phase checkpoint signaling. *Mol Cell*. 2013;51(5):678-90.
94. Murphy AK, Fitzgerald M, Ro T, Kim JH, Rabinowitsch AI, Chowdhury D, et al. Phosphorylated RPA recruits PALB2 to stalled DNA replication forks to facilitate fork recovery. *J Cell Biol*. 2014;206(4):493-507.
95. Yoo HY, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG. Mcm2 is a direct substrate of ATM and ATR during DNA damage and DNA replication checkpoint responses. *J Biol Chem*. 2004;279(51):53353-64.
96. Chen YH, Jones MJ, Yin Y, Crist SB, Colnaghi L, Sims RJ, 3rd, et al. ATR-mediated phosphorylation of FANCI regulates dormant origin firing in response to replication stress. *Mol Cell*. 2015;58(2):323-38.
97. Zhang YW, Jones TL, Martin SE, Caplen NJ, Pommier Y. Implication of checkpoint kinase-dependent up-regulation of ribonucleotide reductase R2 in DNA damage response. *J Biol Chem*. 2009;284(27):18085-95.
98. D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong YT, Pellacani C, Kudo Y, et al. Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell*. 2012;149(5):1023-34.
99. Le TM, Poddar S, Capri JR, Abt ER, Kim W, Wei L, et al. ATR inhibition facilitates targeting of leukemia dependence on convergent nucleotide biosynthetic pathways. *Nat Commun*. 2017;8(1):241.
100. Chen CF, Ruiz-Vega R, Vasudeva P, Espitia F, Krasieva TB, de Feraudy S, et al. ATR Mutations Promote the Growth of Melanoma Tumors by Modulating the Immune Microenvironment. *Cell Rep*. 2017;18(10):2331-42.
101. Liu TT, Wang Q, Zhou Y, Ye B, Liu T, Yan L, et al. Discovery of a Meisoindigo-Derived PROTAC as the ATM Degradar: Revolutionizing Colorectal Cancer Therapy via Synthetic Lethality with ATR Inhibitors. *J Med Chem*. 2024;67(9):7620-34.
102. Neeb A, Herranz N, Arce-Gallego S, Miranda S, Buroni L, Yuan W, et al. Advanced Prostate Cancer with ATM Loss: PARP and ATR Inhibitors. *Eur Urol*. 2021;79(2):200-11.
103. Reaper PM, Griffiths MR, Long JM, Charrier JD, McCormick S, Charlton PA, et al. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nat Chem Biol*. 2011;7(7):428-30.
104. Heyza JR, Ekinici E, Lindquist J, Lei W, Yunker C, Vinothkumar V, et al. ATR inhibition overcomes platinum tolerance associated with ERCC1- and p53-deficiency by inducing

- replication catastrophe. *NAR Cancer*. 2023;5(1):zcac045.
105. Kawasumi M, Bradner JE, Tolliday N, Thibodeau R, Sloan H, Brummond KM, et al. Identification of ATR-Chk1 pathway inhibitors that selectively target p53-deficient cells without directly suppressing ATR catalytic activity. *Cancer Res*. 2014;74(24):7534-45.
 106. Kwok M, Davies N, Agathangelou A, Smith E, Petermann E, Yates E, et al. Synthetic lethality in chronic lymphocytic leukaemia with DNA damage response defects by targeting the ATR pathway. *Lancet*. 2015;385 Suppl 1:S58.
 107. Charrier JD, Durrant SJ, Golec JM, Kay DP, Knegt RM, MacCormick S, et al. Discovery of potent and selective inhibitors of ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related (ATR) protein kinase as potential anticancer agents. *J Med Chem*. 2011;54(7):2320-30.
 108. Baschnagel AM, Elnaggar JH, VanBeek HJ, Kromke AC, Skiba JH, Kaushik S, et al. ATR Inhibitor M6620 (VX-970) Enhances the Effect of Radiation in Non-Small Cell Lung Cancer Brain Metastasis Patient-Derived Xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2021;20(11):2129-39.
 109. Chen T, Yang F, Dai X, Yu Y, Sun Y, Wu X, et al. VE-822 Enhanced Cisplatin Chemotherapy Effects on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Drug-resistant Cells. *Curr Cancer Drug Targets*. 2023;23(6):482-95.
 110. Fokas E, Prevo R, Pollard JR, Reaper PM, Charlton PA, Cornelissen B, et al. Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death Dis*. 2012;3(12):e441.
 111. Josse R, Martin SE, Guha R, Ormanoglu P, Pfister TD, Reaper PM, et al. ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res*. 2014;74(23):6968-79.
 112. Shi Q, Shen LY, Dong B, Fu H, Kang XZ, Yang YB, et al. The identification of the ATR inhibitor VE-822 as a therapeutic strategy for enhancing cisplatin chemosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2018;432:56-68.
 113. Checkley S, MacCallum L, Yates J, Jasper P, Luo H, Tolsma J, et al. Bridging the gap between in vitro and in vivo: Dose and schedule predictions for the ATR inhibitor AZD6738. *Sci Rep*. 2015;5:13545.
 114. Foote KM, Nissink JWM, McGuire T, Turner P, Guichard S, Yates JWT, et al. Discovery and Characterization of AZD6738, a Potent Inhibitor of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related (ATR) Kinase with Application as an Anticancer Agent. *J Med Chem*. 2018;61(22):9889-907.
 115. Mohni KN, Kavanaugh GM, Cortez D. ATR pathway inhibition is synthetically lethal in cancer cells with ERCC1 deficiency. *Cancer Res*. 2014;74(10):2835-45.

116. Mohni KN, Thompson PS, Luzwick JW, Glick GG, Pendleton CS, Lehmann BD, et al. A Synthetic Lethal Screen Identifies DNA Repair Pathways that Sensitize Cancer Cells to Combined ATR Inhibition and Cisplatin Treatments. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125482.
117. Kiesel BF, Guo J, Parise RA, Venkataramanan R, Clump DA, Bakkenist CJ, et al. Dose-dependent bioavailability and tissue distribution of the ATR inhibitor AZD6738 (ceralasertib) in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2022;89(2):231-42.
118. Suzuki T, Hirokawa T, Maeda A, Harata S, Watanabe K, Yanagita T, et al. ATR inhibitor AZD6738 increases the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by inhibiting repair of DNA damage. *Oncol Rep*. 2022;47(4).
119. Vendetti FP, Karukonda P, Clump DA, Teo T, Lalonde R, Nugent K, et al. ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates CD8⁺ T cell-dependent antitumor activity following radiation. *J Clin Invest*. 2018;128(9):3926-40.
120. Wilson Z, Odedra R, Wallez Y, Wijnhoven PWG, Hughes AM, Gerrard J, et al. ATR Inhibitor AZD6738 (Ceralasertib) Exerts Antitumor Activity as a Monotherapy and in Combination with Chemotherapy and the PARP Inhibitor Olaparib. *Cancer Res*. 2022;82(6):1140-52.
121. Krajewska M, Fehrmann RS, Schoonen PM, Labib S, de Vries EG, Franke L, et al. ATR inhibition preferentially targets homologous recombination-deficient tumor cells. *Oncogene*. 2015;34(26):3474-81.
122. Huntoon CJ, Flatten KS, Wahner Hendrickson AE, Huehls AM, Sutor SL, Kaufmann SH, et al. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status. *Cancer Res*. 2013;73(12):3683-91.
123. Peasland A, Wang LZ, Rowling E, Kyle S, Chen T, Hopkins A, et al. Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2011;105(3):372-81.
124. Abu-Sanad A, Wang Y, Hasheminasab F, Panasci J, Noe A, Rosca L, et al. Simultaneous inhibition of ATR and PARP sensitizes colon cancer cell lines to irinotecan. *Front Pharmacol*. 2015;6:147.
125. Huehls AM, Wagner JM, Huntoon CJ, Karnitz LM. Identification of DNA repair pathways that affect the survival of ovarian cancer cells treated with a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in a novel drug combination. *Mol Pharmacol*. 2012;82(4):767-76.
126. Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB, Lukas C, Larsen DH, Povlsen LK, et al. ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell*. 2013;155(5):1088-103.
127. Ruiz S, Mayor-Ruiz C, Lafarga V, Murga M, Vega-Sendino M, Ortega S, et al. A

- Genome-wide CRISPR Screen Identifies CDC25A as a Determinant of Sensitivity to ATR Inhibitors. *Mol Cell*. 2016;62(2):307-13.
128. Toledo LI, Murga M, Zur R, Soria R, Rodriguez A, Martinez S, et al. A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(6):721-7.
 129. Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, et al. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol*. 2005;25(9):3553-62.
 130. Kulkarni-Gosavi P, Makhoul C, Gleeson PA. Form and function of the Golgi apparatus: scaffolds, cytoskeleton and signalling. *FEBS Lett*. 2019;593(17):2289-305.
 131. Petrosyan A. Unlocking Golgi: Why Does Morphology Matter? *Biochemistry (Mosc)*. 2019;84(12):1490-501.
 132. Vlad DB, Dumitrascu DI, Dumitrascu AL. Golgi's Role in the Development of Possible New Therapies in Cancer. *Cells*. 2023;12(11).
 133. Lowe M. Structural organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(1):85-93.
 134. Gosavi N, Lee HJ, Lee JS, Patel S, Lee SJ. Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J Biol Chem*. 2002;277(50):48984-92.
 135. Makhoul C, Gosavi P, Gleeson PA. Golgi Dynamics: The Morphology of the Mammalian Golgi Apparatus in Health and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:112.
 136. Petrosyan A. Onco-Golgi: Is Fragmentation a Gate to Cancer Progression? *Biochem Mol Biol J*. 2015;1(1).
 137. Gunn PA, Gliddon BL, Londrigan SL, Lew AM, van Driel IR, Gleeson PA. The Golgi apparatus in the endomembrane-rich gastric parietal cells exist as functional stable mini-stacks dispersed throughout the cytoplasm. *Biol Cell*. 2011;103(12):559-72.
 138. Kreft ME, Di Giandomenico D, Beznoussenko GV, Resnik N, Mironov AA, Jezernik K. Golgi apparatus fragmentation as a mechanism responsible for uniform delivery of uroplakins to the apical plasma membrane of uroepithelial cells. *Biol Cell*. 2010;102(11):593-607.
 139. Gillingham AK, Munro S. Finding the Golgi: Golgin Coiled-Coil Proteins Show the Way. *Trends Cell Biol*. 2016;26(6):399-408.
 140. Munro S. The golgin coiled-coil proteins of the Golgi apparatus. *Cold Spring Harb*

Perspect Biol. 2011;3(6).

141. Shin JJH, Crook OM, Borgeaud AC, Cattin-Ortola J, Peak-Chew SY, Breckels LM, et al. Spatial proteomics defines the content of trafficking vesicles captured by golgin tethers. *Nat Commun.* 2020;11(1):5987.
142. Ramirez IB, Lowe M. Golgins and GRASPs: holding the Golgi together. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(7):770-9.
143. Zhang X, Wang Y. GRASPs in Golgi Structure and Function. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:84.
144. Derby MC, van Vliet C, Brown D, Luke MR, Lu L, Hong W, et al. Mammalian GRIP domain proteins differ in their membrane binding properties and are recruited to distinct domains of the TGN. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 24):5865-74.
145. Gleeson PA, Lock JG, Luke MR, Stow JL. Domains of the TGN: coats, tethers and G proteins. *Traffic.* 2004;5(5):315-26.
146. Drin G, Morello V, Casella JF, Gounon P, Antonny B. Asymmetric tethering of flat and curved lipid membranes by a golgin. *Science.* 2008;320(5876):670-3.
147. Luke MR, Kjer-Nielsen L, Brown DL, Stow JL, Gleeson PA. GRIP domain-mediated targeting of two new coiled-coil proteins, GCC88 and GCC185, to subcompartments of the trans-Golgi network. *J Biol Chem.* 2003;278(6):4216-26.
148. Lieu ZZ, Derby MC, Teasdale RD, Hart C, Gunn P, Gleeson PA. The golgin GCC88 is required for efficient retrograde transport of cargo from the early endosomes to the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell.* 2007;18(12):4979-91.
149. Gosavi P, Houghton FJ, McMillan PJ, Hanssen E, Gleeson PA. The Golgi ribbon in mammalian cells negatively regulates autophagy by modulating mTOR activity. *J Cell Sci.* 2018;131(3).
150. Sohda M, Misumi Y, Ogata S, Sakisaka S, Hirose S, Ikehara Y, et al. Trans-Golgi protein p230/golgin-245 is involved in phagophore formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;456(1):275-81.
151. Derby MC, Lieu ZZ, Brown D, Stow JL, Goud B, Gleeson PA. The trans-Golgi network golgin, GCC185, is required for endosome-to-Golgi transport and maintenance of Golgi structure. *Traffic.* 2007;8(6):758-73.
152. Efimov A, Kharitonov A, Efimova N, Loncarek J, Miller PM, Andreyeva N, et al. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell.* 2007;12(6):917-30.

153. Miller PM, Folkmann AW, Maia AR, Efimova N, Efimov A, Kaverina I. Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol.* 2009;11(9):1069-80.
154. Grabski R, Balklava Z, Wyrozumska P, Szul T, Brandon E, Alvarez C, et al. Identification of a functional domain within the p115 tethering factor that is required for Golgi ribbon assembly and membrane trafficking. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 8):1896-909.
155. Sonnichsen B, Lowe M, Levine T, Jamsa E, Dirac-Svejstrup B, Warren G. A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol.* 1998;140(5):1013-21.
156. Witkos TM, Chan WL, Joensuu M, Rhiel M, Pallister E, Thomas-Oates J, et al. GORAB scaffolds COPI at the trans-Golgi for efficient enzyme recycling and correct protein glycosylation. *Nat Commun.* 2019;10(1):127.
157. Mayinger P. Signaling at the Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(5).
158. Mitchell SB, Iwabuchi S, Kawano H, Yuen TMT, Koh JY, Ho KWD, et al. Structure of the Golgi apparatus is not influenced by a GAG deletion mutation in the dystonia-associated gene *Tor1a*. *PLoS One.* 2018;13(11):e0206123.
159. Rivero S, Cardenas J, Bornens M, Rios RM. Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J.* 2009;28(8):1016-28.
160. Nakamura N, Lowe M, Levine TP, Rabouille C, Warren G. The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell.* 1997;89(3):445-55.
161. Barr FA, Nakamura N, Warren G. Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *EMBO J.* 1998;17(12):3258-68.
162. Ishida R, Yamamoto A, Nakayama K, Sohda M, Misumi Y, Yasunaga T, et al. GM130 is a parallel tetramer with a flexible rod-like structure and N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. *FEBS J.* 2015;282(11):2232-44.
163. Liu C, Mei M, Li Q, Roboti P, Pang Q, Ying Z, et al. Loss of the golgin GM130 causes Golgi disruption, Purkinje neuron loss, and ataxia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(2):346-51.
164. Lowe M, Gonatas NK, Warren G. The mitotic phosphorylation cycle of the cis-Golgi matrix protein GM130. *J Cell Biol.* 2000;149(2):341-56.
165. Sun KH, de Pablo Y, Vincent F, Johnson EO, Chavers AK, Shah K. Novel genetic tools reveal Cdk5's major role in Golgi fragmentation in Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell.* 2008;19(7):3052-69.

166. Barr FA, Puype M, Vandekerckhove J, Warren G. GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell*. 1997;91(2):253-62.
167. Tang D, Yuan H, Wang Y. The role of GRASP65 in Golgi cisternal stacking and cell cycle progression. *Traffic*. 2010;11(6):827-42.
168. Wang Y, Satoh A, Warren G. Mapping the functional domains of the Golgi stacking factor GRASP65. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4921-8.
169. Bachert C, Linstedt AD. Dual anchoring of the GRASP membrane tether promotes trans pairing. *J Biol Chem*. 2010;285(21):16294-301.
170. Heinrich F, Nanda H, Goh HZ, Bachert C, Losche M, Linstedt AD. Myristoylation restricts orientation of the GRASP domain on membranes and promotes membrane tethering. *J Biol Chem*. 2014;289(14):9683-91.
171. Wang Y, Seemann J, Pypaert M, Shorter J, Warren G. A direct role for GRASP65 as a mitotically regulated Golgi stacking factor. *EMBO J*. 2003;22(13):3279-90.
172. Bekier ME, 2nd, Wang L, Li J, Huang H, Tang D, Zhang X, et al. Knockout of the Golgi stacking proteins GRASP55 and GRASP65 impairs Golgi structure and function. *Mol Biol Cell*. 2017;28(21):2833-42.
173. Wood CS, Schmitz KR, Bessman NJ, Setty TG, Ferguson KM, Burd CG. PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *J Cell Biol*. 2009;187(7):967-75.
174. Farber-Katz SE, Dippold HC, Buschman MD, Peterman MC, Xing M, Noakes CJ, et al. DNA damage triggers Golgi dispersal via DNA-PK and GOLPH3. *Cell*. 2014;156(3):413-27.
175. Gao J, Gao A, Liu W, Chen L. Golgi stress response: A regulatory mechanism of Golgi function. *Biofactors*. 2021;47(6):964-74.
176. Li J, Ahat E, Wang Y. Golgi Structure and Function in Health, Stress, and Diseases. *Results Probl Cell Differ*. 2019;67:441-85.
177. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 4):437-41.
178. Letai A. Apoptosis: Directly Targeted at Last. *J Clin Oncol*. 2022;40(15):1693-5.
179. Carrara G, Saraiva N, Parsons M, Byrne B, Prole DL, Taylor CW, et al. Golgi anti-apoptotic proteins are highly conserved ion channels that affect apoptosis and cell migration. *J Biol Chem*. 2015;290(18):11785-801.

180. He Q, Liu H, Deng S, Chen X, Li D, Jiang X, et al. The Golgi Apparatus May Be a Potential Therapeutic Target for Apoptosis-Related Neurological Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:830.
181. Li Z, Zhang W, Xu J, Mo X. Cdk1 protects against oxygen-glucose deprivation and reperfusion-induced Golgi fragmentation and apoptosis through mediating GM130 phosphorylation. *J Mol Histol.* 2023;54(6):609-19.
182. Hicks SW, Machamer CE. Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1744(3):406-14.
183. Williams D, Hicks SW, Machamer CE, Pessin JE. Golgin-160 is required for the Golgi membrane sorting of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes. *Mol Biol Cell.* 2006;17(12):5346-55.
184. Maag RS, Mancini M, Rosen A, Machamer CE. Caspase-resistant Golgin-160 disrupts apoptosis induced by secretory pathway stress and ligation of death receptors. *Mol Biol Cell.* 2005;16(6):3019-27.
185. Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, et al. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol.* 2000;149(3):603-12.
186. Yin KJ, Deng Z, Hamblin M, Xiang Y, Huang H, Zhang J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury. *J Neurosci.* 2010;30(18):6398-408.
187. Cheng JP, Betin VM, Weir H, Shelmani GM, Moss DK, Lane JD. Caspase cleavage of the Golgi stacking factor GRASP65 is required for Fas/CD95-mediated apoptosis. *Cell Death Dis.* 2010;1(10):e82.
188. Lane JD, Lucocq J, Pryde J, Barr FA, Woodman PG, Allan VJ, et al. Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J Cell Biol.* 2002;156(3):495-509.
189. Chiu R, Novikov L, Mukherjee S, Shields D. A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *J Cell Biol.* 2002;159(4):637-48.
190. Walker A, Ward C, Sheldrake TA, Dransfield I, Rossi AG, Pryde JG, et al. Golgi fragmentation during Fas-mediated apoptosis is associated with the rapid loss of GM130. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(1):6-11.
191. Dippold HC, Ng MM, Farber-Katz SE, Lee SK, Kerr ML, Peterman MC, et al. GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4- phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell.* 2009;139(2):337-51.

192. Scott KL, Kabbarah O, Liang MC, Ivanova E, Anagnostou V, Wu J, et al. GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer. *Nature*. 2009;459(7250):1085-90.
193. Jia J, Chu L, Zeng X, Long N, Dong M, Yang Y, et al. GOLPH3 Promotes Vasculogenic Mimicry via the Epithelial Mesenchymal Transition in Glioblastoma Cells. *Turk Neurosurg*. 2023;33(5):722-30.
194. Yu WS, Zhou ZP, Zeng JF, Huang ZQ, Qiu CZ. Expression and Clinical Significance of Golgi Phosphoprotein 3 (GOLPH3) in Papillary Thyroid Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2023;31(5):324-30.
195. Zeng Z, Lin H, Zhao X, Liu G, Wang X, Xu R, et al. Overexpression of GOLPH3 promotes proliferation and tumorigenicity in breast cancer via suppression of the FOXO1 transcription factor. *Clin Cancer Res*. 2012;18(15):4059-69.
196. Sechi S, Frappaolo A, Karimpour-Ghahnavieh A, Piergentili R, Giansanti MG. Oncogenic Roles of GOLPH3 in the Physiopathology of Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3).
197. Song JW, Zhu J, Wu XX, Tu T, Huang JQ, Chen GZ, et al. GOLPH3/CKAP4 promotes metastasis and tumorigenicity by enhancing the secretion of exosomal WNT3A in non-small-cell lung cancer. *Cell Death Dis*. 2021;12(11):976.
198. Spano D, Colanzi A. Golgi Complex: A Signaling Hub in Cancer. *Cells*. 2022;11(13).
199. Machamer CE. The Golgi complex in stress and death. *Front Neurosci*. 2015;9:421.
200. Martins M, Fernandes AS, Saraiva N. GOLGI: Cancer cell fate control. *Int J Biochem Cell Biol*. 2022;145:106174.
201. Chardin P, McCormick F. Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell*. 1999;97(2):153-5.
202. Kaloni D, Diepstraten ST, Strasser A, Kelly GL. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis*. 2023;28(1-2):20-38.
203. Sarosiek KA, Ni Chonghaile T, Letai A. Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol*. 2013;23(12):612-9.
204. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of Cell Science*. 2009;122(4):437-41.
205. Bhola PD, Ahmed E, Guerriero JL, Sicinska E, Su E, Lavrova E, et al. High-throughput dynamic BH3 profiling may quickly and accurately predict effective therapies in solid tumors. *Sci Signal*. 2020;13(636).

206. Del Gaizo Moore V, Letai A. BH3 profiling--measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions. *Cancer Lett.* 2013;332(2):202-5.
207. Montero J, Letai A. Dynamic BH3 profiling-poking cancer cells with a stick. *Mol Cell Oncol.* 2016;3(3):e1040144.
208. Potter DS, Du R, Bohl SR, Chow KH, Ligon KL, Bueno R, et al. Dynamic BH3 profiling identifies pro-apoptotic drug combinations for the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Nat Commun.* 2023;14(1):2897.
209. Ryan J, Montero J, Rocco J, Letai A. iBH3: simple, fixable BH3 profiling to determine apoptotic priming in primary tissue by flow cytometry. *Biol Chem.* 2016;397(7):671-8.
210. Touzeau C, Ryan J, Guerriero J, Moreau P, Chonghaile TN, Le Gouill S, et al. BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics. *Leukemia.* 2016;30(3):761-4.
211. Abed MN, Abdullah MI, Richardson A. Antagonism of Bcl-XL is necessary for synergy between carboplatin and BH3 mimetics in ovarian cancer cells. *J Ovarian Res.* 2016;9:25.
212. Stamelos VA, Robinson E, Redman CW, Richardson A. Navitoclax augments the activity of carboplatin and paclitaxel combinations in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2013;128(2):377-82.
213. Valentini E, Di Martile M, Brignone M, Di Caprio M, Manni I, Chiappa M, et al. Bcl-2 family inhibitors sensitize human cancer models to therapy. *Cell Death Dis.* 2023;14(7):441.
214. Brotin E, Meryet-Figuire M, Simonin K, Duval RE, Villedieu M, Leroy-Dudal J, et al. Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int J Cancer.* 2010;126(4):885-95.
215. Witham J, Valenti MR, De-Haven-Brandon AK, Vidot S, Eccles SA, Kaye SB, et al. The Bcl-2/Bcl-XL family inhibitor ABT-737 sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin. *Clin Cancer Res.* 2007;13(23):7191-8.
216. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175-93.
217. Toledo LI, Murga M, Fernandez-Capetillo O. Targeting ATR and Chk1 kinases for cancer treatment: a new model for new (and old) drugs. *Mol Oncol.* 2011;5(4):368-73.
218. Nghiem P, Park PK, Kim Y, Vaziri C, Schreiber SL. ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proc Natl Acad*

Sci U S A. 2001;98(16):9092-7.

219. Jansen VM, Bhola NE, Bauer JA, Formisano L, Lee KM, Hutchinson KE, et al. Kinome-Wide RNA Interference Screen Reveals a Role for PDK1 in Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in ER-Positive Breast Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(9):2488-99.
220. Vendetti FP, Lau A, Schamus S, Conrads TP, O'Connor MJ, Bakkenist CJ. The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancer in vivo. *Oncotarget.* 2015;6(42):44289-305.
221. Biegala L, Gajek A, Szymczak-Pajor I, Marczak A, Sliwinska A, Rogalska A. Targeted inhibition of the ATR/CHK1 pathway overcomes resistance to olaparib and dysregulates DNA damage response protein expression in BRCA2(MUT) ovarian cancer cells. *Sci Rep.* 2023;13(1):22659.
222. Lloyd RL, Wijnhoven PWG, Ramos-Montoya A, Wilson Z, Illuzzi G, Falenta K, et al. Combined PARP and ATR inhibition potentiates genome instability and cell death in ATM-deficient cancer cells. *Oncogene.* 2020;39(25):4869-83.
223. Kim H, Xu H, George E, Hallberg D, Kumar S, Jagannathan V, et al. Combining PARP with ATR inhibition overcomes PARP inhibitor and platinum resistance in ovarian cancer models. *Nat Commun.* 2020;11(1):3726.
224. Fokas E, Prevo R, Hammond EM, Brunner TB, McKenna WG, Muschel RJ. Targeting ATR in DNA damage response and cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(1):109-17.
225. Wlodkowic D, Skommer J, Pelkonen J. Brefeldin A triggers apoptosis associated with mitochondrial breach and enhances HA14-1- and anti-Fas-mediated cell killing in follicular lymphoma cells. *Leuk Res.* 2007;31(12):1687-700.
226. Ignashkova TI, Gendarme M, Peschk K, Eggenweiler HM, Lindemann RK, Reiling JH. Cell survival and protein secretion associated with Golgi integrity in response to Golgi stress-inducing agents. *Traffic.* 2017;18(8):530-44.
227. Alborzinia H, Ignashkova TI, Dejure FR, Gendarme M, Theobald J, Wolfl S, et al. Golgi stress mediates redox imbalance and ferroptosis in human cells. *Commun Biol.* 2018;1:210.
228. Dusabimana T, Je J, Yun SP, Kim HJ, Kim H, Park SW. GOLPH3 promotes endotoxemia-induced liver and kidney injury through Golgi stress-mediated apoptosis and inflammatory response. *Cell Death Dis.* 2023;14(7):458.
229. Naydenov NG, Harris G, Brown B, Schaefer KL, Das SK, Fisher PB, et al. Loss of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein alpha (alphaSNAP) induces

- epithelial cell apoptosis via down-regulation of Bcl-2 expression and disruption of the Golgi. *J Biol Chem.* 2012;287(8):5928-41.
230. Li Y, Mu L, Li Y, Mi Y, Hu Y, Li X, et al. Golgi dispersal in cancer stem cells promotes chemoresistance of colorectal cancer via the Golgi stress response. *Cell Death Dis.* 2024;15(6):417.
231. Wang F, Chen X, Yuan D, Yi Y, Luo Y. Golgi reassembly and stacking protein 65 downregulation is required for the anti-cancer effect of dihydromyricetin on human ovarian cancer cells. *PLoS One.* 2019;14(11):e0225450.
232. van Raam BJ, Lacina T, Lindemann RK, Reiling JH. Secretory stressors induce intracellular death receptor accumulation to control apoptosis. *Cell Death Dis.* 2017;8(10):e3069.