

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

**SMAC MİMETİKLERİNİN NÖROBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNDE
APOPTOTİK VE NEKROPİTOTİK ÖLÜM MEKANİZMALARINA
ETKİSİ**

**Burçin BARAN
ORCID:0000-0002-0917-5443**

**ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Temel Onkoloji Doktora Programı**

DOKTORA TEZİ

**İZMİR
EKİM 2023**

TEZ KODU:DEU.HSI.PhD-2016970160

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

**SMAC MİMETİKLERİNİN NÖROBLASTOM HÜCRELERİ
ÜZERİNDE APOPTOTİK VE NEKROPİTOTİK ÖLÜM
MEKANİZMALARINA ETKİSİ**

**Burçin BARAN
ORCID:0000-0002-0917-5443**

**ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Temel Onkoloji Doktora Programı
DOKTORA TEZİ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nur OLGUN
ORCID:0000-0001-9591-0207**

**Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2021.KB.SAG.044 proje numarası ve Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu
(TUBİTAK) tarafından 2214-A programı 2018/2 1059B141801571 proje
numarası ile desteklenmiştir.**

**İZMİR
EKİM 2023**

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “SMAC Mimetiklerinin Nöroblastom Hücreleri Üzerinde Apoptotik ve Nekroptotik Ölüm Mekanizmalarına Etkisi” başlıklı Doktora tezimin içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Burçin BARAN

Tarih: 02/11/2023

TEŞEKKÜR

“Çölü güzel yapan şey,” dedi küçük prens, “bir yerlerde bir kuyu sak olması...” – Küçük Prens kitabından alıntı...

Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı’nda doktora yaptığım sürece desteklerini esirgemeyen ve yol gösteren başta danışman hocam *Prof. Dr. Nur Olgun* olmak üzere bölümdeki Değerli Hocalarım *Prof. Dr. Safiye Aktaş*, *Prof. Dr. Zekiye Altun*, *Prof. Dr. Hilal Koçdor’a*,

Birlikte güzel ve sınırsız bir dostluk paylaştığımız sevgili çalışma arkadaşlarım *Sena Ekmen*, *Gamze Sanlav*, *Merve Tütüncü*, *Güner Yaman* çok değerli ofis arkadaşlarım *Hongling Yuan*, *Ayşe Vasfiye Ertuğrul’a* ve Temel Onkoloji AD’ da bu süreçte birlikte yol arkadaşlığı yaptığım bölümdeki tüm arkadaşlarıma, akım sitometrisinde yardım eden *Dr. Halil Ateş’e* ve Onkoloji Enstitüsü personeline ve Enstitü sekreterimiz *Filiz Yılmaz’a*,

*“Bir annenin sevgisi dünyadaki en tatlı ve saf sevgidir.
Diğer herkes terk ettiğinde sabırlı ve bağışlayıcıdır,
Kalp kırılma bile asla başarısızlığa uğramaz ya da duraksamaz
Bir annenin sevgisi her şeye inanır, her şeye katlanır ve umut eder.”*

İyi günde kötü günde her zaman yanımda olan,
Destegini her zaman arkamda hissettiğim değerli anneciğim *Emine Engin Baran’a*,
Değerli *Aileme*, her zaman bana yol gösteren güzeller güzeli *Meltem Abla’ma*,
Maalesef artık hayatta olmayan ama üzerimde büyük emekleri olan *Babama*,
Anneannem ve *Dedeme...*

En derin ve en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	
ŞEKİLLER DİZİNİ	
SİMGELER ve KISALTMALAR	IV
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	2
1.3 Araştırmanın Soru ve Hipotezleri	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nöroblastom	4
2.1.1. Nöroblastom Etiyolojisi	4
2.1.2. Nöroblastom Kökeni	7
2.1.3. Nöroblastom Hücrelerinde Görülen Heterojenite ve Mutasyonlar	7
2.1.4. Nöroblastom Risk Sınıflandırmasında Kullanılan Kopya Sayısı	
Değişimleri ve Mutasyonlar	9
2.2. Kanserde Ölüm Mekanizmaları ve SMAC Mimetiklerin Önemi	12
2.2.1. Hücre Ölüm Mekanizmaları	12
2.2.2. Apoptotik Hücre Ölümü	13
2.2.3. Nekroptotik Hücre Ölümü	16
2.2.4. İnhibitör Apoptoz Proteinleri (IAP)	17
2.2.5. Sekonder Mitokondriyel Kaspaz Aktivatörü (SMAC) Proteini	18
2.2.6. SMAC Mimetikleri	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Araştırmanın Tipi	21
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı	21
3.3. Çalışma Materyali	21
3.4. Araştırmanın Değişkeni	22
3.5. Veri Toplama Araçları	22

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	32
3.7. Araştırmanın Sınırlılıkları	32
3.8. Etik Kurul Onayı	
4. BULGULAR	
4.1. Hücre Canlılık Analizleri	34
4.2. Mikroskopi Görüntüleri	41
4.3. Akım Sitometri Analizleri	44
4.4. RNA Sekanslama Analizleri	46
4.5. Eş-zamanlı Kantitatif PCR (Q-PCR) Analizleri	54
4.5.1 LCL-161 Uygulaması Sonucunda Gen Ekspresyon Değişimleri	54
4.5.2 Kemoterapi ve LCL-161 Uygulaması Sonucunda Gen Ekspresyon Değişimleri	56
5.TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
7.KAYNAKLAR	64
8. EKLER	73
8.1 EK.1 Tez Önerisi Kabulü	73
8.2 EK.2 Etik kurul raporu	74
8.2 EK.3 Tezle ilişkili araştırma makaleleri	76
8.3 EK.4 Tezle ilişkili bildiriler	80
8.4 EK.5 Katkı	85
8.5 EK.6 Özgeçmiş	86

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	23
Tablo 2. Q-PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler	30
Tablo 3. RNA sekanslama sonuçlarına göre en fazla değişken ekspresyon gösteren 100 gen	49



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. TPOG NB -2020 Protokolüne göre risk sınıflandırması kriterleri (TPOG-NB-2020 protokolünden (www.tpog.org.tr) alınmıştır	5
Şekil 2. Yıllara bağlı olarak tanımlanan hücre ölüm mekanizmaları.....	12
Şekil 3. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri.....	13
Şekil 4. İçsel ve Dışsal Apoptotik Yolaklar.....	14
Şekil 5. ER-stres aracılıklı olarak hücre ölümünün indüklenmesi.....	16
Şekil 6. IAP ailesi	17
Şekil 7. LCL-161'in 24 saat ve 48 saat sürelerde SH-SY5Y hücrelerinde farklı dozlarda (0-200µM) hücre canlılığına etkisi incelenmiştir.....	34
Şekil 8. Cisplatin (0-100µM) ve LCL-161 (10µM) kombine uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde 24 saatlik canlılığa olan etkisi	36
Şekil 9. Cisplatin (0-100µM) ve LCL-161 (10µM) kombine uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde 48 saatlik canlılığa olan etkisi	36
Şekil 10. LCL-161'in 24 saat ve 48 saat sürelerde KELLY hücrelerinde farklı dozlarda (0-200µM) hücre canlılığına etkisi incelenmiştir.....	37
Şekil 11. Cisplatin (0-100µM) ve LCL-161 (10µM) kombine uygulamasının KELLY hücreleri üzerinde 24 saatlik canlılığa olan etkisi	38
Şekil 12. Cisplatin (0-100µM) ve LCL-161 (10µM) kombine uygulamasının KELLY hücreleri üzerinde 48 saatlik canlılığa olan etkisi	38
Şekil 13. Etoposid (0-200µM) ve LCL-161 (10µM) kombine uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde 24 saatlik canlılığa olan etkisi	39
Şekil 14. Etoposid (0-200µM) ve LCL-161 (10µM) kombine uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde 48 saatlik canlılığa olan etkisi	39
Şekil 15. Etoposid (0-200µM) ve LCL-161 (10µM) kombine uygulamasının KELLY hücreleri üzerinde 24 saatlik canlılığa olan etkisi	40
Şekil 16. Etoposid (0-200µM) ve LCL-161(10µM) kombine uygulamasının KELLY hücreleri üzerinde 48 saatlik canlılığa olan etkisi	40
Şekil 17. LCL-161(100 µM) ile muamele edilmiş ve kontrol SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopi görüntüleri (24 -48 -72 saatlik)	41
Şekil 18. Cisplatin (100 µM) tek başına ve Cisplatin (100 µM) & LCL-161(10 µM) ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (24-48-72 saatlik)	42
Şekil 19. Etoposid (100 µM) tek başına ve Etoposid (100 µM) & LCL-161(10 µM) ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (24-48-72 saatlik)	43
Şekil 20. SH-SY5Y hücrelerinde AnnexinV/PI incelemesi	44
Şekil 21. KELLY hücrelerinde Annexin V/PI incelemesi.....	45

Şekil 22. Negatif kontrol ve LCL-161 uygulanan koşullardaki hücreler arasındaki gen ekspresyon değişimleri	46
Şekil 23. En çok anlamlı değişkenlik gösteren 50 gen ısı haritası grafiğinde gösterilmesi	47
Şekil 24. Negatif kontrol ve LCL-161 uygulanan koşullardaki hücreler arasında gen ekspresyonu anlamlı değişiklik gösteren genler volkan grafiği ile gösterilmesi	48
Şekil 25. Ekspresyonu en fazla anlamlı değişkenlik gösteren ilk 5 genin normalize edilmiş okumaları.....	48
Şekil 26. En çok diferansiyel eksprese olan 50 protein arasındaki bağlantıların STRING veri tabanında incelenmesi	52
Şekil 27. Gene ontoloji analizleri ile anlamlı değişkenlik gösteren genlerle ilişkili yollar belirlenmesi.....	53
Şekil 28. Q-PCR ile LCL-161 tek başına uygulamasına bağlı olarak gen ekspresyonlarının değişimlerinin incelenmesi	55
Şekil 29. SH-SY5Y hücrelerinde uygulanan koşullara bağlı olarak apoptotik ve nekroptotik gen ekspresyon değişimlerinin gösterilmesi	57
Şekil 30. KELLY hücrelerinde uygulanan koşullara bağlı olarak apoptotik (Kaspaz 3, Kaspaz 8, IAP1, IAP2, XIAP) setin rölatif gen ekspresyon değişimlerinin gösterilmesi	59
Şekil 31. ER-stres yanıtında rol oynayan genler.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADRN	Adrenerjik alt tip hücreler
AKNA	AT-Hook İçeren Transkripsiyon Faktör
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz
AMOT	Angiomotin
ARID1A	AT açısından zengin etkileşimli alan içeren protein 1A
ASK1	Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
AVPI	Alanin-valin-prolin-isolösin
B-actin	Beta-aktin
CARD	Kaspaz bağlanma alanı
CAS3	Kaspaz 3
CAS8	Kaspaz 8
CDDP	Cisplatin
CHOP	C/EBP-Homolog Protein
cIAP1(IAP1)	Hücrel (cellular) IAP 1
cIAP2(IAP2)	Hücrel (cellular) IAP 2
DAB	3',3-Diaminobenzidin
DE	Diferansiyel eksprese edilen genler
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfoksit
DNA	Deoksiribonükleotid asit

DR	Death (ölüm) reseptörleri
ER	Endoplazmik retikulum
ETO	Etoposid
FADD	Fas Assosiyе Death Domain
FBS	Fetal Bovin Serum
FDR	False discovery rate
FISH	Florasın in situ hibridizasyon
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GO	Gen ontoloji
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IAP	İnhibitör apoptoz proteinleri
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
IRE1-α	Inositol gerektiren protein-1 α
KEGG	Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
LD50	Lethal doz 50
LPS	Lipopolisakkartiler
JNK	Jun-N-terminal kinaz
MES	Mezenkimal alt tip hücre
MLKL	Mixed lineage kinaz
NAIP	Nöronal apoptoz inhibitör protein
NB	Nöroblastom
NCC	Nöral krest hücreleri
PBS	Fosfat salın tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

PDÖ	Programlı Hücre Ölümü
PERK	Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz
POG	Pediyatrik Onkoloji Grubu
PPP1R15A	Protein Fosfataz 1 Regulator Subunit 15A
RIPK1	Reseptör Interaksiyon Kinaz 1
RIPK3	Reseptör Interaksiyon Kinaz 3
RNA	Ribonükleotid asit
SMAC	Sekonder Mitokondriyel Aktivatör Kaspaz
TARGET	Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments
TLR4	Toll benzeri reseptörler 4
TPOG	Türk Pediyatrik Onkoloji Grubu
TRAF2	Tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör-2
TRAIL	TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligandlar
TRIB3	Tribbles Pseudokinaz 3
XIAP	X kromozom bağımlı IAP

SMAC MİMETİKLERİNİN NÖROBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNDE APOPTOTİK VE NEKROPİTOTİK ÖLÜM MEKANİZMALARINA ETKİSİ

Doktora Tezi

Burçin BARAN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

SMAC proteinleri, hücre içerisindeki inhibitör apoptoz proteinlerine bağlanır ve onları ubiquitineleyerek parçalanmasını sağlar veya direkt onları bloklarlar. Bu sayede hücre ölüm yanıtının başlatılmasına katkıda bulunurlar. SMAC mimetikleri, SMAC proteinlerinin 3 boyutlu yapısını taklit ederek geliştirilen kimyasal ajanlardır. Birçok farklı hematolojik veya solid kanser hücre hatlarında SMAC mimetiklerinin hücre ölümünü ve kemoterapi etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. Nöroblastom çocukluk çağıının en sık görülen solid tümörüdür. Hastaların sağ kalım oranları farklılık göstermekle birlikte özellikle yüksek risk grubu hastaların sağ kalımları halen yüzde ellinin altındadır. Yüksek riskli hastalar için daha iyi tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan çalışmada SMAC mimetik çeşitlerinden biri olan LCL-161'in nöroblastom tedavisinde aday ajan olup olamayacağının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada farklı prognostik fenotipleri yansıtan iki insan nöroblastom hücre hattı kullanılmıştır: MYCN- pozitif KELLY ve MYCN-negatif SH-SY5Y. LCL-161'in mono veya kombine ajan olarak Etoposid ve Cisplatin ilaçları ile hücre canlılığı ve apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkisi incelenmiştir. KELLY hücrelerinin LCL-161'e ve uygulanan kemoterapi ajanlarına SH-SY5Y hücrelerine göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Kombine kullanımda LCL-161, bu hücre hatlarında Cisplatin etkinliğini arttırırken Etoposid etkinliğini arttıramamıştır.

Çalışmanın devamında, mono olarak LCL-161 uygulamasının total gen ekspresyonu değişimleri üzerindeki etkisi RNA sekanslama yöntemiyle, apoptotik, anti-apoptotik ve nekroptotik gen ekspresyonları üzerindeki etkisi eş-zamanlı kantitatif PCR yöntemleriyle incelenmiştir. RNA sekanslama sonuçlarında, LCL-161 uygulamasının hücrelerde endoplazmik retikulum stresi (ER) ile ilişkili genlerin ekspresyonunda önemli bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. ER-stres ilişkili genlerin ekspresyonundaki artış PCR çalışmaları ile de doğrulanmıştır. Bunun haricinde LCL-161 uygulamasına bağlı olarak bazı apoptotik genlerde artış, bazı anti-apoptotik genler de azalış saptanırken, nekroptotik genler de ise herhangi bir değişim izlenmemiştir.

Sonuç olarak, yapılan tez çalışmamızda ilk defa hücrelerde LCL-161 yanıtında ER-stres aracılıklı yolların da yer aldığını ve bunun LCL-161 tarafından indüklenen apoptotik yanıtın regülasyonunda önemli bir rol üstlenebileceğini ortaya koyduk.

Anahtar kelimeler: Nöroblastom, SMAC mimetik, hücre ölümü, apoptoz, endoplazmik retikulum stres, nekroptoz

Tez sayfa adedi:111

Danışman: Prof. Dr. Nur Olgun



THE EFFECT OF SMAC MIMETICS ON APOPTOTIC AND NECROPTOTIC CELL DEATH MECHANISMS ON NEUROBLASTOMA CELLS

Doctorate Thesis

Burçin BARAN

DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY, HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Basic Oncology

ABSTRACT

SMAC proteins bind to inhibitory apoptosis proteins within the cell and ubiquitinate them, causing their degradation or directly blocking them. In this way, they contribute to initiating the cell death response. SMAC mimetics are chemical agents developed by mimicking the 3D structure of SMAC proteins. SMAC mimetics have increased cell death and chemotherapy efficacy in many hematological or solid cancer cell lines. Neuroblastoma is the most common solid tumor of childhood. Although the survival rates of patients vary, the survival of especially high-risk group patients is still below fifty percent. There is a need to develop better treatments for high-risk patients.

The study aimed to investigate whether LCL-161, one of the SMAC mimetic varieties, could be a candidate agent in the treatment of neuroblastoma. The study used two human neuroblastoma cell lines reflecting different prognostic phenotypes: MYCN-positive KELLY and MYCN-negative SH-SY5Y. The effect of LCL-161 as a mono agent or as a combined agent with the drugs Etoposide and Cisplatin on cell viability and apoptotic cell death was examined. It was determined that KELLY cells were more sensitive to LCL-161 and applied chemotherapy agents than SH-SY5Y cells. In combined use, LCL-161 increased the effectiveness of Cisplatin in these cell lines but failed to increase the effectiveness of Etoposide.

In the continuation of the study, the effect of mono LCL-161 application on total gene expression changes was examined by RNA sequencing method, and its effect on apoptotic, anti-apoptotic, and necroptotic gene expressions was examined by real-time quantitative PCR method. RNA sequencing results showed that LCL-161 treatment led to a significant increase in the expression of endoplasmic reticulum stress (ER)-related genes in cells. PCR studies also confirmed the increase in the expression of ER-stress-related genes. Furthermore, an increase in some apoptotic genes and a decrease in some anti-apoptotic genes were detected due to LCL-161 treatment, while no change was observed in necroptotic genes.

In conclusion, in our thesis study, we revealed for the first time that ER-stress-mediated pathways are involved in the LCL-161 response in cells and that this may play an essential role in the regulation of the apoptotic response induced by LCL-161.

Keywords: Neuroblastoma, SMAC mimetic, cell death, apoptosis, endoplasmic reticulum stress

Pages: 111

Advisor: Prof. Dr. Nur Olgun



1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Nöroblastom (NB), erken çocukluk döneminde adrenal medulla ve paravertebral sempatik gangliyonların normal gelişimini etkileyen embriyonel bir tümördür (1). NB çocuklarda en sık görülen solid tümördür ve çocukluk çağı kanserine bağlı ölümlerin ~%15'inden sorumludur (2). Hastalığın kliniği heterojen bir davranış sergilemektedir. 1 yaş altı bebeklerde spontane gerileme gözlenirken 1 yaş üzerinde ise metastatik hastalık riski çok daha yüksektir (3). Hastalığın seyri bazı klinik patolojik faktörlere göre öngörülebilmektedir ve bu faktörlere göre hastalar risk gruplarına ayrılmakta ve buna göre tedavi edilmektedirler (4). Bu sınıflandırmaya göre düşük ve orta risk hasta grubu için 5 yıllık sağ kalım oranları %90'lar civarında iken yüksek risk grubundaki hastalarda ise 5 yıllık sağ kalım oranları %40-50 civarında seyretmektedir (5; 6). Yüksek risk hasta grubunda agresif tümör davranışı ve relaps gözlenmesinin yanı sıra yüksek doz kemoterapi kullanımına bağlı gelişen toksisite ve komorbidite ve mortalite de yüksektir (7). Halen yüksek risk grubunda hastaların sağ kalımını arttırabilecek yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

İnhibitör apoptoz proteinleri (IAP), hücre ölüm yollarını bloke eden proteinlerdir (8). Sekonder Mitokondriyel Aktivatör Kaspaz (SMAC) proteinleri mitokondriyel membran içerisinde bulunan bir proteindir. SMAC'lar, IAP'leri parçalayarak ve ya inhibe ederek hücrede pro-apoptotik ve ya pro-nekroptotik yanıtı başlatırlar (9). SMAC mimetikleri, SMAC proteinlerinin yapısı çekirdek kısmında bulunan Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) motif kısmını taklit edilerek geliştirilmiş ajanlardır. SMAC mimetiklerinin, farklı firmalar tarafından geliştirilmiş farklı çeşitleri vardır. İçerdikleri AVPI domainlerine göre monovalent (tek AVPI domain içermektedir) veya bivalent (çift AVPI domain içermektedir) olarak iki kategoride yer alırlar (10). LCL-161, Novartis firması tarafından geliştirilmiş monovalent tipte bir SMAC mimetiktir. Hücre içerisinde IAP-1, IAP-2 ve XIAP'ye bağlandığı gösterilmiştir. LCL-161'in farklı hücre hatlarında hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Pediatrik Pre-klinik Testing Program (PPTP) kapsamında LCL-161'in etkinliği 23 farklı pediatrik hücre hattında ve fare modellerinde denenmiştir. Farklı hücre hatlarında LCL-161'in etkinliğinin farklı düzeylerde olduğu saptanmıştır (11). *Najem S ve ark.* Tarafından yapılan bir başka çalışmada ise SMAC mimetik ve kemoterapi tek başına/ kombine etkinliği farklı nöroblastom hücre hatları üzerinde denenmiştir. 50µM LCL-161 dozunun çalışmada kullanılan SK-N-SH, KELLY, SK-N-AS gibi

hücre hatlarının %50'sinde apoptoza yol açtığı gözlenmiştir (LD50). Devamında 10µM LCL-161 ile Vinka alkaloidi (Vinblastin, Vinkristin, Vindesin), Antrasiklin (Doksorubicin, Daunorubisin, Idarubisin), DNA topoizomera inhibitörleri (Etoposid, SN-38, Topotecan) kullanımının hücre ölümü üzerindeki etkinliği ölçülmüştür. LCL-161'in Vinka alkaloidlerinin etkinliğini arttırdığı gözlenmiştir. Farklı ilaçlarla kombine etkinliklerdeki değişimlerin nedeni tam olarak bilinmemektedir (12).

Biz de bu çalışmamızda LCL-161'in anti-kanser ajanı olarak etkinliğini daha detaylı araştırmak amaçladık. Bu amaçla hem LCL-161'in tek başına (mono terapi olarak) hem de kemoterapi ilaçları Etoposid ve Cisplatin ile kombine uygulamasının hücrelerde sağ kalımı, apoptotik ve nekrotik ölümü nasıl etkilediği çalışıldı. Hem de LCL-161 uygulamasının hücrelerde total gen ekspresyon değişimleri ve apoptotik, anti-apoptotik, nekroptotik gen ekspresyonları üzerindeki etkisi araştırıldı.

1.2. Araştırmanın Amacı

SMAC mimetik çeşitlerinden biri olan, monovalent tipte LCL-161'in hem tek başına hem de NB tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapi ilaçları Cisplatin veya Etoposid ilaçları ile kombine etkinliğinin NB hücre hatları üzerinde incelenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmada iki farklı prognostik grubu yansıtan insan hücre hatları: kötü prognozu yansıtan MYCN pozitif KELLY ve iyi prognozu yansıtan MYCN negatif SH-SY5Y nöroblastom hücre hatları kullanılmıştır. Bu sayede LCL-161 etkinliğinin, farklı klinik özellik gösteren NB hatlarında çalışılması amaçlanmıştır.

İlk etapta, LCL-161'in tek başına (mono ajan) ve Cisplatin veya Etoposid ilaçlarıyla kombine kullanımının hücre canlılığı üzerinde etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı doz ve sürelerde (24h ve 48h) LCL-161 uygulaması, LCL-161 ve kemoterapi kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi ölçülmüştür. Devamında AnnexinV/PI boyaması yapılarak ilaç uygulamalarına bağlı tetiklenen apoptotik ve nekrotik ölüm oranlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

İkinci etapta ise LCL-161'in etkinliğinin daha moleküler düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır. RNA sekanslama ile total gen ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve LCL-161 uygulamasına bağlı olarak en çok diferansiyel eksprese olan genler ve bunların alakalı oldukları yollar belirlenmiştir. Bunun devamında yine eş zamanlı kantitatif PCR yöntemiyle pro-apoptotik, anti-apoptotik ve nekroptotik gen ekspresyonları incelenmiştir.

1.3. Araştırmanın Soru ve Hipotezleri

Yapılan araştırmamızda SMAC mimetik çeşitlerinden biri olan LCL-161'in hem tek başına hem de kemoterapi ilaçları Cisplatin ve Etoposid ile kombine olarak insan nöroblastom hücre hatlarında etkinliğinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

- LCL-161'in tek başına ve Cisplatin veya Etoposid kemoterapi ajanları ile kombine olarak uygulandığında SH-SY5Y ve KELLY hücre canlılığına etkisi nedir? Uygulanan kemoterapi ilaçlarının etkinliğini arttırıcı yönde bir etkisi var mıdır?
- LCL-161'in tek başına ve Cisplatin ve Etoposid kemoterapi ajanları ile SH-SY5Y ve KELLY hücre hatlarında apoptotik ve nekroptotik ölüme etkisi nedir?
- LCL-161'in tek başına total gen ekspresyonu üzerindeki etkisi ve en çok diferansiyel eksprese olan genler ve bu genlerin alakalı oldukları hücre sinyal yolları nelerdir?
- LCL-161'in tek başına ve Cisplatin ve Etoposid ile SH-SY5Y ve KELLY hücre hatlarında apoptotik (pro-apoptotik ve anti-apoptotik) ve nekroptotik gen ekspresyonları üzerindeki etkisi nedir?

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nöroblastom

2.1.1 Nöroblastom Etiyolojisi

Nöroblastom (NB) çocukluk çağıının en sık görülen ekstra-kraniyal solid tümörüdür. Hastalık ilk olarak 1910 yılında James Homer Wright tarafından tanımlanmıştır. NB hastalarının %90'ını beş yaş altı çocuklar oluşturmaktadır (13;14). NB görülme sıklığı açısından tüm çocukluk kanserleri arasında %6-%10'luk bir dilimde olsa da çocukluk kanserleri arasında kansere bağlı ölümlerin %12-15'ini oluşturmaktadır (15; 16).

NB gelişmekte olan sempatik sinir sistemindeki nöral krest hücrelerinde köken almaktadır (17). Primer tümör, sempatik sinir sisteminin bulunduğu herhangi bir yerde oluşabilmektedir. 1990-2002 yılları arasında yapılan uluslararası NB hasta kohort çalışmasında göre; primer tümör en çok adrenal bölge (% 47) olarak sırasıyla abdomen/retroperitonel (% 24), trokal bölge (%15), daha az sıklıkla boyun (% 3), pelvik (% 3) ve farklı bölgelerde (% 8) gözlenmiştir (18). Yine aynı çalışmada adrenal bölgede oluşan tümörlerin daha kötü prognozla ilişkili oldukları saptanmıştır (18). Evre 4 ve 4S olan hastalarda metastatik bölgeler incelendiğinde tümörün en çok metastaz yaptığı kısımlar, kemik iliği (%70,5), daha sonra kemik (%55,7), lenf nodu (%30,9), karaciğer (%29,6), intrakraniyal ve orbital bölgeler (% 18,2), akciğer (% 3,3) ve merkezi sinir sistemi (% 0,6) olarak saptanmıştır (19). Metastatik bölge tek başına hastalığın prognozunu belirlemek açısından yeterli değildir ancak diğer faktörlerle de birlikte değerlendirildiğinde hastalarda sağ kalımı düşürmektedir (19).

NB, klinik olarak heterojen özelliğe sahip bir tümördür. 18 aydan küçük infantlarda spontane gerileme, ganglionöroblastom, ganglionöroma gibi benin tümörlere farklılaşma gösterebilirken, daha büyük çocuklarda (>18 ay) ise metastaz ve uygulanan yoğun kemoterapi rejimlerine dirençli bir hastalık gözlenebilmektedir (20).

NB tedavisinde, dünyada ve ülkemizde de *International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)* sınıflandırmasına göre risk grupları oluşturulmakta ve bu risk gruplarına göre tedavi rejimleri belirlenmektedir. Bu risk grupları belirlenirken hastanın yaşı, tümörün histolojisi, tümörün evresi, MYCN kopya sayısı düzeyi (>10), 11q velp kayıpları, 17q kazanımları ve DNA ploidi durumları hep birlikte değerlendirilmektedir. Bu kriterlere göre

hastalar düşük risk, orta risk ve yüksek risk grubu olarak sınıflandırılmakta ve hastalara buna göre tedavi rejimi uygulanmaktadır (21). Ülkemizde de bu sınıflandırma 2003 yılından beri *Türk Pediatrik Onkoloji Grubu'nun (TPOG) Nöroblastom* çalışması tarafından yapılmaktadır. 2003 yılında başlayan, 2009 protokolü ve şu an 2020 protokolü ile devam eden bu çalışma kapsamında hastanın evresi (L1, L2, M, MS), yaşı (18 ay < veya 18 ay >), histolojik kategorisi (ganglionörom-ganglionöroblastom intermikst, ganglionöroblastom-nöroblastom), tümörün farklılaşması (diferansiye veya adifferansiye), tümörün içerdiği MYCN kopya sayısı (>10), 11q aberasyonu (var, yok) ve DNA ploidi (diploid, hiperdiploid) birlikte değerlendirilerek hastalar risk gruplarına ayrılmaktadır. Daha önceki protokollerde 1p ve 17q aberasyonları da değerlendirilirken yeni protokolde bu aberasyonlar prognostik bir değer taşımadığı düşünülerek çıkartılmışlardır (5, 22) (Figür 1). TPOG-2009 çalışması sonuçlarına göre Türk NB hasta grubunun %70'inin ilerlemiş hastalığa sahip olduğu (evre 3 ve 4) ve yine hastaların %59,1'nin yüksek risk grubunda olduğu saptanmıştır (5). Yine TPOG-2009 çalışmasının sonuçlarına göre düşük risk evre I hastalarda 2,5 ve 10 yıllık genel sağ kalım ve olaysız sağ kalım oranları %99 ve %98, düşük risk evre II hastalarda 2, 5 ve 10 yıllık genel sağ kalım ve olaysız sağ kalım oranları %98 ve %92, orta risk hastalarda 5 ve 10 yıllık genel sağ kalım ve olaysız sağ kalım oranları %93 ve %84, yüksek risk hastalarda 3,5 ve 10 yıllık genel sağ kalım sırasıyla %62, %49, %29, 3,5 ve 10 yıllık olaysız sağ kalım ise %47, %37 ve %35 olarak bulunmuştur (5).

ÇOK DÜŞÜK RİSK GRUBU

a)

INRG EVRE	Yaş (ay)	Histolojik kategori	Tümör farklılaşma derecesi	MYCN	11q aberrasyonu	Ploidi
L1/L2	Herhangi	Ganglionörom Matür, Ganglionöroblastom intermikst	Herhangi	Amplifikasyon yok	Herhangi	Herhangi
L1	Herhangi	Ganglionöroblastom- Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon yok	Herhangi	Herhangi
MS	<18ay	Ganglionöroblastom- Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon yok	yok	Herhangi

b) **DÜŞÜK RİSK GRUBU**

INRG EVRE	Yaş (ay)	Histolojik kategori	Tümör farklılaşma derecesi	MYCN	11q aberasyonu	Ploidi
L2	<18ay	Ganglionöroblastom (matür ve intermikst dışında) - Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon yok	yok	Herhangi
L2	≥18ay	Ganglionöroblastom nodüler- Nöroblastom	Diferansiye	Amplifikasyon yok	yok	Herhangi
M	<18ay	Ganglionöroblastom- Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon yok	yok	Hiperdiploid

c) **ORTA RİSK GRUBU**

INRG EVRE	Yaş (ay)	Histolojik kategori	Tümör farklılaşma derecesi	MYCN	11q aberasyon	Ploidi
L2	<18ay	Ganglionöroblastom Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon yok	Var	Herhangi
L2	≥18ay	Ganglionöroblastom Nöroblastom	Andiferansiye az diferansiye	Amplifikasyon yok	yok	Herhangi
L2	≥18ay	Ganglionöroblastom Nöroblastom	Diferansiye	Amplifikasyon yok	Var	Herhangi
M	<18ay	Ganglionöroblastom Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon yok	yok	Diploid
MS	<18ay	Ganglionöroblastom Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon yok	Var	Herhangi

d) **YÜKSEK RİSK GRUBU**

INRG EVRE	Yaş (ay)	Histolojik kategori	Tümör farklılaşma derecesi	MYCN	11q aberasyon	Ploidi
L1	Herhangi	Herhangi Ganglionöroblastom Nöroblastom (matür GN dışında)	Herhangi	Amplifikasyon var	Herhangi	Herhangi
L2	Herhangi	Ganglionöroblastom Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon var	Herhangi	Herhangi
M	<18ay	Ganglionöroblastom Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon var	Herhangi	Herhangi
M	≥18ay	Ganglionöroblastom Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon yok	Herhangi	Herhangi
MS	<18ay	Ganglionöroblastom Nöroblastom	Herhangi	Amplifikasyon var	Herhangi	Herhangi

Şekil 1. TPOG NB -2020 Protokolüne göre risk sınıflandırması kriterleri (TPOG-NB-2020 protokolünden (www.tpog.org.tr) alınmıştır

Hastalığın tedavisinde; cerrahi rezeksiyon, kemoterapiler, radyoterapi ve otolog kök hücre nakliyle birlikte uygulanan myeloablatif kemoterapi, immunoterapi gibi farklı tedavi seçenekleri bir arada uygulanmaktadır. Uygulanan bu tedaviler sonucunda düşük risk ve orta risk grubundaki hastalarda 5 yıllık sağ kalım süresi %95'lere çıkartılmıştır ancak yüksek risk grubundaki hastalar için bu oran halen %50'nin altındadır (23). Yüksek risk grubundaki hastalarda yüksek oranda hastalığın rekürrensi ve yine bu hastalarda yüksek dozda kemoterapi kullanımına bağlı olarak gelişen sekonder komplikasyonlar, hastalardaki sağ kalımı düşüren başlıca nedenler arasındadır (24). Özellikle ileri risk grubundaki hastalar için daha iyi tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.2 Nöroblastomun Kökeni

Nöroblastomun, kökeni tam olarak bilinmemektedir ancak nöral krest hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir. Nöral krest hücreleri, gebeliğin ortasında nöral tüpün kapanması civarında meydana gelirler. Daha sonra göç ederek ve çeşitli dokulara dönüşürler. Sempatoadrenal soyada, nöral krest hücrelerin dorsal aortaya göç edip, burada çoğalarak nöronlara ve glial hücreler farklılaştıkları ve devamında sempatik gangliyonlar ve adrenal medullayı oluşturdukları düşünülmekteydi (15). Ne var ki, *Furlan ve ark.* Tarafından yapılan çalışmada çok sayıda adrenal medullayı oluşturan kromaffin hücrelerinin schwann öncül hücrelerinden köken aldığı gösterilmiştir. Bu schwann hücrelerinin, visseral sinir boyunca göç ederek adrenal bezin oluşacağı kısımda kromaffin hücrelerini meydana getirdikleri gösterilmiş yani periferik sinir sisteminin de adrenal medullanın oluşumunda rol oynadığını göstermişlerdir (25; 26)

2.1.3 Nöroblastom Hücrelerinde Görülen Heterojenite ve Mutasyonlar

Nöroblastomlar oldukça heterojen tipte tümörlerdir. Tümör dokusu içerisinde nöroblast, schwann hücreleri, perinöral, satellit hücreler ve bağ dokusu elemanları bulunmaktadır.

NB hücreleri 3 farklı tipte incelenmektedir.

- Nöroblast (N) tipi hücreler: küçük nörit kısımları içeren yuvarlak hücreler, az derecede bağlanma özelliğine sahiptir.

- Substrat adheran (S) tipi hücreler: Yapısal olarak glial ve ya mezenkimal hücrelere benzeyen hücreler, yüksek oranda bağlanma özelliğine sahiptir, kontak inhibisyonu gösterir.
- Intermediate (I) tipi hücreler: Bu hücreler N ile S hücreleri arasında bir özellik göstermektedir. Küçük ama uzunlamasına, orta derecede tutunma özelliği olan hücrelerdir. (27; 28)

Bu 3 hücre tipinin de farklı tümörjenik potansiyelleri vardır. S tip hücreler malign tipte değilken, N tipi hücreler ise hem soft agarda hem de farelerde tümör oluşturabilmektedir. İlginç bir şekilde I tipi hücreler malignitesi ve tümör oluşturma kapasitesi en yüksek olan hücrelerdir. I tipi hücrelerin kanser kök hücreleri yansıttıkları düşünülmektedir (29). Bu hücre tipleri tek bir tümörde ve ya hücre hattında birlikte bulunabilirler. Mesela; SK-N-SH NB hücre hattı heterojen bir hücre hattıdır. SK-N-SH'nin sub-klonlarından SH-SY5Y N tipi özellikte iken, SH-EP ise S tipi özelliktedir (30).

Van Groningen ve ark. Tarafından yapılan çalışmada insan NB tümör dokusu örnekleri kromatin immunopresipitasyon sekanslama (CHIP-seq) yöntemiyle epigenetik açıdan incelenmişlerdir. Bu çalışmada göre transkriptomik profillemeye yapılmış ve NB dokusunun iki farklı tipte hücre içerdiği saptanmıştır. Bunlar adifferansiye mezenkimal tipte hücreler ve farklılaşmış adrenerjik tipte hücreler idi (31). Bu hücrelerin içerdikleri genetik mutasyonlar benzer olmasına rağmen transkriptomik açıdan bu hücreler birbirinden farklı bulunmuşlardır. MES tipte hücreler nöral krest kökenli hücrelerle daha çok benzerlik göstermektedir ve bu hücreler ADRN tipi hücrelere göre daha primitif özelliktedir.

Boeva ve ark. Tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise 25 farklı NB hücre hattı ve 2 primer insan NB hücre kültürü ChIP-seq yöntemiyle analiz edilmiş ve bunun sonucunda hücre dizilerinde 3 farklı tipte hücre fenotipi gözlemlenmiştir. Bu çalışmada hücreler noradrenerjik tipte, nöral krest benzeri tipte ve intermiks tipte hücreler şeklinde sınıflandırılmışlardır (32).

Maris ve ark. Tarafından yürütülen Etkili Tedaviler Oluşturmak için Terapötik Olarak Uygulanabilir Araştırma (*Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments*) (TARGET)) çalışmasında yüksek risk grubundaki 240 NB vakasının örnekleri tüm ekzom, genom ve transkriptom sekanslamasına tabii tutularak bu hastalardaki mutasyon oranları incelenmiştir (11). Bu çalışmaya göre en sık görülen somatik mutasyonlar ALK,

PTPN11, MYCN, ATRX ve NRAS iken, germline olarak ise ALK, PHOX2B gibi genlerdeki mutasyonlar öne çıkmaktadır. Altun Z ve ark. Tarafından yapılan çalışmada ise Türk NB hasta grubunun içerdiği mutasyonlar ve genetik varyasyonlar tüm ekzom sekanslama çalışması ile incelenmiş ve yüksek risk hasta grubunda kromatin yeniden modellemesi ile ilişkili ARID1A ve NCOR2 genlerinde mutasyonlar saptanmıştır (33).

2.1.4 Nöroblastom Risk Sınıflandırmasında Kullanılan Kopya Sayısı Değişimleri ve Mutasyonlar

MYCN Kopya Sayısı Değişimi

MYC ailesi C-Myc, MYCN ve MYCL'den oluşur. MYC ailesi bir süper transkripsiyon faktörüdür ve genomun transkripsiyonunun yaklaşık %15'i bu aile tarafından düzenlenir (34). MYC ailesi üyeleri, hücre siklusu, gelişim, sinyal iletimi, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel kontrol mekanizmaları, kodlamayan RNA'lar, kök hücre karakterinin devamlılığı gibi pek çok farklı gen yolağının ekspresyonunu düzenler (35). Ailenin üyeleri arasında yüksek oranda bir yapısal homoloji vardır (36). 2p24 kromozomunda bulunan MYCN geni NB'de ilk defa 1983 yılında tanımlanmış olup, kötü prognozla ilişkilidir (37; 38; 39). NB hastalarının yaklaşık %20-25'inde MYCN amplifikasyonu görülmektedir (40). MYCN amplifikasyonu, MCYN kopya sayısının 10'dan büyük olmasıyla tanımlanmakta ve hücrede florasan in situ hibridizasyon (FISH) ve ya eş-zamanlı PCR yöntemiyle ölçülmektedir. MYCN amplifikasyonu evre 3 ve 4'teki tümörlerin %30-40'ında görülürken, %5 oranında 4S ve lokalize tümörlerde de görülmektedir (41;42).

Nöroblastomun aşırı MYCN eksprese eden sempatoadrenal hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir (15). Deneysel hayvan modellerinde tek başına MYCN ekspresyonu hücre proliferasyonu ve kök hücre (*stemness*) karakterindeki genleri aktiveleştirerek NB gelişimini tetiklemiştir. Hem fare hem de zebra balığı modellerinde nöral krest hücrelerinde MYCN aşırı ekspresyonu NB gelişimine yol açmıştır. (43; 44; 45; 46).

MYCN aşırı ekspresyonu miR-17-72 ve miR-9 ekspresyonunu arttırarak tümörleşme sürecine katkıda bulunur (47; 48). Tümör baskılayıcı yönde görev yapan Let-7 ise MYCN ekspresyonunu baskılar (49). İlginç bir şekilde MYCN'in aşırı ekspresyonu da Let-7'yi inhibe edebilmektedir (50). LIN28B proteini, Let-7'nin öncül RNA'sının Dicer proteini tarafından kesilmesini engelleyerek Let-7 aktivitesini baskılar ve bu şekilde kök hücre karakterini devam

ettirici yönde etki eder (51, 52). Pediatrik kanser panelinde NB hücrelerinde yüksek oranda Lin28B ekspresyonu görülmüştür ve Lin28 ekspresyon düzeyleri ile MYCN ekspresyon düzeyleri korreledir (53). Lin28B aynı zamanda GTP bağlayan protein RAN ve Aurora Kinaz A aktivitesini düzenleyerek de NB tümörleşme sürecine katkıda bulunmaktadır (54). Farede LIN28B geninin indüklenmesi sonucunda farede MYCN ekspresyonu artmış ve NB gelişimi gözlenmiştir ve tam tersi LIN28B ekspresyonunun sgRNA'lar ile baskılanması ise hücre proliferasyonunu azaltıcı, nöronal farklılaşmayı artırıcı yönde etki etmiştir (55).

ALK (Anaplastik Lenfoma Kinaz)

ALK, nöronal farklılaşmada, hücre proliferasyonu ve sağ kalımında rol oynayan tirozin kinaz reseptörüdür. Kromozomda, 2p23-24 lokusunda bulunmaktadır. ALK mutasyonu özellikle ailesel NB vakalarında görülmektedir. Ailesel NB vakaları vakaların %1-2'sini oluşturmakta ve aile ağaçları incelendiğinde otozomal dominant bir özellik göstermektedirler. Ailesel NB vakaları, diğer NB vakalarına göre daha erken yaşlarda hastalığı geliştirmekte ve bu hastalarda birden çok primer tümör odağı görülmektedir (56). Özellikle ailevi vakalarda, tirozin kinaz domaininde bulunan G1128A, R119P ve R1275Q yanlış anlamlı (missense) mutasyonlarının, ligand bağımsız ALK aşırı ekspresyonuna neden olarak kansere neden oldukları saptanmıştır (57). Yakın lokuslarda bulunduklarından ötürü MYCN (2p24) ve ALK ekspresyonu bir arada gözlenebilmektedir. Nöroblastomların vakalarının %2-3'ünde MYCN ve ALK amplifikasyonu birlikte görülmektedir ve bu genlerin birlikte aşırı eksprese olmaları hastalarda daha da kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (58; 59). Yine MYCN ve c-Myc'in ALK transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (60). Yine ALK mutasyonu, kalıtsal NB vakalarda görülen PHOX2B mutasyonu ile de ilişkilendirilmiştir (61).

1p kolu kaybı

NB vakalarının %20-40'ında 1p kolu kaybı gözlenmektedir. 1p kolu kaybının, MYCN amplifikasyonu ile yüksek oranda korrele olduğu ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (62). Bu durum 1p kolu kaybı olan kısımda tümör baskılayıcı gen veya genlerin olabileceğini ileri sürmüştür. Son yıllarda yapılan 2 farklı çalışmada, bu bölgede bulunan AT açısından zengin etkileşimli alan içeren protein 1A (ARID1A) geninin bu konuda rol oynayabileceğini göstermektedir (63; 64). ARID1A, SWF/SWI kromatin re-modelleme kompleksinin bir elemanıdır ve bu sayede gen transkripsiyonunu düzenler. ARID1A, PI3K/AKT/mTOR yolunun kontrolüne, kansere karşı bağışıklık tepkisine, EZH2

metiltransferaz aktivitesine, steroid reseptör modülasyonuna, DNA hasar kontrol noktalarına ve p53 hedeflerinin ve KRAS sinyallerinin düzenlenmesine katılır (65). Nöroblastom'da ARID1A ve ARID1B genlerindeki kayıp veya mutasyonların hastalarda sağ kalımı düşürdüğü ve tedavi yanıtını azalttığı gösterilmiştir (66).

11q kolu kaybı

Yüksek risk NB hastalarının %35-45'inde 11q kolu kaybı bulunmaktadır. Bu hastalar genelde daha yüksek yaş grubunda bulunmaktadır ve daha agresif bir hastalık fenotipi ile ilişkilendirilmektedir (67). Yine 11q kolu kaybı olan hastaların daha yüksek relaps gösterdikleri saptanmıştır (Ribelles AJ, 2019). Hastalar 11q kolu kaybı ile MYCN amplifikasyonu nadiren birlikte görülmekle birlikte MYCN amplifikasyonu olmayan hastalarda 11q kolu kaybı önemli bir prognostik faktör olduğu düşünülmektedir (68;69). 11q kolu kaybının, moleküler mekanizması incelendiğinde farklı aday genler ön plana çıkmaktadır. Bu genler arasında CADM1, ATM ve H2AFX sayılabilir ancak bu genlerin NB oluşum sürecindeki fonksiyonları henüz net olarak aydınlatılabilmemiş değildir (70). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda başka bir aday gen olarak DLG2 geni ele alınmıştır ve bu gendeki mutasyonların hücrelerdeki farklılaşmayı engellediği ve nöroblastom oluşumu tetiklediği gösterilmiştir (71; 72)

17q kolu kazanımı

17q kolu kazanımı NB vakalarında sık görülen bir kromozomal abnormalitedir. 17q kazanımının ne tür bir prognostik faktör olduğu halen tartışmalıdır. Bazı gruplar bu kazanımı iyi bir prognostik faktör olarak nitelendirirken, diğer gruplar ise kötü bir prognostik faktör olarak nitelendirmektedir (73; 74; 75). 17q kolu kazanımlarının henüz moleküler mekanizması tam olarak anlaşılabilmemiş değildir. 17q kolu kazanımının hücrede mitokondriyel gen ekspresyonunu arttırdığı sekanslama analizleri ile gösterilmiştir (76).

DNA Ploidisi

Tümör hücrelerinin DNA ploidisi, insan malignitelerinde prognozun önemli göstergelerinden biridir. *Look ve ark.* Tarafından yapılan çalışmada NB tümör hücrelerinde hiperdiploidi (anöplöidi), kemoterapiye daha iyi yanıt ve özellikle 1 yaşın altındaki bebeklerde ve rezeksiyon yapılamayan vakalarda bile daha olumlu bir sağ kalım ile ilişkilendirildi (77). Yine Pediatrik Onkoloji Grubu (POG)'un yaptığı çalışmada 1 yaş altı bebeklerde hiperdiploid

vakaların, diploid vakalara göre daha iyi bir sağ kalım gösterdikleri saptandı (78). Yine DNA anöploidisi gösteren vakaların daha çok düşük evrelerde oldukları, tanı yaşının daha düşük ve sağ kalım açısından daha iyi olduğu gösterilmiştir (79).

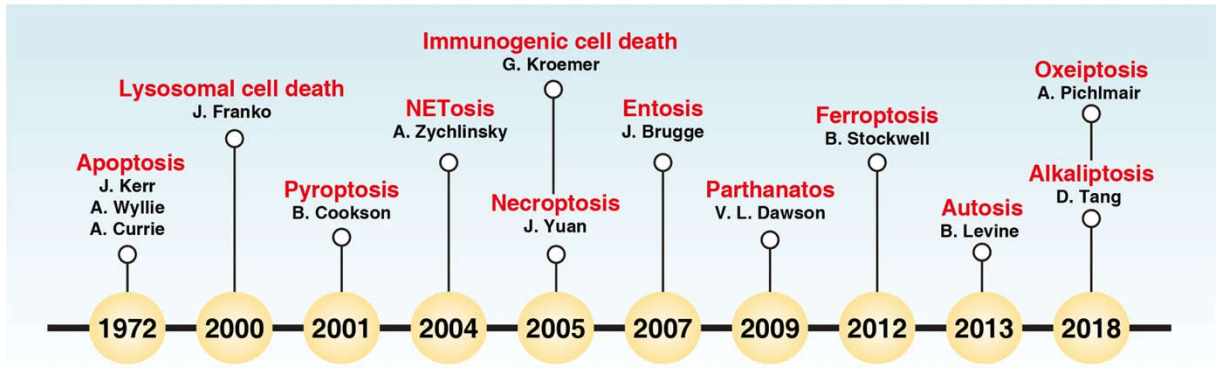
2.2. Kanserde Ölüm Mekanizmaları ve SMAC Mimetiklerin Önemi

2.2.1 Hücre Ölümü

Hanahan ve Weinberg ikilisi tarafından yayınlanan 3 farklı makalede kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri tartışılmıştır. Bu özelliklerden birisi de hücre ölüm mekanizmalarından kaçış ve apoptoza dirençtir (80;81;82).

Hücre ölümü, normal veya stres koşullarında dokularda fizyolojik homeostazının devam edebilmesi için gereken bir süreçtir. Genel anlamda hücre ölümü iki şekilde oluşur:

- Programlı Hücre Ölümü (PDÖ): Hücre içerisindeki çeşitli moleküler yollar ve bu yollarda yer alan protein kompleksleri aracılığıyla düzenlenen, kontrollü bir ölüm şeklidir: apoptoz, nekroptoz, otofaji, ferroptoz, piroptoz gibi çeşitleri vardır.
- Akut Hücre Ölümü: Kaza, akut stres sonucu oluşan kontrolsüz hücre ölümüdür: nekroz gibi.



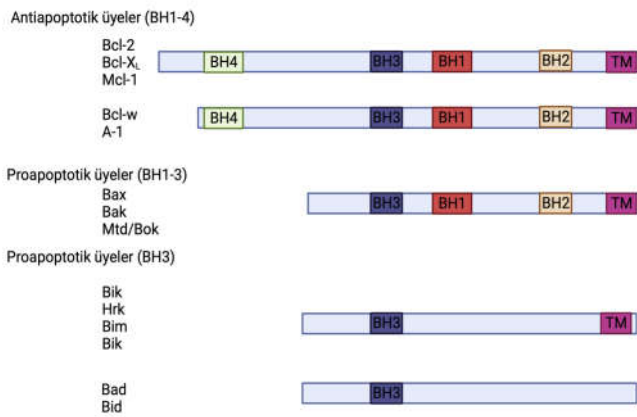
Şekil 2. Yıllara bağlı olarak tanımlanan hücre ölüm mekanizmaları (83).

2.2.2 Apoptotik Hücre Ölümü

Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz ilk defa 1972 yılında *Kerr ve ark.* Tarafından tanımlanmıştır (84). Apoptoz çalışmaları özellikle *Caenorhabditis elegans* modelinde embryo gelişimini inceleyen çalışmalarla hız kazanmıştır (85). Tüm bu çalışmaların neticesinde apoptoz, hücre içindeki sinyal yolları tarafından regüle edilebilen programlanabilir ve doku homeostazının sağlanmasında oldukça önemli bir rol üstlenen ölüm şekli olarak kabul edilmiştir (86). Apoptoz sırasında kromozom yoğunlaşması ve nükleer fragmentasyon, membran zarının büzülerek apoptotik cisimcikleri oluşturması meydana gelir ve bu oluşan apoptotik cisimcikler devamında fagositozlar tarafından sindirilerek parçalanır (86).

Apoptozun başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein- aspartik asit proteazların aktivasyonuna bağlıdır. Normalde inaktif durumda olan kaspazlar, proteazlar tarafından kesilime uğrayarak aktif hale gelirler ve homodimer bir yapı oluşturarak birbirlerini aktive ederler. Hücre ölümü, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 veya kaspaz 9) tarafından başlatılırken devamında bu kaspazlar aktifleştirdiği cellat (executioner) kaspazlar (kaspaz 7, kaspaz 6 ve kaspaz 3) tarafından hücre ölümü gerçekleştirilir. Bu kaspaz aktivitesi sonrasında endonükleazlar ile DNA parçalanırken, apoptotik cisimciklerin oluşumu başlatılır ve bu cisimcikler fagositozlar tarafından parçalanır (87).

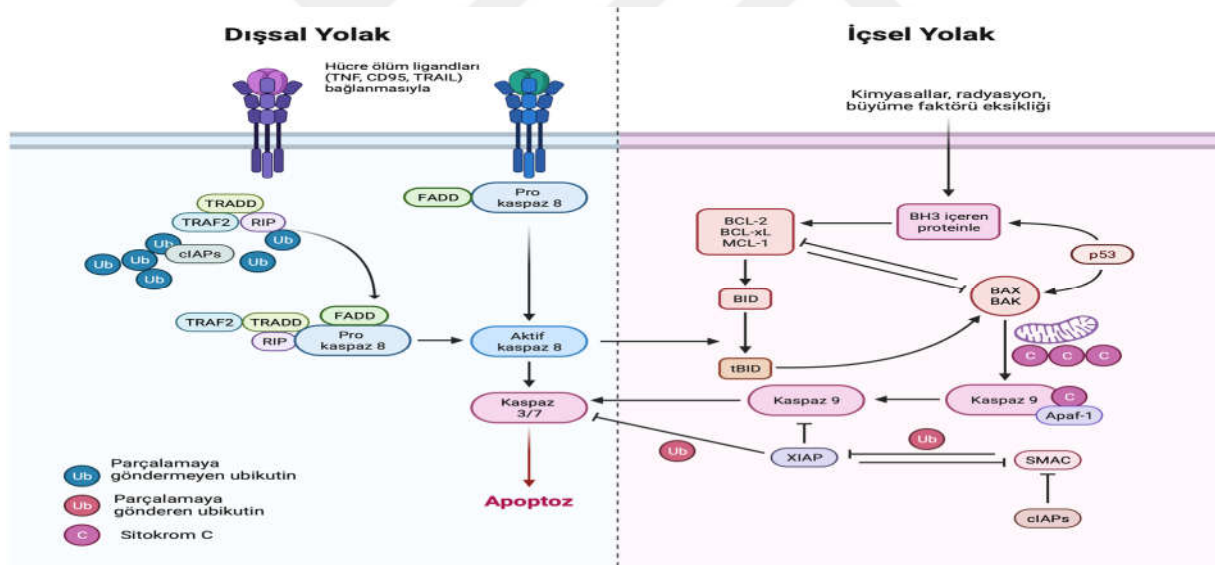
Apoptoz sırasında önemli bir rol oynayan diğer bir protein ailesi de Bcl-2 ailesidir. Bu ailenin üyeleri içerdikleri domainlere göre sınıflandırılmakla birlikte, bir kısmı pro-apoptotik olarak fonksiyon gösterirken bir kısmı ise anti-apoptotik olarak davranmaktadır.



Şekil 3. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri (88).

Normalde, anti-apoptotik Bcl-2 üyeleri mitokondrinin dış zarında, nükleer zar endoplazmik retikulumda lokalize bulunmaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri, hem mitokondrinin dış zarının potansiyelini dengede tutarak mitokondriden sitoplazmaya Sitokrom C salınımını önlerler hem de Bax ve Bak proteinlerine bağlanarak kaspazların aktifleşmesini engeller. (89). Sadece BH3 domain içeren pro-apoptotik üyeler ise, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanarak onları nötralize ederler bu sayede Bax ve Bak proteinlerinin serbest kalmalarını ve membranda por oluşturarak sitokrom c salınımı sağlarlar (90). Sitoplazmaya salınan sitokrom c, Apaf-1 ve Kaspaz-9 ile etkileşerek apoptozom kompleksini oluşturur ve aktifleşen Kaspaz-9, devamında Kaspaz-7 ve Kaspaz-3'ü de aktifleştirerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (91).

En bilinen apoptotik yollar: dışsal (ektrinsik) veya içsel (intrinsik) yollardır. Dışsal yolak hücre membranında bulunan ölüm reseptörleri tarafından aktifleşirken, içsel yolak DNA hasarı veya endoplazmik retikulum stres gibi içsel uyarılar sonucunda aktifleşmektedir (92).



Şekil 4. İçsel ve Dışsal Apoptotik Yollar (93)

- (1) Dışsal Apoptotik Yolak: Hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine (TNFR, Fas, DR4-5 vb.) ligandların bağlanması sonrasında konformasyonel değişikliğe uğrayarak devamında diğer adaptör proteinlerle birlikte kaspazları aktifleştirir ve apoptoz gerçekleşir.
- (2) İçsel Apoptotik Yolak: Bu yolak ise hücrenin içerisinde oluşan stres faktörleri tarafından tetiklenmektedir. Tüm bu faktörlerin tetiklediği yollar aracılığıyla pre-

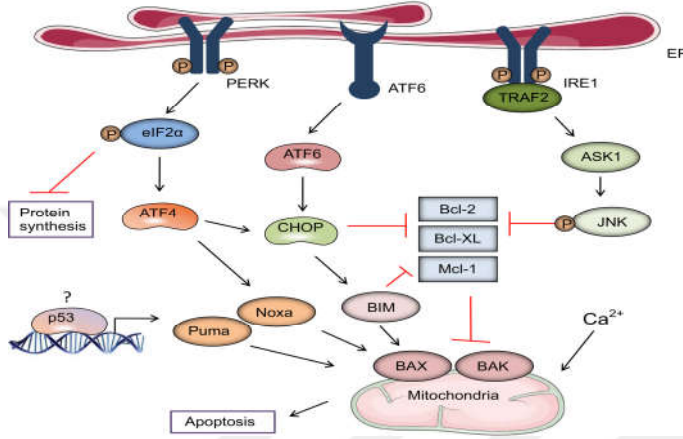
apoptotik Bel-2 ailesinin üyelerinden Bax/Bak mitokondriyal membrana yerleşerek, mitokondriden sitozole sitokrom C salınımı gerçekleşir. Sitokrom C, sitozolde Apaf-1 ve Pro-kaspaz 9 ile etkileşerek apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom kompleksi de devamında kaspaz kaskatını etkinleştirerek hücre ölümünü gerçekleştirir. Yine bu süreçte mitokondriden salınan Sekonder Mitokondriyel Aktivatör Kaspaz (SMAC) proteinleri, İnhibitör Apoptoz Proteinleri (IAP)'ler ile etkileşip onların aktivitesini engelleyerek apoptotik sürece katkıda bulunurlar (93).

(3) Apoptozla İlişkili Diğer Yolaklar: Endoplazmik Retikulum Stres Aracılıklı İçsel Apoptotik Yolağı.

Endoplazmik retikulum (ER), hücrede protein sentezinin, protein katlanması ve translokasyonunun gerçekleştiği ve proteinlerin post-translasyonel protein modifikasyonlarından sorumlu organelidir. Bunun haricinde, ER hücrenin Ca^{2+} dengesinin korunumunda, lipid ve karbonhidrat metabolizmasında da görev yapmaktadır. ER'ın bu fonksiyonel dengesinin herhangi bir şekilde bozulması (redoks dengesizliği, protein glikolizasyonundaki bozulmalar, protein katlanma kusurları vb.) ER lümeninde doğru katlanmamış proteinlerin birikimine neden olur ve bu durum ER stres olarak adlandırılır (94; 95).

ER stresi, ER stresinin zararlı sonuçlarına karşı koymak ve ER homeostazını eski haline getirmek veya mümkün değilse, apoptozu aktive etmek için katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak da bilinen evrimsel olarak korunmuş bir yolağı tetikler. UPR, IRE1 α (inositol gerektiren protein-1 α), PERK (protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz) ve ATF6 (aktive edici transkripsiyon faktörü 6) adlı üç sinyal proteininin aktivasyonu ile başlar (96). Normalde PERK ve ATF6, ER lümeninde bulunan GRP78/immunoglobulin bağlayıcı (BiP) şaperon tarafından bloklanır. Ancak katlanmamış proteinlerin miktarı belli bir kritik değeri aşınca GRP78/BiP, bu proteinlerden ayrılarak UPR yanıtının başlamasını sağlar. IRE1 α 'nın aktivasyonu ise katlanmamış proteinlerin bağlanması ile olur (96). GRP78'den ayrılan PERK (EIF2AK3) proteinleri homodimer yapısı oluşturarak birbirlerini fosforile ederek aktifleştirirler. Aktifleşen PERK, ökaryotik transkripsiyon başlatıcı faktör (eIF2 α)'yı fosforiller ve devamında aktifleşen eIF2 α da başka transkripsiyon faktörlerini aktifleştirir (97). Bu transkripsiyon faktörlerinden birisi de aktive edici transkripsiyon faktör 4 (ATF4)'tür. ATF4, cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB)-2 protein ailesinin bir üyesidir. ATF4'ün çift yönlü bir rolü vardır. Bir yandan

ATG genlerinin (Atg7, Atg10, Atg5) transkripsiyonunu başlatarak otofajik süreci başlatırken bir yandan da C/EBP-homolog ile iş birliği yapan protein (CHOP) ekspresyonunu artırır, XIAP'yi parçalayarak apoptotik sürece katkıda bulunur. (98; 99). Aynı zamanda CHOP, anti-apoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1'i baskılayıp, pro-apoptotik protein BIM'i arttırarak, BAK ve BAK'ın aktifleşmesine katkıda bulunur ve apoptotik süreçlere destek verir (100).



Şekil 5. ER-stres aracılıklı olarak hücre ölümünün indüklenmesi (101)

Bunun haricinde ER lümenindeki katlanmamış proteinler IRE1α'nın oligomer hale gelmesini tetikleyerek fosforillenmesini sağlar. Fosforillenen IRE1α, Xbp1 mRNA'sını keserek ve Xbp1'yi aktifleştirir. Transkripsiyon faktör olarak görev yapan Xbp1, şaperon ve ER tamir sistemini başlatarak hatalı proteinlerin onarımını sağlayarak hücre sağ kalımını destekler (102). Bunun haricinde IRE1α, tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör-2 (TRAF2) ile kompleks oluşturarak devamında apoptoz sinyal düzenleyici kinaz (ASK1) ve Jun-N-terminal kinaz (JNK) aracılıklı olarak apoptoza neden olur (103).

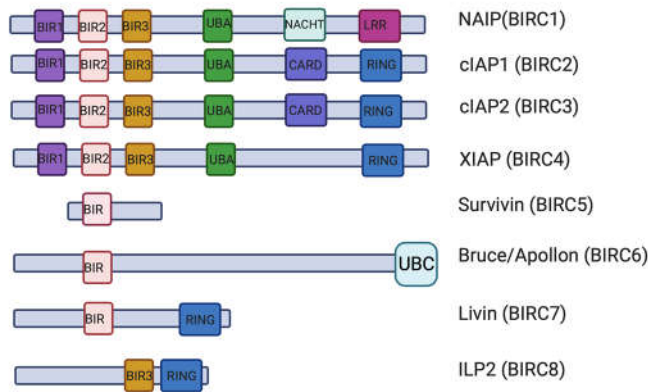
2.2.3 Nekroptotik Hücre Ölümü

Nekroptoz, kazaran meydana gelen nekroz ölüm tipine benzer bir fenotip gösteren ancak apoptoz gibi kontrollü bir şekilde gerçekleşen ölüm şeklidir. Nekroptoz, reseptör interaksyon kinaz 1 (RIP1), reseptör interaksyon kinaz 3 (RIP3) ve mixed lineage kinaz (MLKL) proteinlerinin bir araya gelmesiyle oluşan nekrozom kompleksi tarafından gerçekleştirilir ve genellikle apoptozun inaktif olduğu koşullarda gerçekleşir (104; 105). Mesela, TNF ve SMAC mimetik kombinasyonunun uygulandığı Kaspaz 8 veya FADD kaybının olduğu apoptoza dirençli lösemi hücrelerinde nekroptotik ölüm mekanizmasında artış olduğu saptanmıştır (106).

Yine Kaspaz-8 kaybı olan kolorektal kanseri tümöründe Smac mimetik (LCL-161) uygulamasının farelerde tümör gerilemesine yol açtığı ve bunun nekroptoz aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. (107). Normal şartlarda apoptotik ölüm, hücrelerde birincil kontrollü (regüle edilen) ölüm şekli iken apoptotik yolağın bir şekilde inaktifleşmesiyle nekroptoz gerçekleşir (108).

2.2.4 İnhibitör Apoptoz Proteinleri (IAP)

IAP ailesi sekiz farklı üyeden oluşan bir ailedir ve bu ailenin her bir üyesi en az bir bakulovirüs IAP tekrar (BIR) domaini içerir. Bazı IAP'ler BIR domainine ek olarak karboksil (C terminal) ucunda E3 ubikütin ligaz olarak da işlev gören zing-finger RING domaini içermektedirler (109). Bu ailenin üyelerinden cIAP1 ve cIAP2'de BIR ve RING alanları arasında, kaspaz bağlanma alanı (CARD) bulunmaktadır. CARD alanı, bu alanı içeren proteinlerin birbirleriyle oto-veya heterodimer oluşturmalarını sağlar (110). Yine bir başka üyesi survivin de CHR domainleri aracılığıyla hücre döngüsünü kontrol eder (111).



Şekil 6 IAP ailesi üyeleri (109)

IAP'lerin apoptotik süreci nasıl engellediğinin anlaşılabilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapısal çalışmalarda, XIAP'nin, Kaspaz 8 ile etkileşmediği ancak Kaspaz -3 veya -7'ye bağlanarak bu kaspazların kesilimini blokladığı ve bu şekilde apoptozu engellediği gösterilmiştir (112; 113). Bunun devamında yapılan başka bir çalışmada ise XIAP'nin direkt olarak Kaspaz -3, -7 ve -9' a bağlanıp onları blokladığı ancak Kaspaz -1,-6,-8 ve -10'a direkt bağlanamadığı gösterilmiştir (114). Aynı zamanda XIAP, mitokondriyi daha geçirgen hale getirerek mitokondri içerisine girebilir ve sitoplazmaya Sitokrom C ve Apaf-1 salınımını

engellediği gösterilmiştir (115). cIAP-1 ve c-IAP2'nin ise kaspazlara bağlanmadığı, RING domain aracılıklı olarak ubikütin ligaz aktivitesi göstererek kaspazları proteazomal parçalamaya göndererek etki ettikleri gösterilmiştir (116). IAP'ler tarafında K48 bölgesinden ubikütinlenen proteinler proteazomal parçalamaya giderken, K63 bölgesinden ubikütinlenen proteinler ise sinyal yollarının aktifleşmesine yol açar (117). c-IAP1'in cIAP2'yi ubikütinleyerek onu parçalamaya gönderdiği, cIAP-1'in protein ekspresyonunun azaldığı durumlarda c-IAP2 de artış gözlemlendiği saptanmıştır. Yine, c-IAP'lerin Reseptör Interaksiyon Protein (RIP1)'leri K63 bölgesinden ubikütinleyerek, kanonik Nf-kB yolağının aktivasyonuna neden olduğu saptanmıştır (118; 119). Aynı zamanda, cIAP'lerin NIK proteininin parçalamaya göndererek kanonik olmayan Nf-kB yolağının aktivasyonunu da düzenlediği gösterilmiştir (120; 121). Nf-kB yolağının devamlı aktivasyonunun kronik inflamasyona yol açarak, doğal ve adaptif bağışıklık sistemlerini düzenleyerek tümör gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (122).

IAP'lerin pek çok farklı tümör tipinde aşırı eksprese oldukları ve kötü prognoz, ilerlemiş hastalık ve daha agresif fenotiple korrele oldukları gösterilmiştir. Bu da IAP'lerin iyi bir tedavi hedefi olduğunu düşündürmektedir (123).

2.2.5 Sekonder Mitokondri Kökenli Kaspaz Aktivatörü (SMAC)

SMAC/DIABLO proteini, normalde mitokondri içerisinde yer alan bir proteindir. Apoptotik uyaran sonucunda, mitokondrideki SMAC proteini kesilime uğratarak apoptoz sırasında daha geçirgen hale gelmiş olan mitokondri membranından sitozole çıkar. Yapısal çalışmalar neticesinde SMAC proteininin NH₂ terminal bölgesinde bulunan Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) aminoasitlerinden oluşan motifleri aracılığıyla XIAP'lere BIR3 domainlerinden bağlandıkları gösterilmiştir (124; 125). Yine aynı şekilde cIAP1 ve cIAP2'lerinde BIR3 domainlerine SMAC proteini bağlanmakta ve IAP'leri inhibe etmektedir (126). Bu sayede kaspaz proteinleri serbest kalarak, apoptotik süreci gerçekleştirir (127).

2.2.6 SMAC Mimetikleri

SMAC mimetikleri, SMAC proteininde bulunan AVPI motifleri üzerine geliştirilmiş küçük moleküllerdir. SMAC mimetikler pek çok farklı firma tarafından sentezlenmekte ve içerdikleri AVPI motiflerine göre monovalent (tek AVPI motif içeren) veya bivalent (iki AVPI motif içeren) olarak sınıflandırılmaktadırlar. Compound1, SM-406/Debio/AT-406, LCL-161,

LBW242, GDC-0152 monovalent tipte iken Compound2, SM-164, TL-32711/Brinapant, ASTX660 ise bivalent tiptedir (128). SMAC mimetiklerin farklı kanser türlerinde Faz I denemeleri devam etmektedir (clinicaltrials.gov).

SMAC mimetikleri, hücrede ölüm yanıtını çeşitli protein kompleksleri aracılığıyla olarak başlatırlar. (129). SMAC mimetiklerinin kullanımı, otokrin TNF salgılayan bazı hücre hatlarında direkt apoptotik etkiyi sağlarken, genelde hücre ölümünün gözlenebilmesi için hücrenin TNF, TLR gibi ölüm ligandları ve ya kemoterapilerle indüklenmesi gerekir (130).

SMAC mimetiklerinin anti-tümör etkileri çeşitli kemoterapiler ile kombine etkileri birçok tümör tipinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla incelenmektedir (131). Mesela, SMAC mimetiklerden biri olan Birinapant, meme kanseri tedavisi için Norkantanidin, Dosetaksel veya TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ile kullanılmıştır. Bunun haricinde pankreas kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, melanom, akut miyeloid lösemi ve kolon kanserinde Paklitaksel, demetilasyon maddesi (5-AZ), TNF-a, Fas ligandı (FasL), Gempitabin, 5-fluorasil (5-FU) ve Oksaliptin ile kombine denemeleri mevcuttur (132). Yine SMAC mimetik çeşitlerinde BV6'nın Temozolomid ile kullanımı sonrasında glioblastom hücrelerinde RIP1 ve Nf-kB bağımlı apoptozda artışa yol açmıştır (133).

SMAC mimetiklerinin NB'de etkisini inceleyen çalışmalar vardır. *Najem ve ark.* Tarafından yapılan çalışmada KELLY, SK-N-AS, HGW1 hücre hatları üzerinde yapılmış ve LCL-161 tipinde SMAC mimetik uygulamasının bu hücrelerde Vinka alkaloid (Vinkristin, Vinblastin, Vindesin) etkinliğini arttırdığı gözlenmiştir. Yine LCL-161 uygulamasının KELLY haricindeki diğer hücre hatlarında Antrasiklin (Daunorubisin, Doxorubicin, İdarubicin) kemoterapilerinin etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (12). *Eschenburg ve ark.* Tarafından yapılan çalışmada ise Smac mimetigi LBW242'in TNF ligandından bağımsız olarak NB hücrelerinde ölümü arttırdığı gösterilmiş ve bunun ortamdaki cIAP miktarını azalmasına bağlı olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada KELLY, NXS2, SK-N-SH ve C1300 NB hücre hatlarında LBW242'nin Etoposid, Vinkristin ve Doxorubicin etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (134). Pediatrik Pre-klinik Test Programı kapsamında da LCL-161'in tek başına etkinliği NB hücre hatlarının da dahil olduğu farklı pediatrik kanserlere ait hücre hatlarında *in vitro* olarak ve fare ksenograft modellerde *in vivo* olarak incelenmiştir (11).

Yapılan tez çalışmasında LCL-161'in nöroblastom hücreleri üzerinde apoptotik ve nekrotik süreçlere olan etkisini daha detaylı araştırmayı amaçladık. Bu amaçla nöroblastom

hücreleri üzerinde hem LCL-161'in tek başına olan etkisi hem de Cisplatin ve Etoposid ilaçlarıyla LCL-161'in kombine olan etkisi incelenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneyssel niteliğe sahip bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Ocak 2019- Eylül 2023 yılları içerisinde Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte araştırmacı TÜBİTAK 2214/A programı kapsamında Ekim 2019-Eylül 2020 tarihleri arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde Ekim-Aralık 2019 tarihleri arasında Virginia Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Ocak-Eylül 2020 tarihleri arasında Chicago Northwestern Üniversitesi'nde konuk araştırmacı olarak çalışmalarda bulunmuştur.

Şubat 2017- Ocak 2019	Tez önerisinin hazırlanması
	Tez önerisi sunumu ve kabulü
	Etik kurul kabulü
Ocak 2019-Ocak 2021	Ön deneylere başlanması
	Yurtdışı (TÜBİTAK 2214/A) çerçevesinde gözlemlerde bulunmak
Ocak 2021- Eylül 2021	BAP projesi kabulü
	Malzemelerin temin edilmesi
	Deneylere başlanması
Eylül 2021- Haziran 2023	Hücre canlılık deneylerinin tamamlanması
	Akım sitometri analizlerinin gerçekleştirilmesi
	RNA sekanslama analizlerinin gerçekleştirilmesi
	Q-PCR analizlerinin gerçekleştirilmesi
Haziran 2023-Eylül 2023	İstatiksel analizler
	Makale kabul süreçlerinin tamamlanması
	Tez yazımı süreçlerinin tamamlanması

3.3 Çalışma Materyali

Çalışma kapsamında SH-SY5Y ve KELLY insan nöroblastom hücre hatları kullanılmıştır. Hücre hatlarımız hali hazırda Temel Onkoloji AD stoklarında bulunmaktadır. Deneyssel çalışmalar bu hücre hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.4 Araştırmanın Değişkeni

Bağımsız Değişken: LCL-161, Cisplatin, Etoposid

Bağımlı Değişken: İlaç uygulamasına bağlı değişen hücre canlılığı, apoptotik ve nekrotik ölüm yüzdeleri, gen ekspresyon düzeyleri

3.5 Veri Toplama Araçları



Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
KELLY	ECACC/ 92110411	Çalışmada kullanılan insan nöroblastom hücre hattı
SH-SY5Y	ATCC/CRL-2266	Çalışmada kullanılan insan nöroblastom hücre hattı
Dulbecco's Modifiye Eagle Medium (DMEM)	GIBCO/11965092	Hücrelerin büyütülmesi için bazal ortam
RPMI-1640	GIBCO/21875034	Hücrelerin büyütülmesi için bazal ortam
Fetal Bovin Serum (FBS)	GIBCO/ 16140071	Hücrelerin büyütülmesi için serum
L-glutamin	GIBCO/25030081	Hücrelerin büyütülmesi için essensiyal olmayan aminoasit
Penisillin-streptomisin	GIBCO/ 15140122	Hücreleri enfeksiyondan korumak için antibiyotik
Trypsin-EDTA	GIBCO/25200056	Hücreleri pasajlarken kaldırmak için kullanılan enzim
Fosfat salın tamponu (PBS)	GIBCO/10010023	Hücreleri yıkama ve ortam kalıntılarını uzaklaştırma tamponu
Dimetil sulfoksit (DMSO)	Appllichem/APA3672.0250	Hücreleri dondurma için kullanılmaktadır
Kristal viyola	Sigma /61135	Hücreleri boyamak ve hücre canlılığını incelemek için kullanılmaktadır
WST-1	Sciencecell/8038	Hücre canlılığının ölçümünde kullanılmaktadır
Hücre kültür flaskları	Isolab/ 12011025	Hücreleri yetiştirmede kullanılan steril kaplar
96'lı kuyucuklu plaka (wellplate)	Corning/ CLS3340	Hücre canlılık deneylerinde hücrelerin ekildiği plakalar
Serolojik pipet 5-10ml	Isolab/083.03	Hücre kültüründe besi ortamı eklemek veya uzaklaştırmak için kullanılır
Test tüpü 15ml-50ml	Isolab/ 078.12.001	Hücreleri santrifüj etmekte kullanılan konik tabanlı tüpler
Mikrosantrifüj tüpü 1.5ml	Isolab/078.03.021	RNA izolasyonu, PCR deneylerinde santrifüj için kullanılan tüpler
Kryotüp	Isolab/091.11.102	Hücre dondurmak için kullanılan özel kaplar
LCL-161	Cayman Chemicals/22420	Kullandığımız ajan, SMAC mimetik

Cisplatin	Koçak Farma / 50mg/100ml infüzyon çözeltisi	Hücre canlılık deneylerinde kemoterapi ilacı olarak kullanılmıştır
Etoposid	Cayman Chemicals/12092	Hücre canlılık deneylerinde kemoterapi ilacı olarak kullanılmıştır
Trypan blue	CDH/899795	Hücre sayımında kullanılmıştır
Thoma lamı	Isolab/I.075.03.002.001	Hücre sayımında kullanılmıştır
AnnexinV/PI kit	ElabScience/ E-CK-A211	Akım sitometrisi deneylerinde boyama için kullanılmıştır
5ml flow tüpü	Corning/352235	Akım sitometri deneylerinde hücrelerin konulduğu kaplar
RNA izolasyon kiti	Macherey Nagel/ Nucleospin RNA izolasyon kiti	Hücre örneklerinden RNA izolasyonunda kullanılmıştır.
Etanol	Merck/107017	RNA izolasyonu sırasında tampon solüsyonlara eklenmiştir
Metanol	Merck/106009	Kristal viyole boyasının çözülmesinde kullanılmıştır
cDNA sentez kiti	Roche/ 07 912 439 001	mRNA'dan cDNA sentezi için kullanılmıştır
Primerler	Eurofins Genomics	PCR deneylerinde kullanılmıştır
DNaz/RNaz free su	Invitrogen/10977015	Primerlerin ve DNA ve RNA'ların çözülmesi için kullanılmıştır
SYBR Green	Roche/SYBR Green Lightcycler 480 /507203180	Q-PCR'da gen ekspresyon deneyleri için kullanılmıştır.
PCR stripleri 8li	Roche/06327672001	Q-PCR'da gen ekspresyon deneyleri için kullanılmıştır.
Pipet uçları	Isolab/005.01.001	Ortam veya kimyasalları uygularken kullanılmıştır.

Hücrelerin Yetiştirilmesi:

SH-SY5Y hücreleri DMEM içerisine %10 fotal bovin serum ve %1 Penisilin-streptomisin eklenerek, 37°C ve %5 CO₂ ayarlanmış hücre kültürü inkubatöründe (Thermo, ABD) yetiştirilmişlerdir. Hücreler haftada iki defa Tripsin-EDTA kullanılarak pasajlanmışlardır.

KELLY hücreleri RPMI-1640 içerisine %10 fetal bovin serum ve %1 Penisilin-streptomisin eklenerek, 37°C ve %5 CO₂ ayarlanmış hücre kültürü inkubatöründe (Thermo, ABD) yetiştirilmişlerdir. Hücreler haftada iki defa Tripsin-EDTA kullanılarak pasajlanmışlardır.

Kullanılmayan hücreler normal besi ortamı %10 DMSO eklenerek hazırlanan dondurma ortamıyla 1ml içerisinde 10 milyon hücre olacak şekilde 1 cryovial içerisine alınarak yavaş yavaş -80°C’de dondurulmaya bırakılmışlar ve orada saklanmışlardır.

Hücre Sayımı:

Hücreler üzerinde ortam uzaklaştırılmış. 1 defa hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde Tripsin-EDTA konulmuştur. Devamında 5dk 37°C ve %5 CO₂ ayarlanmış hücre kültürü inkubatöründe (Thermo, ABD) bekletilmiştir. Kalkan hücreler, mikroskop altında da kontrol edilmiştir. Devamında flaska konan tripsinin 2-3 katı kadar FBS’li ortam eklenerek Tripsin inhibe edilmiştir. Hücre solüsyonu 15ml’lik test tübü içerisine alınarak 400g’de 5dk santrifuj edilmiştir. Pellet üzerindeki supernatan kısmı atılmıştır. Hücre pelleti tekrardan pelletin büyüklüğüne göre yaklaşık 5ml ortam ile pipetleme yapılarak dağıtılmıştır. Devamında 10-100 µl aliquot alınıp 1.5ml’lik test tübüne konulmuştur.

Başka bir test tübüne 10 µl Tripan Mavisi solüsyonu eklenip üzerine 10 µl hücre solüsyonu konularak karıştırılmıştır. Sonrasında karışımdan 10 µl alınıp Thoma lamına konuşmuştur. Mikroskop altında hücre sayımı yapılarak 1ml’deki hücre sayısı bulunmuştur. Buna göre deneylerde kullanılmak üzere kaç ml hacimde hücre alınması gerektiği hesaplanmıştır.

Hücre Canlılık Deneyleri:

KELLY hücreleri 10,000hücre/ 100µl kuyucuk başına olacak şekilde 96 kuyucuklu plaka içerisine ekilmişlerdir. Devamında bir gece boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Ertesi gün farklı dozlarda (0, 5µM, 10µM, 25µM, 50µM, 100µM, 200µM) Etoposid ve farklı dozlarda (0µM, 6.75µM, 12.5µM, 25µM, 50µM ,100µM) dozlarda Cisplatin ile 24 saat ve 48 saat sürelerle muamele edilmişlerdir. Yine kombine kullanımda değişen dozlarda Etoposid Cisplatin ilaçları 10 µM LCL-161 ile kullanılmıştır. Inkübasyon sonrasında hücre canlılıkları ölçülmüştür.

Hücre canlılığı Kristal Viyola yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla *Feoktistova M ve ark.* protokolü kullanılmıştır (145). Bu amaçla %0,5'lik kristal viyola solüsyonu hazırlanmıştır. 0.5 g kristal viyola tozu tartılarak 80 ml distile su içerisinde çözülmüş ve devamında üzerine 20ml metanol eklenmiştir.

96 kuyucuklu plakadaki ortamlar uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan bu %0,5'lik kristal viyola solüsyonda her bir kuyucuğa 50µl konulmuştur. Devamında hücreler 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkube edilmişlerdir. 2 saat sonrasında kristal viyola solüsyonu uzaklaştırılmış ve plaka hafif dikey bir şekilde musluk suyuyla dikkatlice yıkanmıştır. Devamında plaka kurumaya bırakılmıştır. Bir gün sonra kuruyan plaka içerisine 50ul metanol eklenmiştir. Plaka sallayıcının (shaker) üzerine konularak 20dk oda sıcaklığında inkube edilmiştir. Devamında plaka okuyucuda 590nm'de absorbans okuması gerçekleştirilmiştir. Devamında hücre canlılıkları koşullar arasında karşılaştırılmıştır. Sonuçlar GraphPad Prism programı (Graphpad, Chicago, ABD) kullanılarak analiz edilmiş ve grafikler oluşturulmuştur.

Annexin V-FITC/PI Boyaması ile Hücre Ölüm Tiplerinin Analizi:

KELLY ve SH-SY5Y hücreleri hücre kültüründe yukarıda belirtilen koşullarda yetiştirilmiştir. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıncaya T-25'lik flasklar içerisine 1 milyon hücre olacak şekilde ekilmişlerdir. Deney günü hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. Hücre 1 defa 1X PBS'le yıkanmışlardır. Devamında flask içerisine 2-3ml Trypsin-EDTA konularak flask 37C'de 5dk bekletilmiştir. Inkubasyon sonrasında hücrelerin kalkıp kalkmadıkları mikroskop altında incelenmiştir. Eğer hücreler kalktıysa, flaskı içerisine eklenen tripsini iki katı kadar FBS'li ortam eklenerek tripsin inhibe edilmiştir. Devamında hücre solüsyonu 15ml'lik test tüpü içerisine alınarak 400g'de 5dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücreler çökerek pellet oluşturmuş, üstteki supernatan kısmı ise atılmıştır. Pellet üzerine tekrardan 5ml (pelletin büyüklüğüne göre değişebilir) FBS'li ortam eklenmiş ve pipetaj yapılarak pellet dağıtılmıştır. Devamında 10-100 µl hacminde alınıp bir 1.5ml test tüpü içerisine konulmuştur. Hücre sayımı için 0,5%lik Tripan mavisi çözeltisinden 10 µl alınmış ve 1.5ml test tüpü içerisindeki hücre solüsyonundan da 10 µl alınarak 1:1 oranında karıştırılmış ve Thoma lamına konulmuştur. Inverted mikroskop altında hücreler sayılmıştır. Bu sayım sırasında parlak renkli hücreler canlı iken maviye boyanmış hücreler ölü olarak kabul edilir.

$$\text{Sayılan hücre} \times 2 \times 10^4 = 1\text{ml'deki hücre sayısı}$$

Bu formülden yola çıkılarak 1ml'deki hücre sayısı ve totalde hücre sayısı hesaplandı. Buna göre 1milyon hücre için hangi hacimde hücre solüsyonu alınması gerektiği belirlendi. Alınan hücre solüsyonuna devamında FBS'li ortam eklenerek total hacim 5ml'e tamamlandı. Ve hücreler T25 flask içerisine aktarıldı.

İlaç indüksiyonları:

1 gün sonra hücreler Cisplatin, LCL-161, Etoposid, Cisplatin+LCL-161, Etoposid+LCL-161 ve negatif kontrol koşullarında indüklendiler.

KELLY için: 50uM Cisplatin, 50µM Cisplatin+10µM LCL-161, 50µM Etoposid, 50µM Etoposid +10µM LCL-161, 100µM LCL-161, negatif kontrol (2 adet)

SH-SY5Y için: 12,5µM Cisplatin, 12,5µM Cisplatin+10µM LCL-161, 50µM Etoposid, 50µM Etoposid +10µM LCL-161, 10µM LCL-161, 50µM LCL-161 ve 100µM LCL-161, negatif kontrol (2 adet) çalışıldı.

Hücreler 24- 48 saat boyunca muamele edildikten sonra Annexin V-FITC/PI kiti kullanılarak akım sitometrisinde hücre ölüm tayini yapılmıştır. Normalde hücre membranının iç kısmında bulunan fosfatidil serinler, erken apoptotik dönemde hücre membranının dış kısmına çıkarlar. Annexin V de spesifik olarak Ca²⁺ bağımlı bir şekilde bu fosfatidil serinlere bağlanır. Bu sayede apoptoz saptanabilir. FITC ise yeşil florasan boyadır, 495 ile 519nm arasında ışıma vermektedir. Propidium iyodür (PI) ise kırmızı bir nükleer boyadır ve canlı hücrelerden geçemezken ölü hücreleri boyar. PI, DNA'daki bazlar arasına girerek bağlanır ve bağlanma sonrasında ışıma miktarı artar. Bu sayede ölü hücreler saptanır. Yapılan bu Annexin V-FITC/PI çalışmasında uygulanan koşullarda hücrelerin yüzde kaçının sağ kaldığı yüzde kaçının ölüme gittiği ve bu ölümün apoptotik mi yoksa diğer şekilde mi olduğunun incelenmesi amaçlanmıştır.

Hücreler, hücre kazıyıcı ile toplandı. Toplanan hücreler 300g 5dk santrifüj yapılarak, üst kısımdaki supernatan uzaklaştırıldı. Devamında hücreler 1X soğuk PBS ile yıkandı. Tekrardan 300g 5dk santrifüj yapılarak üst kısımdaki supernatan uzaklaştırıldı. Hücre pelleti üzerine 100µl 1X AnnexinV Bağlama Tamponu eklendi. Pellet tampon içerisinde dağıtıldı. Devamında buffer içerisine 2,5µl Annexin V-FITC ve 2,5ul Propidium iyodür (PI) eklendi. Vortekslendi. Karanlıkta 15-20dk beklendi. Üzerine 400µl Annexin V Bağlama Tamponu eklendi.

Vortekslendi ve 5ml'lik FACS tüplerine aktarıldı. Devamında Akım sitometrisi cihazında okumalar gerçekleştirildi.

RNA İzolasyonu:

RNA izolasyonu için, hücreler 50 µM LCL-161 ile 48 saat muamele edildi. Negatif kontrol hücrelerine ise herhangi bir kimyasal eklenmemiştir. İnkübasyondan sonra hücreler, 1 X soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Hücreler, bir hücre kazıyıcı kullanılarak ayrıldı. Hücreler 5 dakika 400 x g'de santrifüjlendi. Hücre pelleti, 1X soğuk PBS ile iki kez yıkandı. Santrifüjlemeden sonra, PBS tamamen atıldı. RNA izolasyonu, Nucleospin RNA izolasyon kiti kullanılarak ve kitin protokol aşamaları izlenerek yapıldı. Bu amaçla hücreler önce lizis tamponu ile muamele edildi ve devamında Nucleospin filter kolon içerisine aktarılacak santrifüj ile çöktürüldü (lizis aşaması). Filtrasyon sonrasında alttaki tüpe geçen sıvı kısım alındı ve %70'lik etanol ile karıştırıldı. Devamında Nucleospin Triprep kolon içerisine aktarıldı ve santrifüj yapıldı, bu sayede DNA ve RNA'ların kolona bağlanması sağlandı (binding aşaması). Devamında kolon iki defa yıkama tamponu ile yıkandı (yıkama aşaması). Bu işlemlerden sonra kolon rDNaz karışımı ile 15dk oda sıcaklığında inkube edilerek kolona bağlı olan DNA'lar parçalandı. Bu işlemde sonra kolon bir kez daha yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra kolon 1.5 ml yeni bir test tüpü içerisine konuldu ve üzerine nükleaz-free su eklenerek RNA eldesi gerçekleştirildi (elde aşaması). RNA konsantrasyonu, Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak ölçüldü.

RNA Sekanslama:

RNA numuneleri ayrıca Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak bütünlük açısından değerlendirildi. Sekanslamada kullanılacak kütüphane, üreticinin talimatları izlenerek Total RNA Library Prep kiti (Illumina, San Diego, CA, ABD) kullanılarak hazırlandı. Ribozomal RNA'ları yok etmek için Ribozomal RNA İndirgeme Kiti (Illumina, San Diego, CA, ABD) kullanıldı. Saflaştırma, parçalama, birincil ve ikincil cDNA sentezi, indeks/adaptör dizilerinin eklenmesi ve amplifikasyon ve normalizasyon buna göre gerçekleştirildi. Prosedürün ardından, RNA'nın kalitesi yine Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak kontrol edildi. Dizileme, NovaSeq platformu (Illumina, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Numune başına ortalama 2 x 30 milyon çift uçlu 2 x 100bp okuma elde edildi.

Veri analizi:

Sıralama verilerinin kalitesi, FASTQC (Babraham Bioinformatics, UK, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>) kullanılarak kontrol edildi. Kalite değerlerine dayalı olarak Trimmomatic aracı (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) kullanılarak ham verilerdeki düşük kaliteli temel okumaları ve olası adaptör indeksi kontaminasyonlarını ortadan kaldırmak için okumalar kırıldı. HISAT2.2.1 aracı (<http://daehwankimlab.github.io/hisat2/>), referans genom olarak GRCh38.p13 (Genome Reference Consortium Human Build 38, INSDC Assembly GCA_000001405) kullanılarak, hizalama yapıldı. Hizalamanın ardından, her transkriptteki okuma sayısı Subread 2.0.3 aracı (<http://subread.sourceforge.net>) kullanılarak hesaplandı. Edge R/Bioconductor (<https://www.bioconductor.org>) paketi kullanılarak veri setinden çok düşük veya ifade etmeyen genleri çıkartıldı. Genlerin p değerleri üzerinde Benjamini-Hochberg'in düzeltmesi uygulandı. P değerlerinin cut-off değeri 0,05 olarak belirlendi. Filtrelemeden sonra, ham ve normalleştirilmiş veri kümelerindeki milyon başına sayı (CPM) dağılımları karşılaştırıldı. Gen ekspresyonu değişimleri, Bioconductor paketinin limma aracı kullanılarak belirlendi. Grafikler, temel R ve ggplot2 paketleri (<https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/index.html>) kullanılarak hazırlanmıştır. Gen ontolojisi (GO) ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) zenginleştirme analizi, KEGG çevrimiçi veri tabanı (<http://www.genome.jp>) kullanılarak, önemli ölçüde diferansiyel olarak eksprese edilen (DE) genlere ($p < 0.05$), log-fold change (logFC) değerlerine göre yapıldı. Protein-protein etkileşim analizi, en iyi DE genlerine dayanan STRING çevrimiçi veri tabanı (<http://string-db.org>) kullanılarak yapıldı (140).

mRNA'lerden cDNA Sentezi:

Gen ekspresyon çalışmalarında kullanabilmek için mRNA'ların cDNA'lara çevrilmesi gerekmektedir. Bu amaçla cDNA sentez kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi kitin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kitin içeriğinde Reverse transkriptaz enzimi, reaksiyon tamponu ve distile su bulunmaktadır. Steril 0,2 ml'lik PCR stripleri içerisine, Konsantrasyonları az olduğu için RNA solüsyonundan 14 µl konulmuştur. 4 µl Reaksiyon Tamponu eklenmiştir. Devamında test tüpleri 5dk buzun üzerinde bekletilmiştir. Üzerlerine 2 µl Revers transkriptaz enzimi eklenerek reaksiyon 20 µl son hacmine tamamlanmıştır.

Reaksiyon koşulu olarak; 42°C 15dk , 85°C 5dk, 65°C 15dk ve 4°C hold olarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar 1:10 şeklinde distile su ile sulandırılmışlardır. Bu şekilde PCR reaksiyonlarında kullanılmışlardır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

PCR reaksiyonları Light Cycler 480 SYBR Green Master Mix (Thermo, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. PCR reaksiyonları Roche Nano (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiş ve sonuçlar makine tarafından hesaplanmış ve grafikler makinenin kendisi tarafından oluşturulmuştur. PCR primerlerinin dizaynı Eurofins Genomics websitesi kullanılarak yapılmış ve primerler yine Eurofins tarafından sentezlenmiştir.

Tablo 2. Q-PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler

Gen Adı	Forward Primer	Reverse Primer
TRIB3	5' AGT TCA GAG CCA GGA GGA G-3'	5' AGA GGA GGG AGA CAG AGA AG 3'
CHOP(DDIT3)	5' TCT TCC TCC TCT TCC TCC TG 3'	5' TCT TGA CCC TGC TTC TCT G 3'
PPP1R15A	5' TCC TCT TCC ACT CCT GCT AC 3'	5' CCT CAC TAT CCA CAT CCT CAT C 3'
AMOT	5' ACC ATC ATC ACC ATC ACC AC 3'	5' ACC TTC TCA TAG CAT CCT TCC 3'
AKNA	5' GAC TCT TTC CCA ATG CCA C 3'	5' TCC TCA ACC TCC AGA CTT CC 3'
cIAP1	5' GGA GAT GAT CCA TGG GTA GA 3'	5' ACA AAC TCT TGG CCT TTC AT 3'
cIAP2	5' CGG ATG AAC TCC TGT CCT TT 3'	5' TGC TGG GAA TCT GGA GAT GA 3'
XIAP	5' TGT TGT TCC CAA GGG TCT TC 3'	5' TGC TTT AGG TGA AGG TGA TAA AGTA 3'
CAS3	5' GAG TGC TCG CAG CTC ATA CCT 3'	5' CCT CAC GGC CTG GGA TTT 3'
CAS8	5' CCT GGG TGC GTC CAC TTT 3'	5' CAA GGT TCA AGT GAC CAA CTC AAG 3'
RIPK1	5' AGC CGA GAT GAG TAC TCC G 3'	5' TCC TTG TGT ATC ACG CCT TT 3'
RIPK3	5' CCT TCC GGT TTA CGT TAA CAA AC 3'	5' ACG TCA AGC TGG CAG ATT TTG 3'
GAPDH	5' GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG 3'	5' TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC 3'

PCR reaksiyonu için; 1 vial Light Cycler 480 SYBR Green Master Mix çözüldü. 10X konsantrasyonda PCR primerleri su içerisinde çözülerek hazırlandı. 1,5 ml test tübü içerisine her bir reaksiyon için; 3 µl steril su, 2 µl Primer çifti (1 µl forward, 1 µl reverse primer), 10

μ l SYBR Green Master Mix konuldu. Pipetleme yapılarak reaksiyon karıştırıldı. 15 μ l reaksiyon karışımından alınıp 8'li Nanostripler içerisine aktarıldı. Üzerine 5 μ l cDNA eklendi. Stripler hafifçe spin yapılarak içerisindeki köpükçükler yok edildi ve karışım karıştırıldı. Striplerin üzeri kapatıldı. Roche Nano cihazına konuldu.

PCR cihaz programı:

95°C 10sn

95°C 10sn

50-55°C 20sn

72°C 20 sn

40°C 30sn

45 siklus

- 3 step amplification
- Melting
- Cooling

Gen ekspresyon değişimleri Livak metodu (135) kullanılarak delta-delta cT değerleri hesaplanarak bulunmuştur. Buna göre koşullardaki gen ekspresyon değişimleri negatif kontrol ile kıyaslanarak relatif gen ekspresyon değişimleri hesaplanmıştır.

Pro-Apoptotik Genler: Kaspaz 3, Kaspaz 8, Fas Assosiye Death Domain (FADD)

Anti-apoptotik Genler: İnhibitör Apoptoz Protein 1 (IAP1), İnhibitör Apoptoz Protein 2 (IAP2), İnhibitör Apoptoz Protein-X (XIAP)

Nekroptotik Genler: Reseptör Interaksiyon Kinaz 1 (RIP1), Reseptör Interaksiyon Kinaz 3 (RIP3), Mixed lineage kinaz domain benzeri psödökinaz (MLKL)

Kontrol Geni: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), B-aktin (B-aktin)

Endoplasmik Retikulum Aracılıklı Stres Genleri: Tribbles Pseudokinaz 3 (TRIB3), C/EBP Homolog Protein 10 (CHOP ve ya DDIT3), Protein Fosfat 1 Regülatör (İnhibitör) Subunit 15A (PPP1R15A)

RNA Sekanslama Konfirmasyonu için Kullanılan Genler: Angiomotin (AMOT), AT-Hook İçeren Transkripsiyon Faktör (AKNA)

3.6 Verilerin Değerlendirilmesi

Hücre canlılık deneylerinde her bir koşul en az 3'li olarak çalışılmış. İlaçla muamele edilmeyen hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

*Yüzde Hücre canlılığı = ilaçla muamele edilen hücrelerin absorbansı /negatif kontrol hücrelerin absorbansı *100* olarak hesaplanmıştır.

Buna göre GraphPad Prism GraphPad Prism versiyon 8.0.0 Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com) programında grafikler oluşturulmuştur. Her hücreleri %50 öldüren konsantrasyon lethal doz 50 (LD50) olarak kabul edilmiştir.

Akım sitometri deneyinde analizler cihazın kendi programı kullanılarak otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizler de boyama yapılmayan negatif kontrol hücrelerine göre kapılama yapıp, ilaçla muamele edilen koşullar buna göre değerlendirilmiştir.

RNA sekanslama deneyinde analizler R programlama kullanılarak, bu programdaki uygun paketler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diferansiyel ekspres genlerin belirlenmesi ve sıralamada *P* değeri, false discovery rate (FDR) değeri ve logFc değerlerinden yararlanılmıştır. Analizden detaylı olarak bulgular kısmında bahsedilmiştir. Gene ontoloji analizleri ise web tabanlı araçlar kullanılarak diferansiyel ekspres gen listesi üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Q-PCR deneyinde; GraphPad Prism kullanılarak grafikler çizilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı değişimin olup olmadığının saptanması için t testi kullanılmıştır.

3.7 Araştırmanın Sınırlılıkları

Planlanan tez çalışmasında Cisplatin ve Etoposid ilaçları dışında Karboplatin, Siklofosfamid, İfosfamid ilaçlarının da kullanılması planlanmaktaydı. Ancak kemoterapi ilaçlarına ulaşmakta ciddi zorluk yaşandığından ötürü (eczanelerde kemoterapi ilaçlarının satılmaması, hastane eczanesinden bu ilaçları elde etmekte yaşanan zorluklar ve buradan gelen ilaçların aktivitesinde yaşanan sıkıntılar neticesinde) çalışma sadece Cisplatin ve Etoposid ilaçları ile yapılabildi. Bir de tez çalışmamızda protein ekspresyonlarının da incelenmesi önerilmişti. Ancak dolar kurundaki yükselmeler ve bölümümüzde hali hazırda western blot sisteminin bulunmayışı ve bu sistemi kurmak için gereken sarf malzemelerin maliyetleri oluşu ve elimizdeki bütçelerle bu maliyeti karşılayamadığımızdan dolayı protein ekspresyonları

sadece akım sitometrisi ile incelenebilmiştir. Amaçlanan detaylı protein ekspresyon çalışmaları oluşan maliyeti karşılayacak proje bütçesine sahip olamadığımız için gerçekleştirilememiştir.

3.8 Etik Kurul Onayı

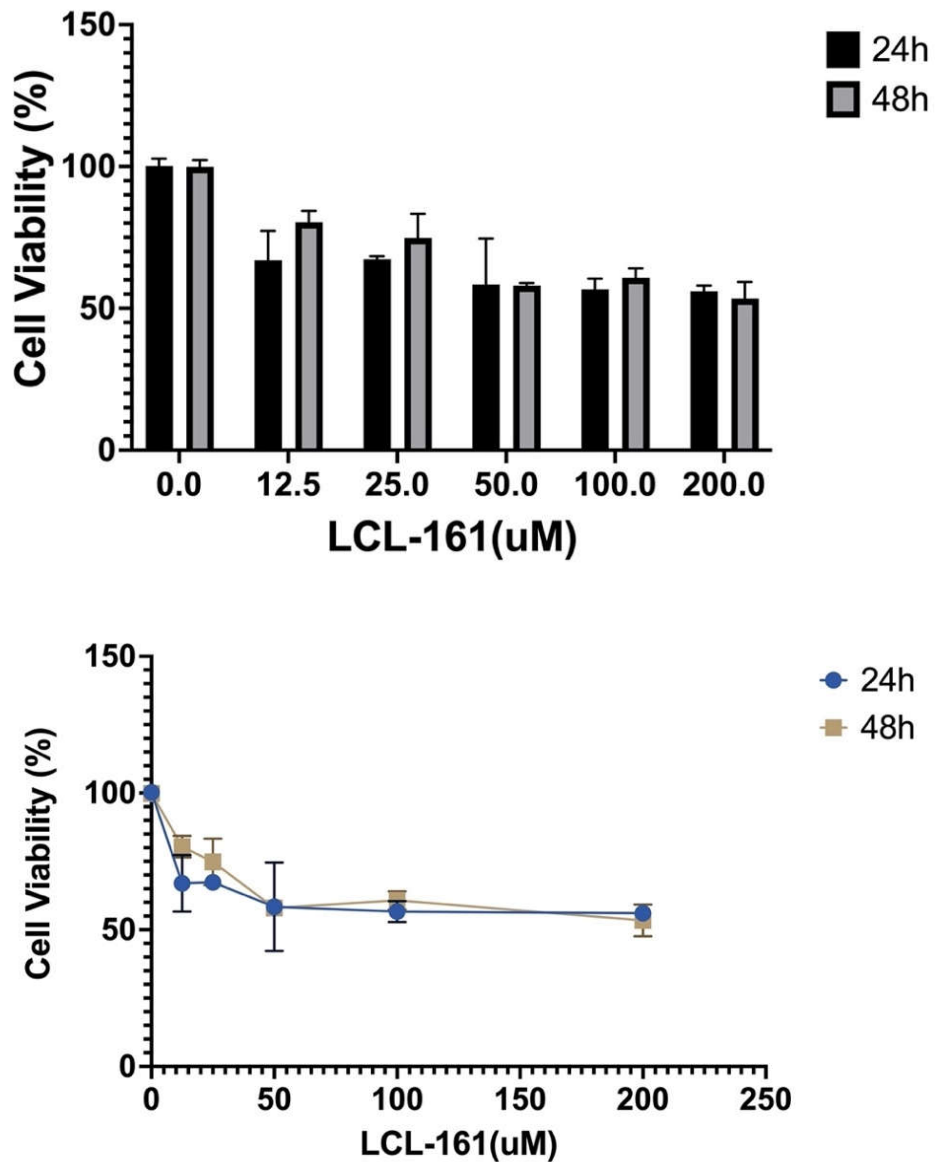
Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 18.10.2018 tarihli 2018/26-07 no'lu etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayı örneği EK'te sunulmuştur.



4. BULGULAR

4.1 Hücre Canlılık Analizleri

LCL-161, monovalent tipte bir SMAC mimetiktir. LCL-161'in tek başına SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi WST-1 yöntemi ile incelenmiştir. Bu amaçla SH-SY5Y hücreleri 0-200 μ M arası farklı dozlarda LCL-161 ile 24 saat ve 48 saat muamele edilmişler ve bu sürenin sonunda hücre canlılığı ölçülmüştür.

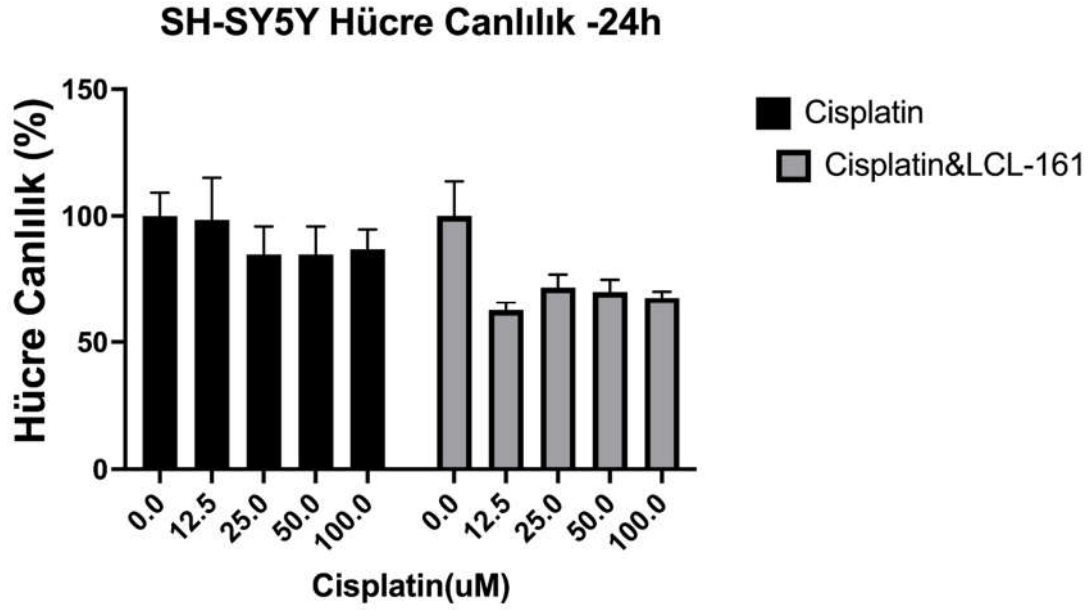


Şekil 7. LCL-161'in 24 saat ve 48 saat sürelerde SH-SY5Y hücrelerinde farklı dozlarda (0-200 μ M) hücre canlılığına etkisi incelenmiştir.

50µM LCL-161 dozundan itibaren SH-SY5Y hücrelerinin %50'sinin öldüğü gözlenmiştir. 24 saat ve 48 saatlik sürelerde LCL-161'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi pek değişmemiştir. Buna göre ileriki deneylerde kullanılması hedeflenen tek başına LCL-161 dozu 50 µM olarak belirlenmiştir.

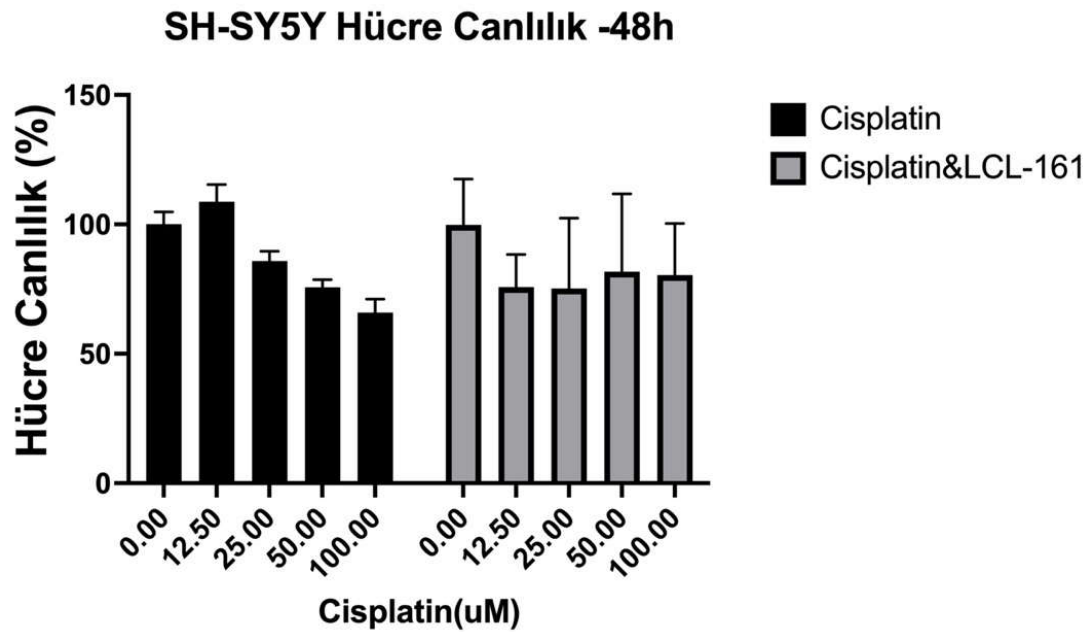
Devamında LCL-161 uygulaması Cisplatin veya Etoposid etkinliğini arttırıcı yönde bir etki yapar mı sorusuna cevap aranmıştır. Bu amaçla literatürde de kullanılan (Najem S, 2016) LCL-161 dozu olarak nispeten düşük bir doz olan 10µM kullanılması kararlaştırılmıştır. 10µM LCL-161 ile farklı dozlarda Cisplatin veya Etoposid ilaçlarının kombine etkinliği SH-SY5Y ve KELLY hücre hatlarında incelenmiştir.

İlk aşamada SH-SY5Y hücre hattında farklı dozlarda Cisplatin ve Cisplatin kombine LCL-161(10µM) kullanımının hücre canlılığı üzerindeki etkisi 24 ve 48 saat sürelerde WST-1 yöntemi kullanılarak incelendi.



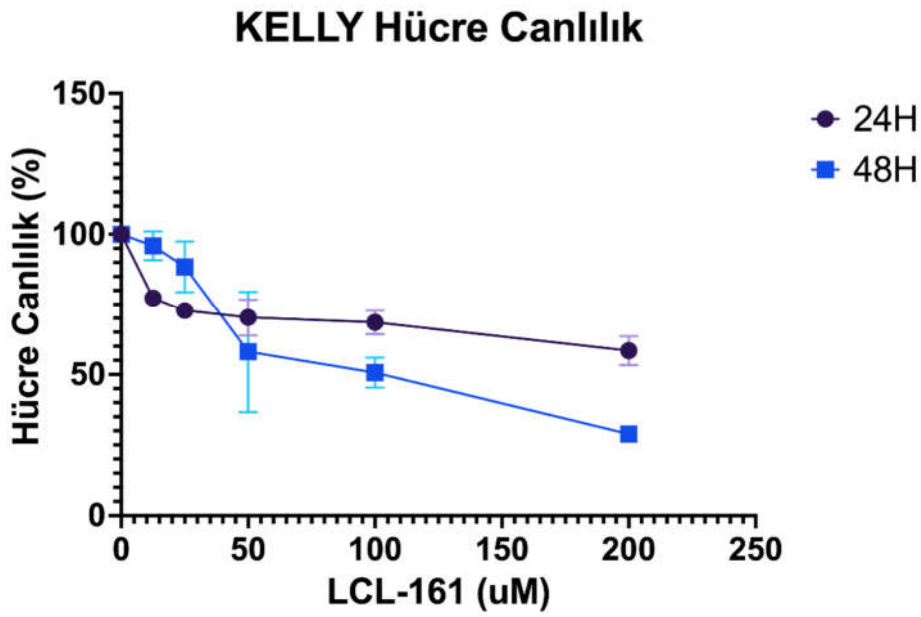
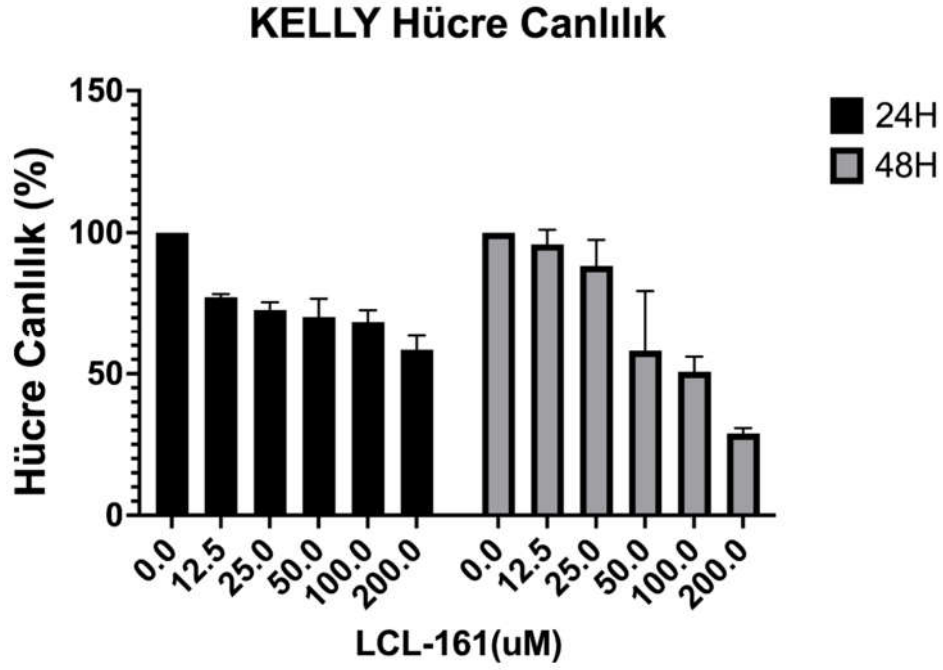
Şekil 8. Cisplatin (0-100 M) ve LCL-161 (10 M) kombine uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde 24 saatlik canlılı a olan etkisi

Buna göre 24 saatlik sürede SH-SY5Y hücre hatlarında LCL-161, Cisplatin etkinliğini kısmı düzeyde arttırmıştır. Ancak uygulanan Cisplatin koşulları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

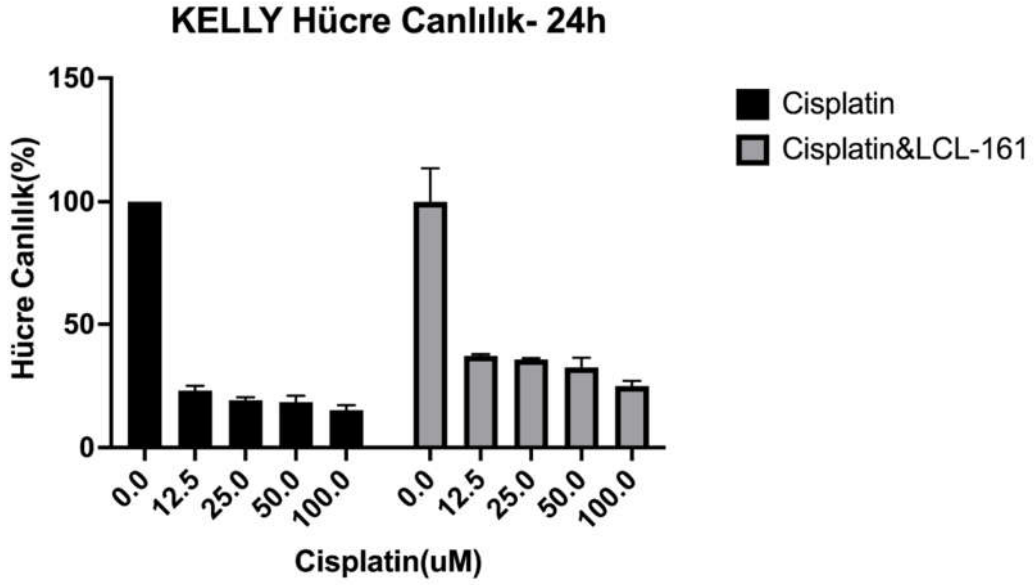


Şekil 9. Cisplatin (0-100 M) ve LCL-161 (10 M) kombine uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde 48 saatlik canlılı a olan etkisi

48 saatlik sürede ise; SH-SY5Y hücre hatlarında hızlandırıcı bir etkisi olsa da LCL-161'in Cisplatin etkinliğini anlamlı bir şekilde arttırmadığı gözlemlendi.

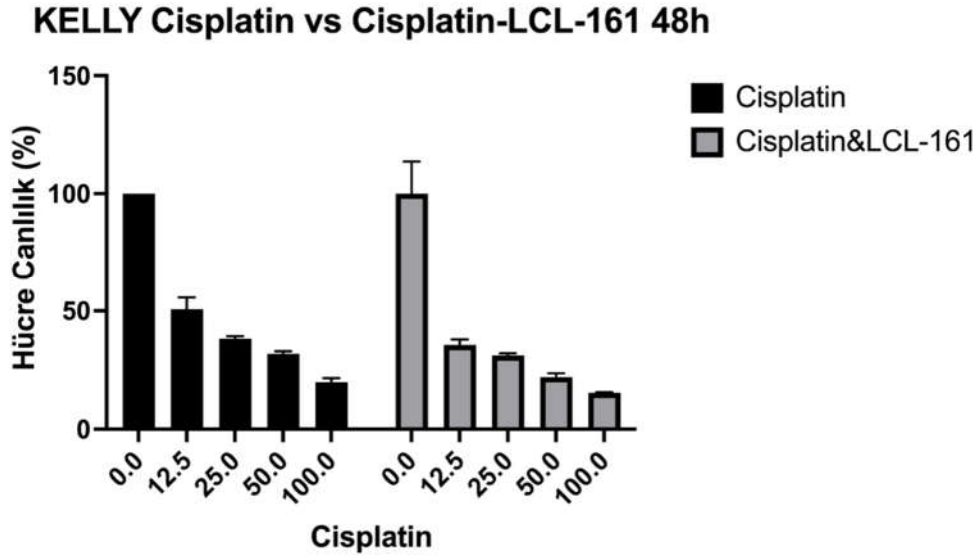


Şekil 10. LCL-161'in 24 saat ve 48 saat sürelerde KELLY hücrelerinde farklı dozlarda (0-200µM) hücre canlılığına etkisi incelenmiştir.



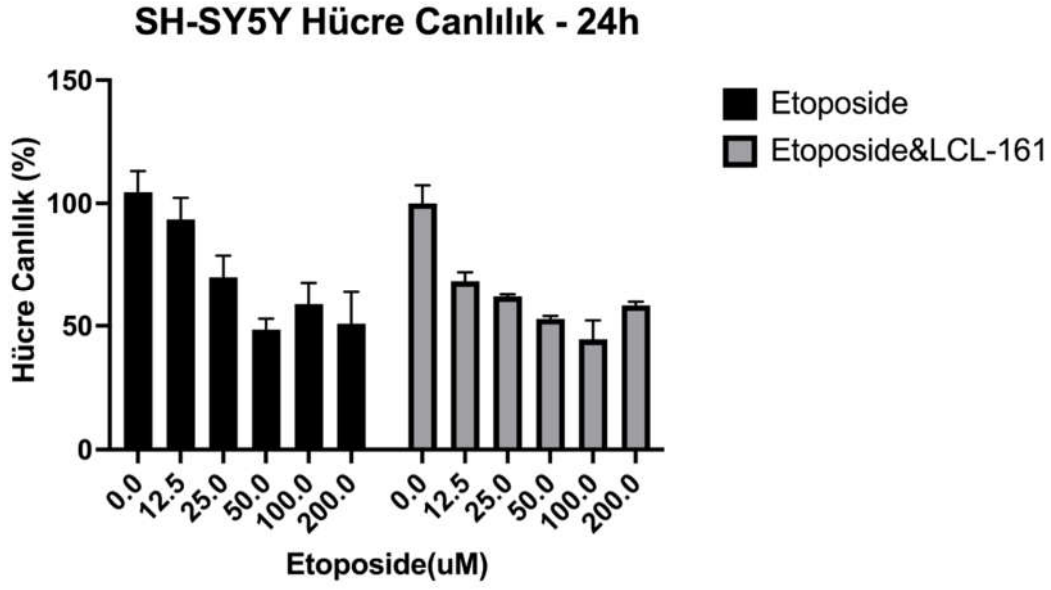
Şekil 11. Cisplatin (0-100 μ M) ve LCL-161 (10 μ M) kombine uygulamasının KELLY hücreleri üzerinde 24 saatlik canlılığa olan etkisi

24 saatlik süreden itibaren Cisplatin 'in ciddi bir biçimde KELLY hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Ancak LCL-161 uygulaması, KELLY hücrelerinde Cisplatin etkinliğinde anlamlı bir artışa sebep olmamıştır.



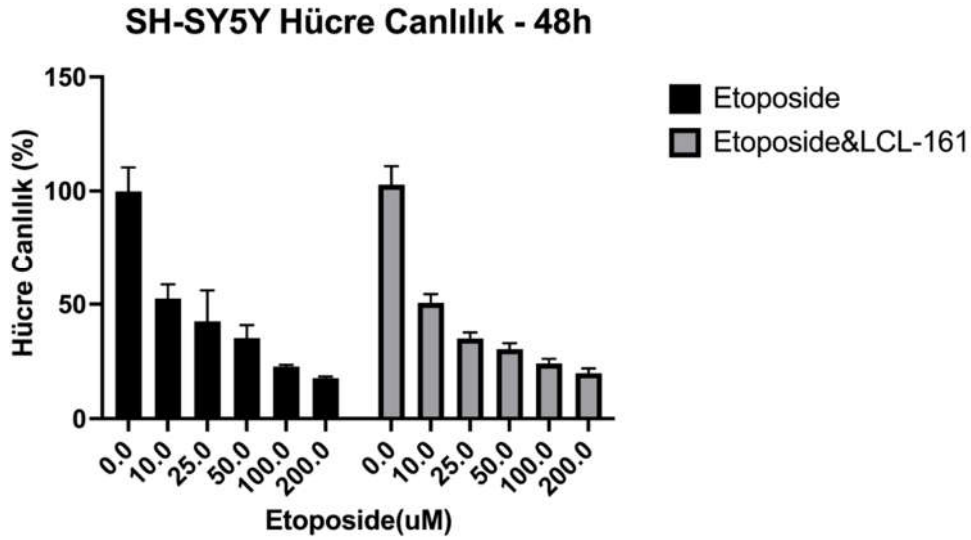
Şekil 12. Cisplatin (0-100 μ M) ve LCL-161 (10 μ M) kombine uygulamasının KELLY hücreleri üzerinde 48 saatlik canlılığa olan etkisi

KELLY hücrelerinde Cisplatin 'in yüksek oranda hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür. Ancak LCL-161, Cisplatin etkinliğinde anlamlı bir artışa yol açmamıştır.



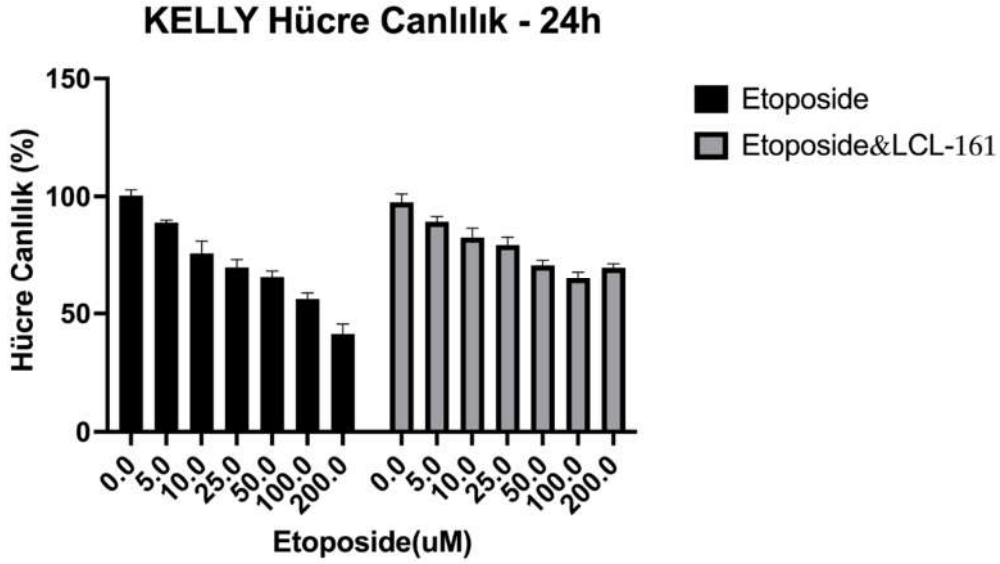
Şekil 13. Etoposid (0-200 μ M) ve LCL-161 (10 μ M) kombine uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde 24 saatlik canlılığa olan etkisi

SH-SY5Y hücrelerinde, 24 saatlik sürelerde Etoposid uygulaması artan dozlarda daha yüksek hücre ölümüne yol açmıştır. Ancak uygulanan LCL-161'in Etoposid etkinliğine anlamlı bir etkisi görülmemiştir.



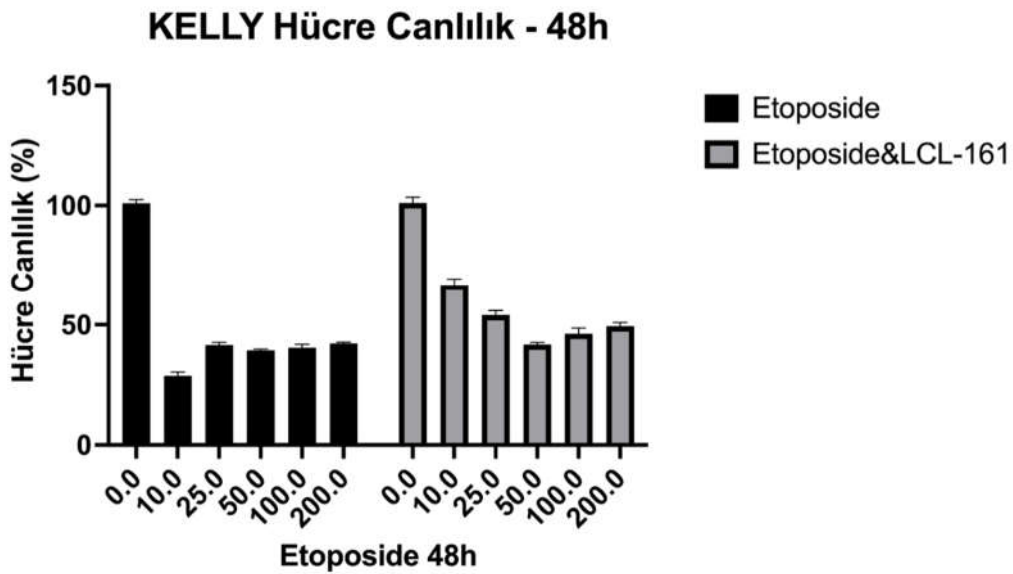
Şekil 14. Etoposid (0-200 μ M) ve LCL-161 (10 μ M) kombine uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde 48 saatlik canlılığa olan etkisi

SH-SY5Y hücrelerinde, 48 saatlik sürelerde Etoposid uygulaması 24 saatliğe göre daha da ölümü arttırmıştır ve doza bağlı olarak da ölüm yüzdesi artmıştır. Ancak uygulanan LCL-161'in Etoposid etkinliğine anlamlı bir katkısı olmamıştır.



Şekil 15. Etoposid (0-200 μ M) ve LCL-161 (10 μ M) kombine uygulamasının KELLY hücreleri üzerinde 24 saatlik canlılığa olan etkisi

KELLY hücrelerinde 24 saatlik sürede Etoposid 'in artan dozlarla tek başına hücre ölümünü arttırdığı gözlenmiştir, LCL-161'in Etoposid etkinliğine ilaveten anlamlı bir etkisi görülmemiştir.

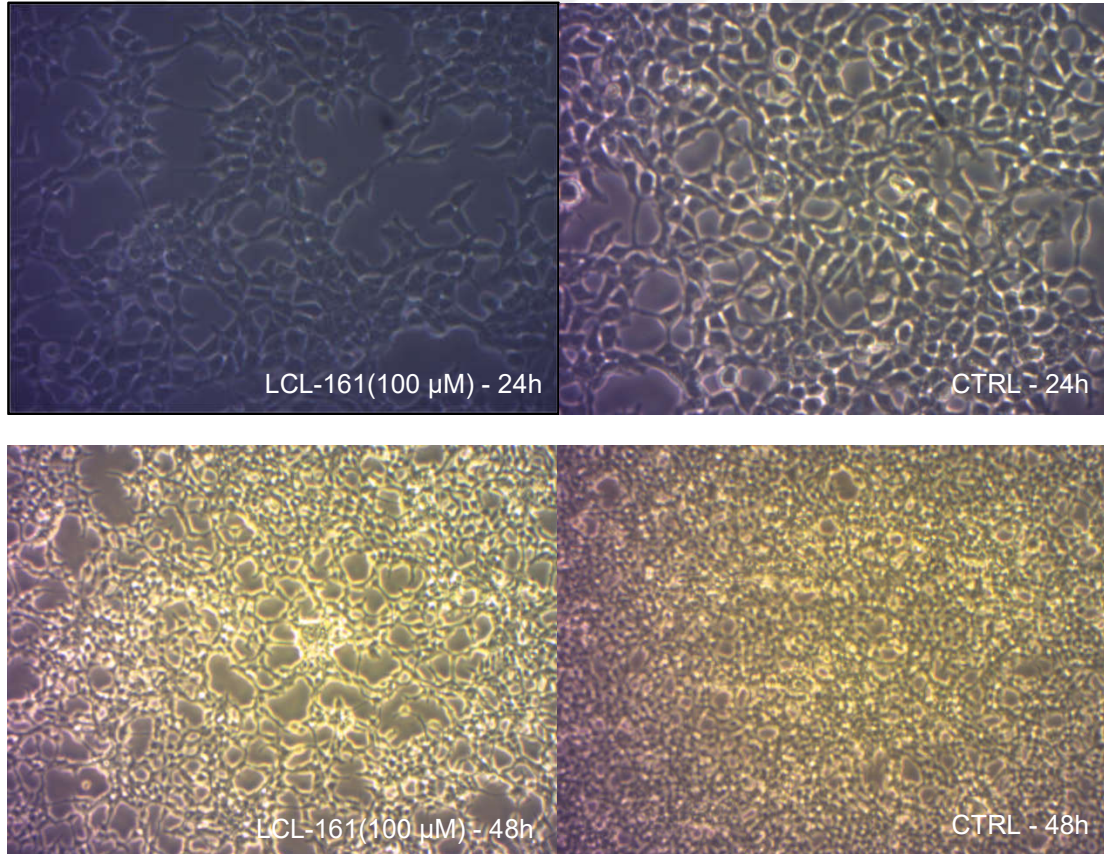


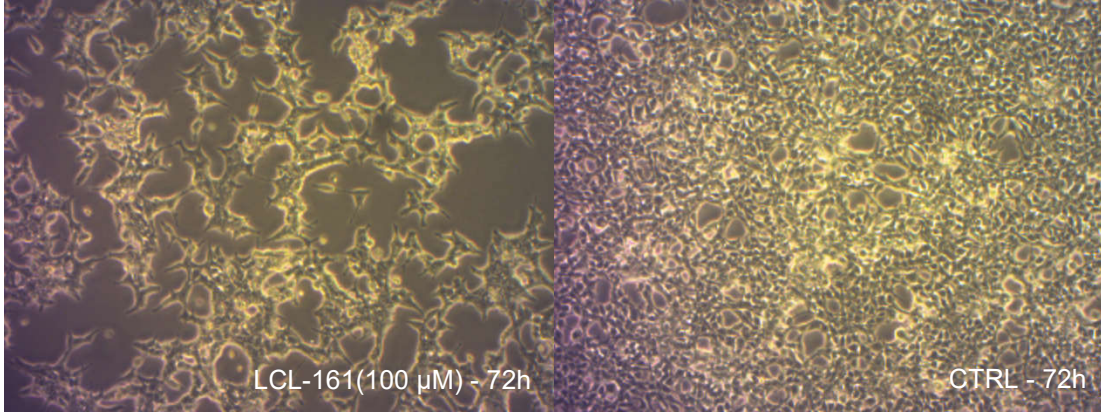
Şekil 16. Etoposid (0-200 μ M) ve LCL-161(10 μ M) kombine uygulamasının KELLY hücreleri üzerinde 48 saatlik canlılığa olan etkisi

KELLY hücrelerinde 48 saatlik sürede Etoposid 'in artan dozlarla tek başına hücre ölümünü arttırdığı gözlenmiştir, LCL-161'in Etoposid etkinliğine ilaveten anlamlı bir etkisi görülmemiştir.

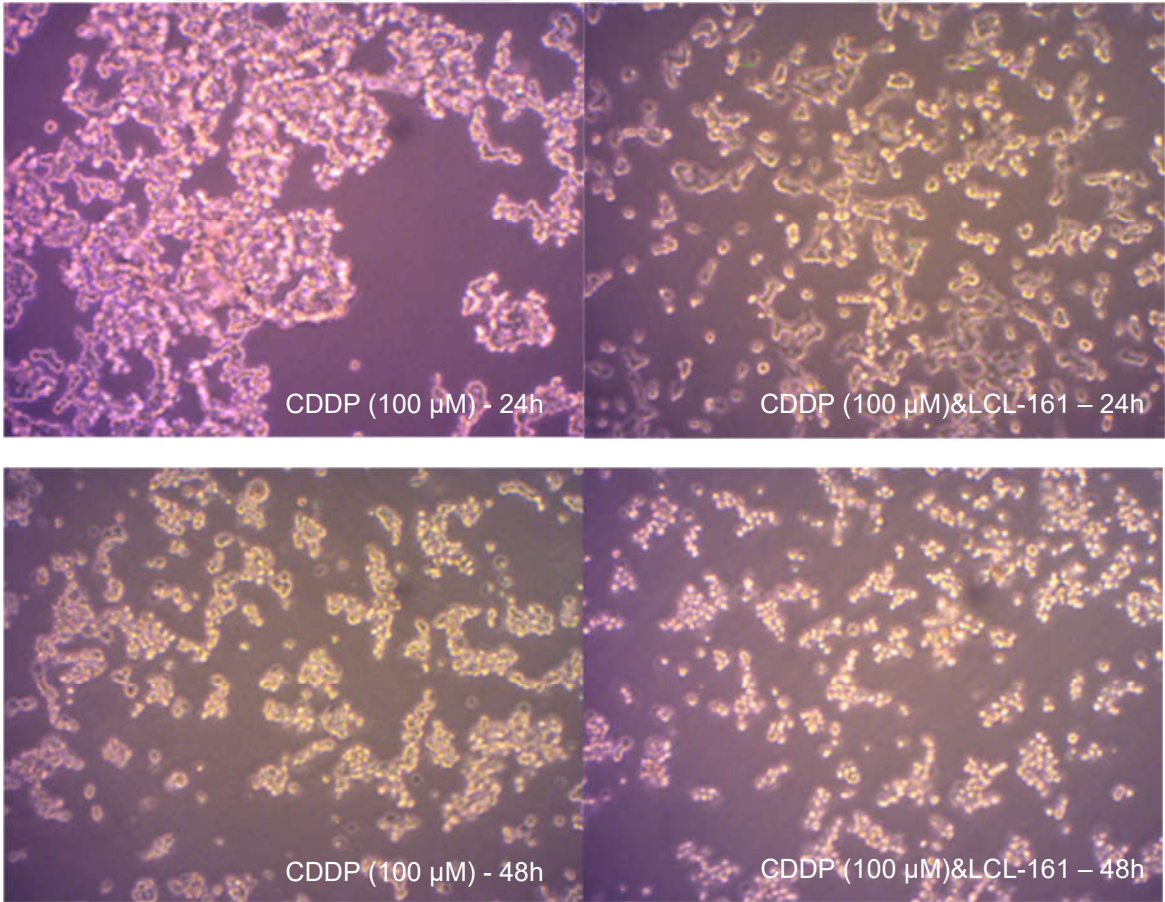
4.2 Mikroskopi Görüntüleri

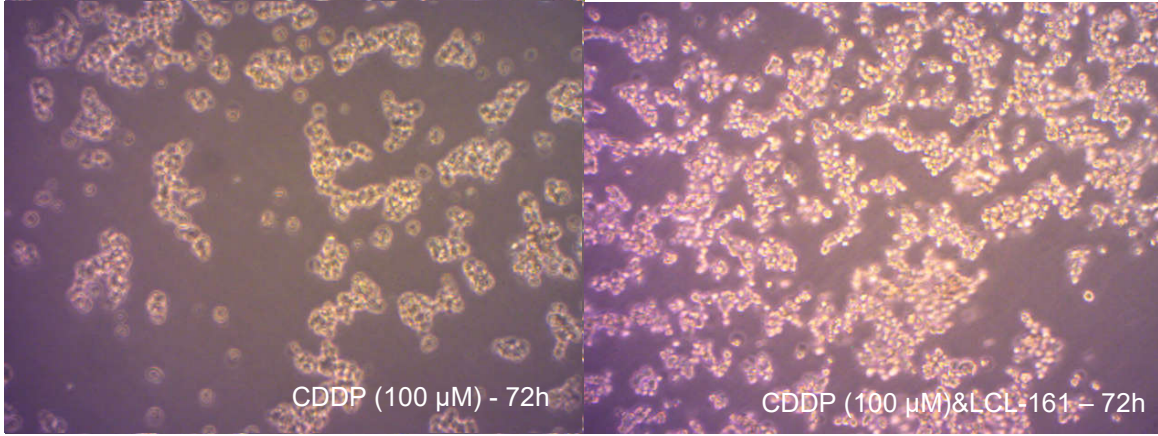
100 μ M LCL-161 ile inkube edilen SH-SY5Y hücreleri 24-48-72 saatlik sürelerde mikroskop altında incelenmiştir.



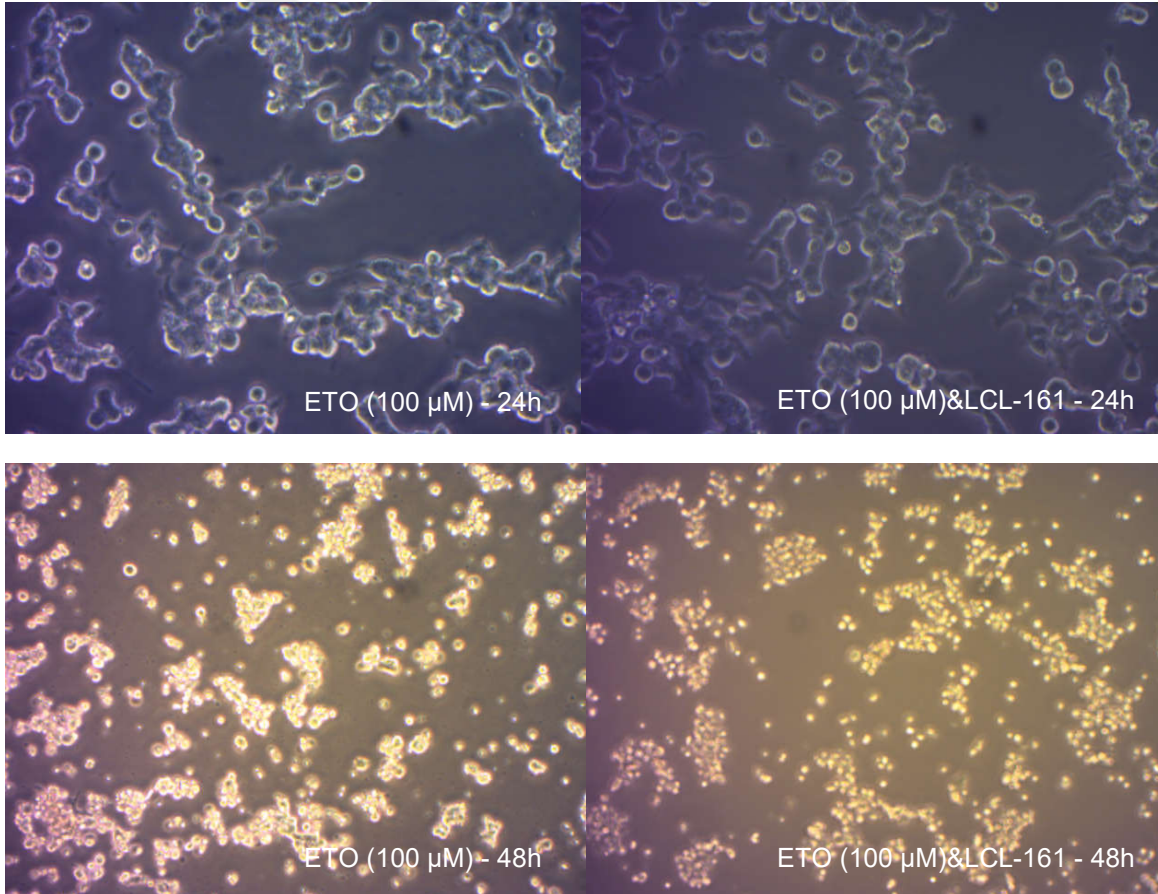


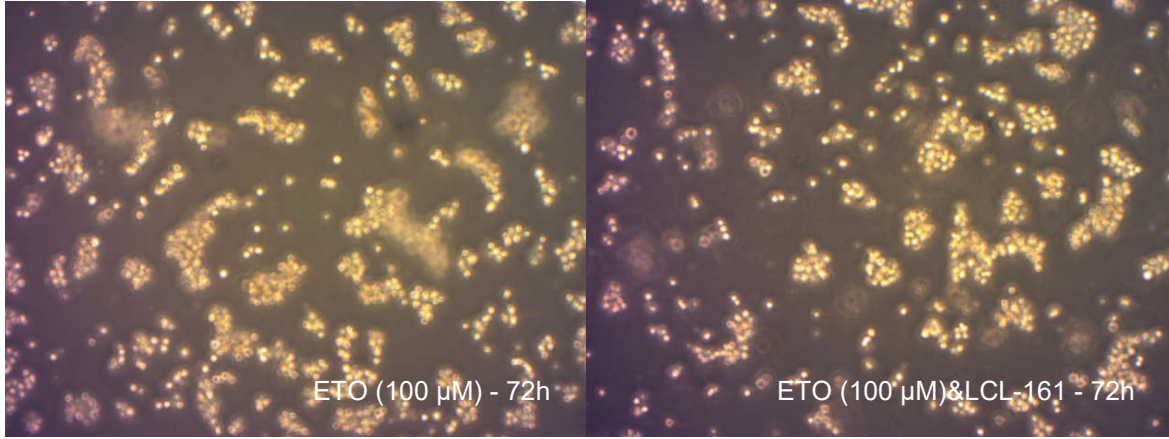
Şekil 17. LCL-161(100 µM) ile muamele edilmiş ve kontrol SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopi görüntüleri (24 -48 -72 saatlik)





Şekil 18. Cisplatin (100 µM) tek başına ve Cisplatin (100 µM) & LCL-161(10 µM) ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (24-48-72 saatlik)

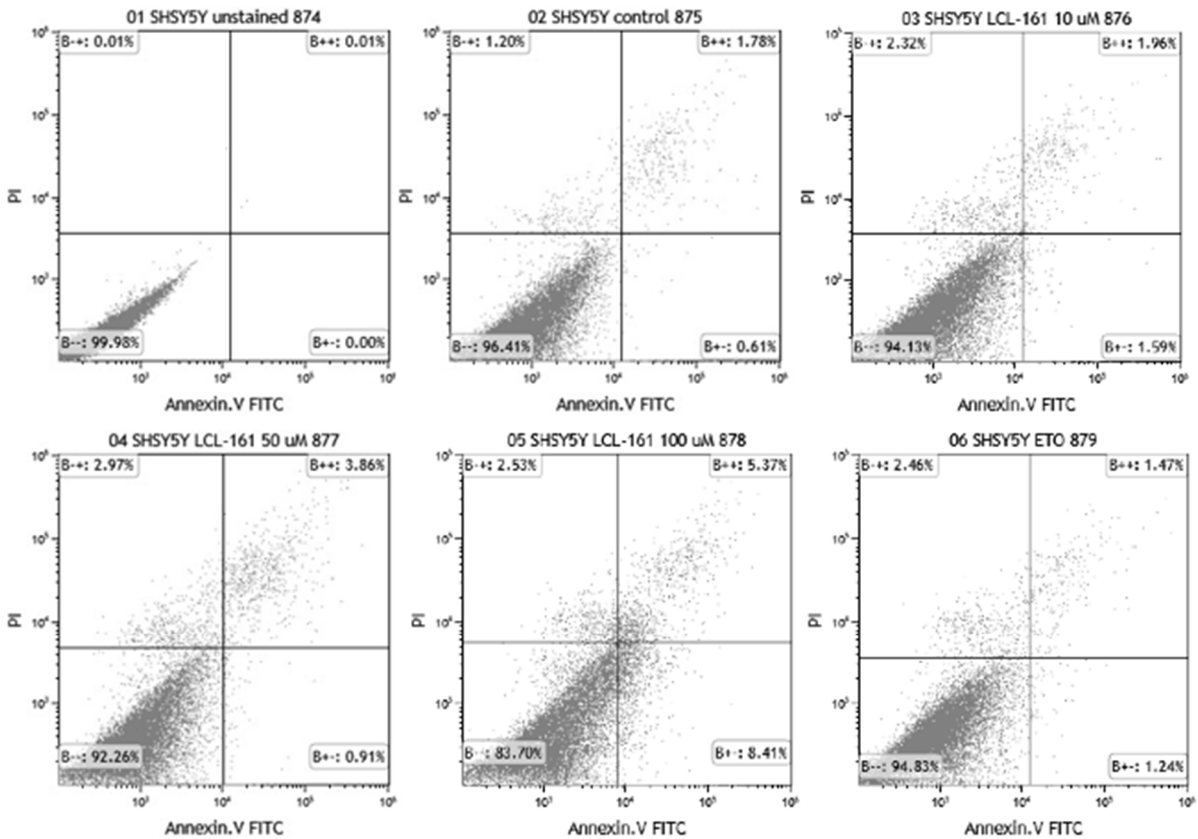


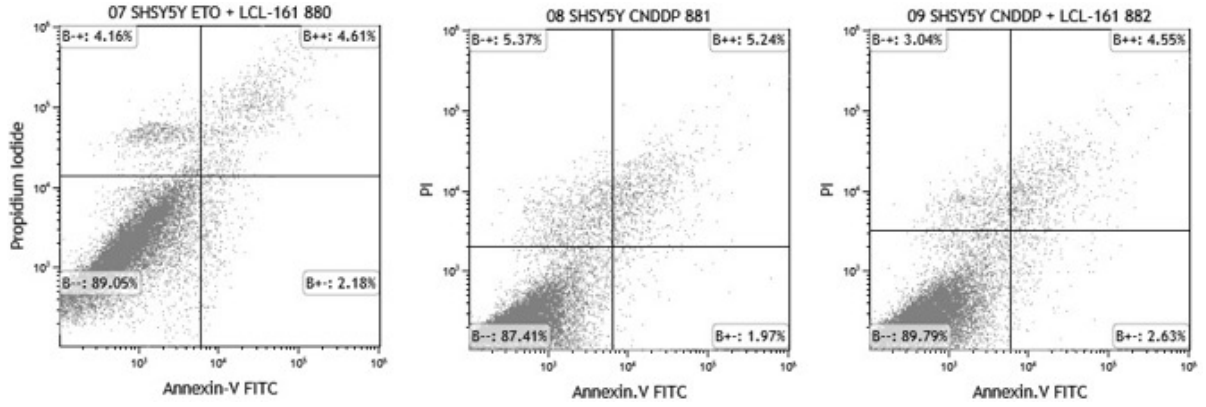


Şekil 19. Etoposid (100 µM) tek başına ve Etoposid (100 µM) & LCL-161(10 µM) ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (24-48-72 saatlik)

4.3 Akım Sitometrisi Analizleri

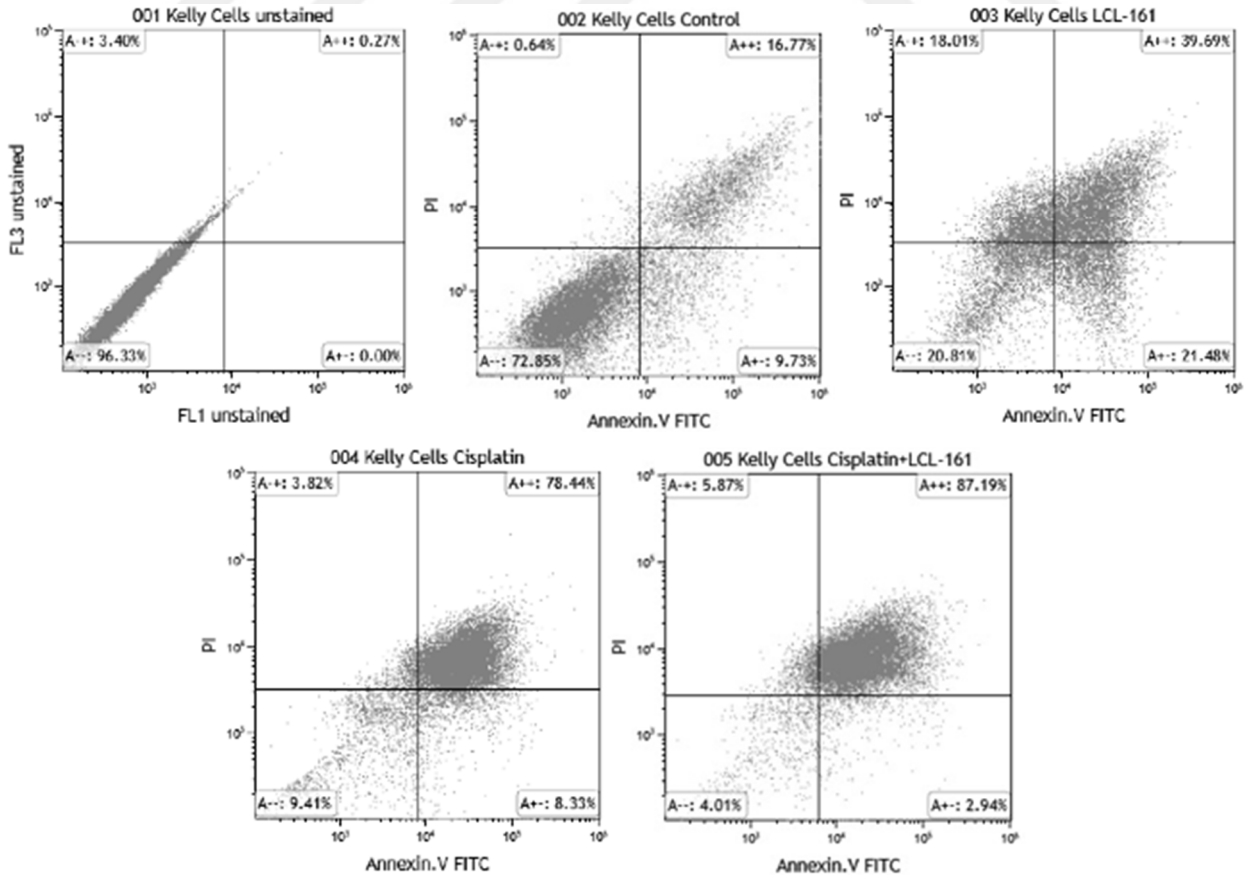
LCL-161 ile Cisplatin veya Etoposid uygulamasının hangi tip hücre ölümüne yol açtığını incelemek için Annexin V/ Propidium iyodür boyaması yapılmıştır.

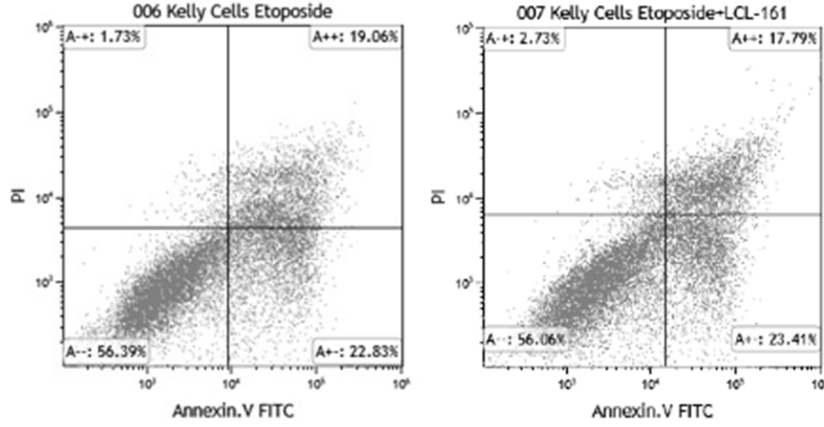




Şekil 20. SH-SY5Y hücrelerinde AnnexinV/PI incelemesi

SH-SY5Y hücrelerinde farklı dozlarda LCL-161 (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) uygulamasının, tek başına Etoposid uygulaması, Etoposid ve LCL-161 kombine uygulaması, tek başına Cisplatin uygulaması, Cisplatin ve LCL-161 kombine uygulamasının hücre canlılığına, apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne etkisi akım sitometrisinde Annexin V/PI boyamasıyla incelenmiştir.





Şekil 21. KELLY hücrelerinde Annexin V/PI incelemesi

KELLY hücrelerinde LCL-161(100µM) uygulamasının, tek başına Cisplatin, Cisplatin ve LCL-161 kombine uygulamasının, Etoposid tek başına, Etoposid ve LCL-161 kombine uygulamasının hücre canlılığı, apoptotik ve nekrotik ölüm üzerine etkinliği Annexin V/PI yöntemi ile incelenmiştir.

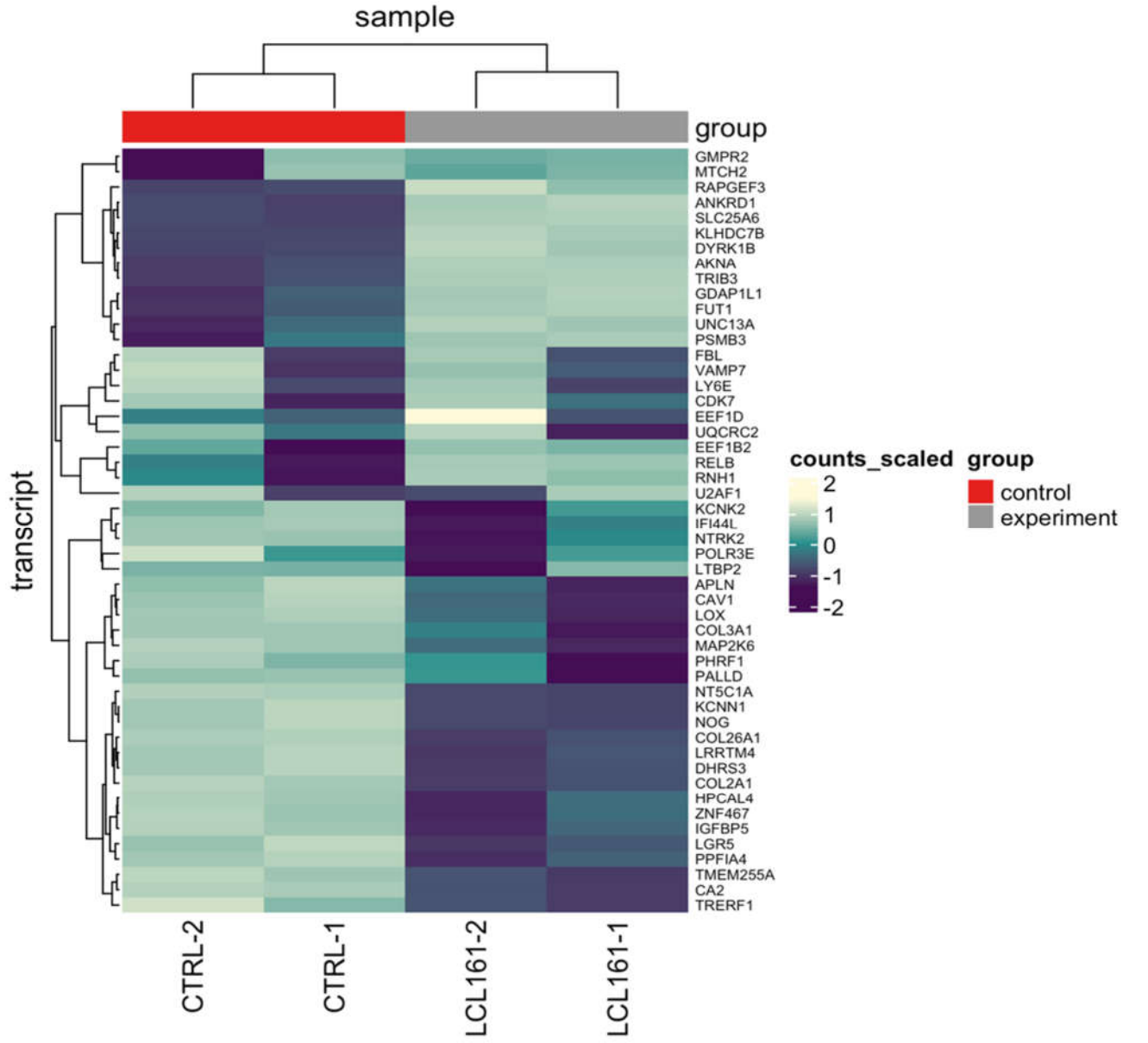
4.4 RNA Sekanslama Analizleri

Çalışmada SH-SY5Y, insan nöroblastom hücre hattı kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri, gen ekspresyonundaki değişiklikleri incelemek için 50µM LCL-161 ile 48 saat inkübe edildi. Negatif kontrol ve LCL-161 ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücreleri üzerinde toplam RNA sekanslama analizi yapıldı. Koşullar arası total 2932 gende ekspresyon değişimi saptanmıştır, 1550 genin ekspresyonunda artış gözlenirken 1382 genin ekspresyonunda ise azalış gözlenmektedir.

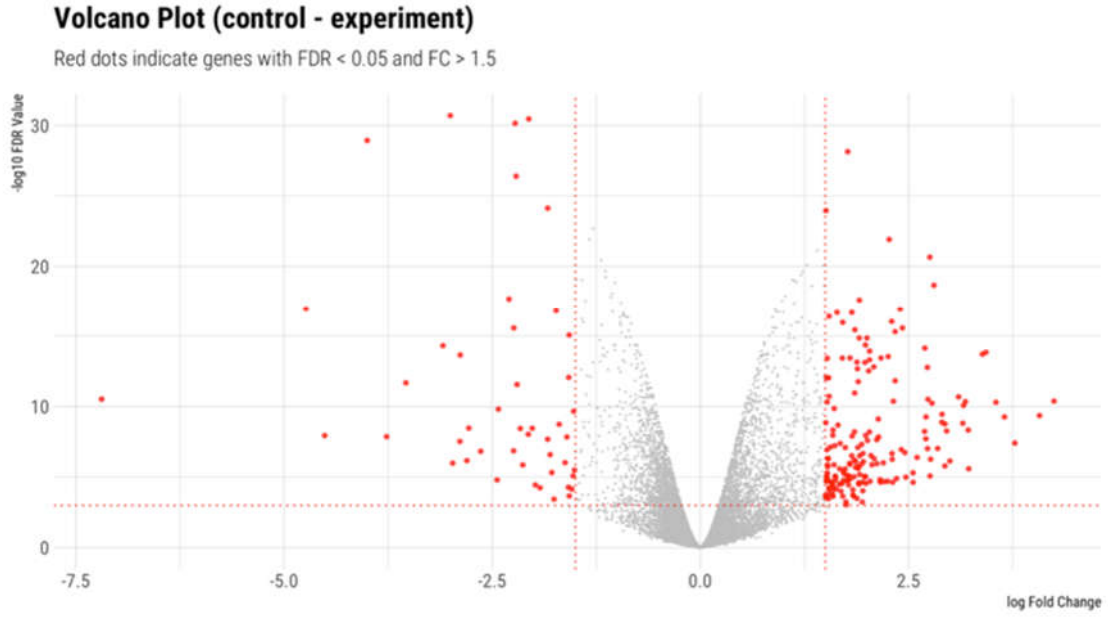


Şekil 22. Negatif kontrol ve LCL-161 uygulanan koşullardaki hücreler arasındaki gen ekspresyon değişimleri

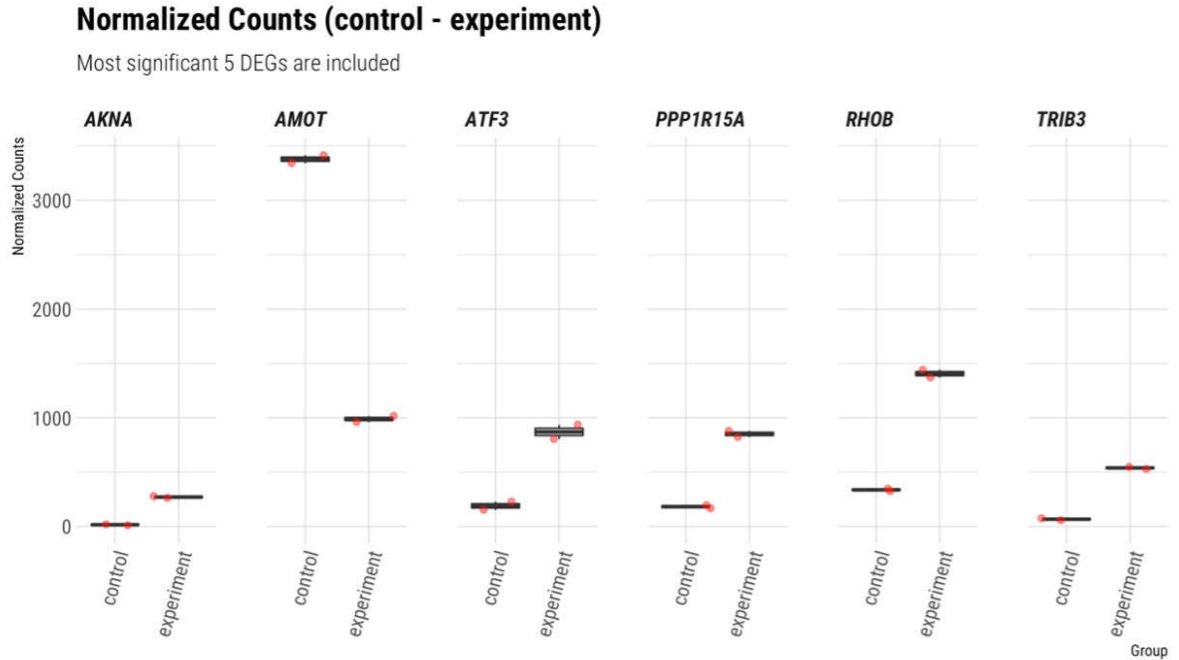
Negatif kontrol ve LCL-161 ile muamele edilmiş gruplar arasındaki gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, denetimsiz hiyerarşik küme analizi kullanılarak hesaplandı. Numuneler arasındaki Öklid mesafesi, normalleştirilmiş okumalara dayalı olarak ölçüldü. Kümeleme, ward. D2 yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gösteren genler, P değeri ($P < 0,05$), false discovery rate ($FDR < 0,05$) ve $\log Fc$ ($\log Fc > 1.5$) değerleri üzerinden değerlendirildi ve $\log Fc$ değerlerine göre sıralandı. En çok anlamlı değişkenlik gösteren 50 gen, ısı haritasında gösterildi. Yine volkan grafiği ile anlamlı değişkenlik gösteren genler kırmızı noktalarla belirtilmiştir.



Şekil 23. En çok anlamlı değişkenlik gösteren 50 gen ısı haritası grafiğinde gösterilmesi



Şekil 24. Negatif kontrol ve LCL-161 uygulanan koşullardaki hücreler arasında gen ekspresyonu anlamlı değişiklik gösteren genler volkan grafiği ile gösterilmesi



Şekil 25. Ekspresyonu en fazla anlamlı değişkenlik gösteren ilk 5 genin normalize edilmiş okumaları

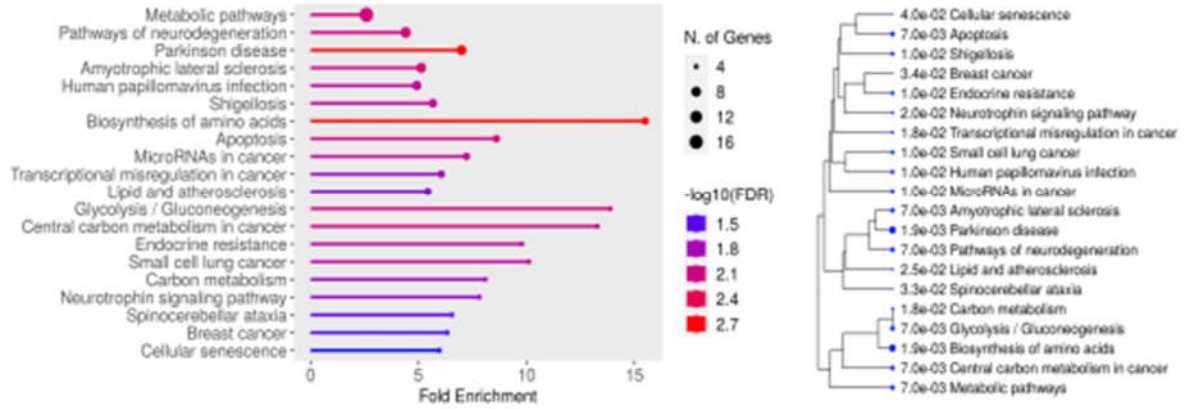
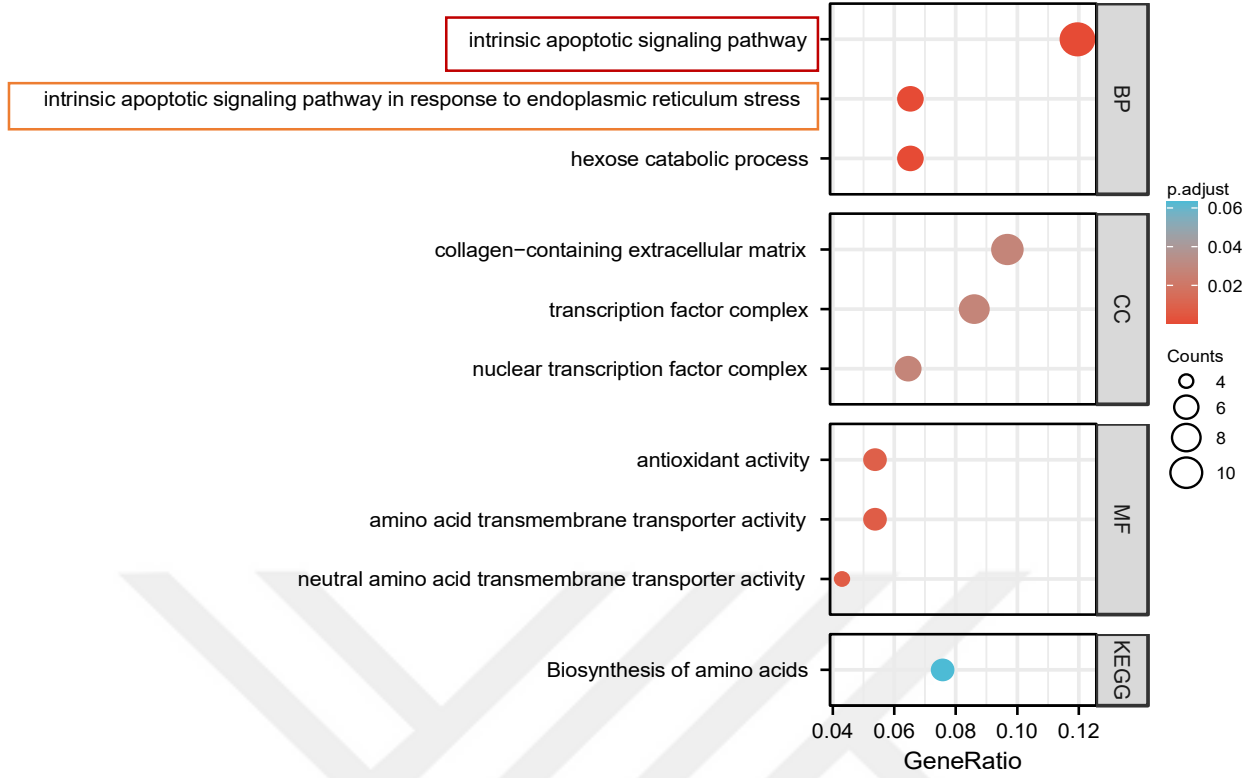
Tablo.3. RNA sekanslama sonuçlarına göre en fazla değişken ekspresyon gösteren 100 gen

Transcript	logFC	P value	FDR
TRIB3	-3,0034213	4,26E-18	4,60E-14
RHOB	-2,0609802	1,08E-17	5,84E-14
PPP1R15A	-2,2247043	2,22E-17	8,01E-14
AKNA	-4,0010216	1,00E-16	2,70E-13
AMOT	1,77007948	2,77E-16	5,99E-13
ATF3	-2,2125928	1,89E-15	3,41E-12
CTH	-1,8326773	2,14E-14	3,31E-11
KCTD12	1,50921447	2,92E-14	3,94E-11
XBP1	-1,2869467	1,19E-13	1,42E-10
JUND	-1,3316834	3,10E-13	3,04E-10
ALDH1A2	2,26867703	3,09E-13	3,04E-10
FBN2	1,4075943	7,29E-13	6,56E-10
CA2	2,75594464	1,29E-12	1,07E-09
CDC42EP1	-1,1931842	1,71E-12	1,32E-09
ANXA6	1,27917033	2,59E-12	1,87E-09
MDK	1,47414179	2,90E-12	1,96E-09
SLC7A1	-1,1394473	4,53E-12	2,88E-09
PGK1	1,23306891	4,87E-12	2,92E-09
PRDX1	1,2104302	6,70E-12	3,81E-09
CEBPG	-1,1392164	8,20E-12	4,43E-09
PGAM1	1,10674008	1,09E-11	5,41E-09
GADD45A	-1,4944574	1,10E-11	5,41E-09
STX3	-1,4225372	1,18E-11	5,52E-09
NME4	1,12505821	1,25E-11	5,63E-09
PKM	1,15508695	1,45E-11	6,25E-09
EIF4EBP1	-1,0257867	1,58E-11	6,57E-09
IGFBP5	2,80555198	1,97E-11	7,88E-09
PXDN	1,48851426	2,11E-11	8,15E-09
BAHCC1	1,33810818	2,23E-11	8,28E-09
ARHGEF2	-1,0577151	3,94E-11	1,42E-08
COL6A1	1,02070872	4,94E-11	1,72E-08
JUN	-1,0753876	5,46E-11	1,84E-08
TNFRSF12A	-2,2983272	6,45E-11	2,11E-08
HOXA13	1,909782	7,17E-11	2,28E-08
TPI1	0,98425215	8,18E-11	2,45E-08
KLF6	-1,379212	8,15E-11	2,45E-08
DDR2	-0,9497741	9,68E-11	2,82E-08
SAMD11	1,12987502	1,00E-10	2,84E-08
FUT1	-4,7363752	1,58E-10	4,37E-08
BCLAF1	0,89794934	1,68E-10	4,50E-08

Transcript	logFC	P value	FDR
LAMA4	2,39961313	1,71E-10	4,50E-08
CHAC1	-1,7320409	1,94E-10	4,98E-08
EIF1	-1,0524605	2,12E-10	5,29E-08
HMG1	0,90945249	2,16E-10	5,29E-08
MARCKSL1	0,94148886	2,26E-10	5,43E-08
CKB	0,99325123	2,58E-10	5,69E-08
SNHG1	-0,9220919	2,56E-10	5,69E-08
S100A10	1,64157512	2,57E-10	5,69E-08
NOTCH3	1,81939401	2,57E-10	5,69E-08
SARS1	-0,9232097	3,18E-10	6,78E-08
KIF1A	-0,9325835	3,20E-10	6,78E-08
FSCN1	1,54608899	3,62E-10	7,51E-08
SLC7A5	-0,9051492	3,70E-10	7,53E-08
SLC38A1	-0,8692387	4,08E-10	8,02E-08
STC2	-0,8749541	4,23E-10	8,02E-08
GPX1	0,86750052	4,18E-10	8,02E-08
UNC5B	-0,9629794	4,18E-10	8,02E-08
COL4A2	1,21869442	4,37E-10	8,14E-08
CEBPB	-1,424544	4,88E-10	8,93E-08
SELENBP1	2,29817676	6,03E-10	1,09E-07
SEPTIN6	1,30741473	6,39E-10	1,13E-07
SLC7A11	-1,4073451	6,51E-10	1,13E-07
CDKN2C	1,15368572	6,68E-10	1,14E-07
BNIP3	1,1872899	6,80E-10	1,15E-07
SLC3A2	-0,9646979	6,94E-10	1,15E-07
MATK	1,71014266	7,10E-10	1,16E-07
XPOT	-0,8329641	7,77E-10	1,25E-07
SPTBN2	0,99782563	7,87E-10	1,25E-07
NR2F1	1,3939141	8,46E-10	1,32E-07
SIPA1L2	-1,1826797	8,81E-10	1,36E-07
GTPBP2	-0,9572822	9,11E-10	1,39E-07
KIF20A	1,08841066	9,37E-10	1,40E-07
UCHL1	0,86932259	1,13E-09	1,67E-07
SOD1	0,89826313	1,16E-09	1,69E-07
SOX4	0,91046103	1,19E-09	1,72E-07
ASNSP1	-2,2401612	1,23E-09	1,72E-07
ZNF503-AS2	2,42724713	1,22E-09	1,72E-07
ITPR3	1,85517784	1,42E-09	1,97E-07
B4GALT5	-0,8626164	1,51E-09	2,07E-07
TUBB4A	2,33976503	1,67E-09	2,25E-07
GAS1	1,34521602	1,74E-09	2,33E-07

Transcript	logFC	P value	FDR
MAGED1	0,86898215	1,81E-09	2,39E-07
CHPF	-0,9476451	1,85E-09	2,40E-07
PCDH7	1,06615296	2,01E-09	2,58E-07
ERN1	-1,5749388	2,24E-09	2,85E-07
NT5DC2	0,82972926	2,38E-09	2,99E-07
SIX1	1,30218188	2,50E-09	3,10E-07
TP53	-0,8389043	2,71E-09	3,32E-07
UHRF1BP1	-0,891509	2,84E-09	3,45E-07
SMARCA1	1,06446689	2,97E-09	3,53E-07
DLX1	1,90859246	2,98E-09	3,53E-07
SHISA2	2,00033583	3,01E-09	3,53E-07
ISYNA1	1,12488086	3,08E-09	3,57E-07
LRRC8D	-1,2081241	3,54E-09	4,06E-07
SMAD6	1,32815578	3,58E-09	4,06E-07
B4GALNT4	1,38781234	4,24E-09	4,77E-07
PRDX3	0,77332131	4,38E-09	4,88E-07
SLIT2	0,76361397	4,43E-09	4,88E-07
PLTP	1,34217856	5,05E-09	5,51E-07

GO yolu ve KEGG zenginleştirme analizleri, KEGG çevrimiçi aracı (<http://www.genome.jp>) kullanılarak yapıldı ve ilk 100 DE geniyle ilgili biyolojik ve moleküler yolları gösterdi. Ayrıca, protein-protein etkileşimleri, STRING veri tabanı (<http://string-db.org>) kullanılarak incelendi ve ER-stresi ile ilgili genler arasında güçlü etkileşimler gösterdi.



Şekil 27. Gene ontoloji analizleri ile anlamlı değişkenlik gösteren genlerle ilişkili yollar belirlenmesi

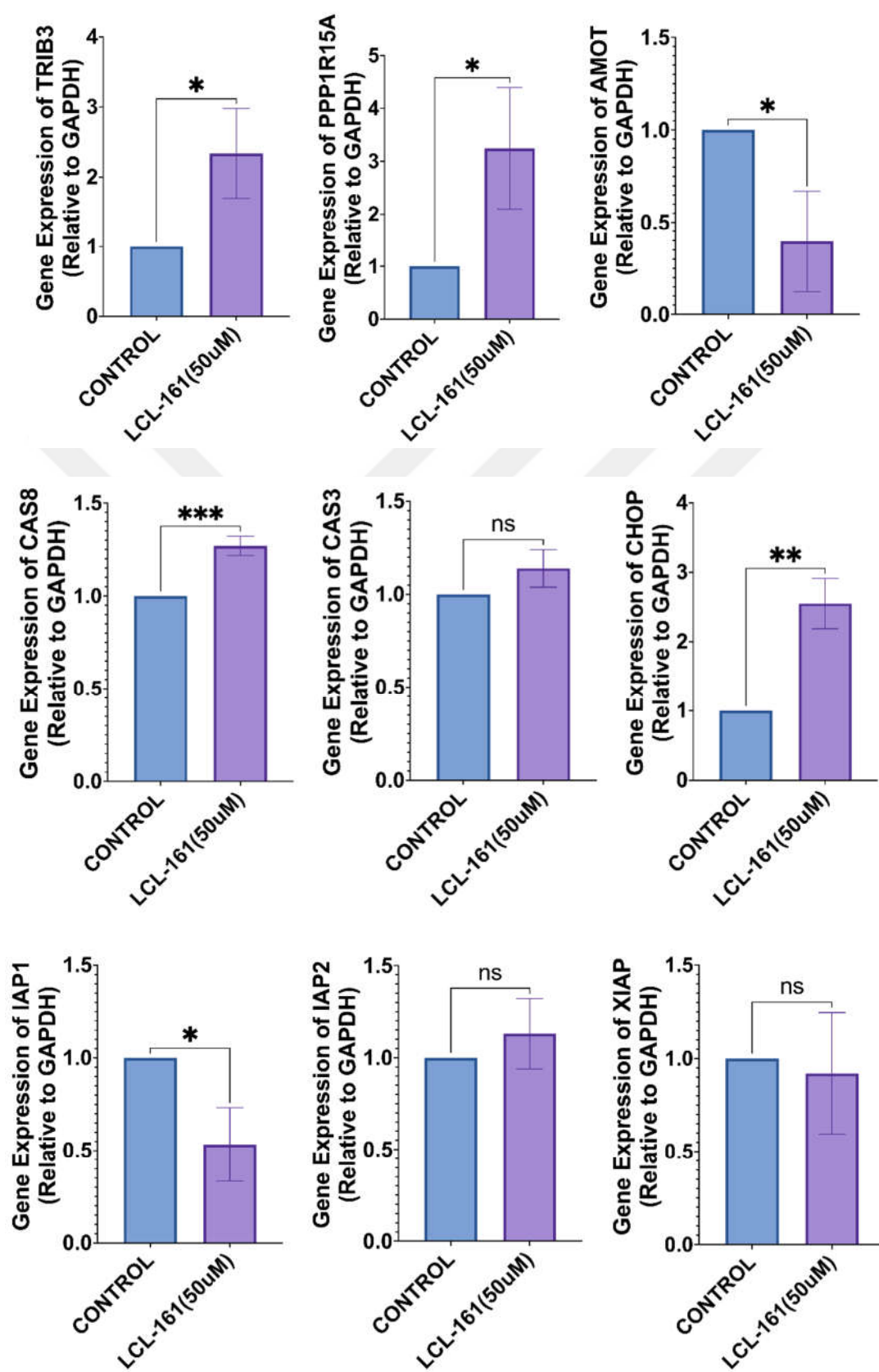
4.5 Eş-zamanlı Kantitatif PCR (Q-RT-PCR) Analizleri

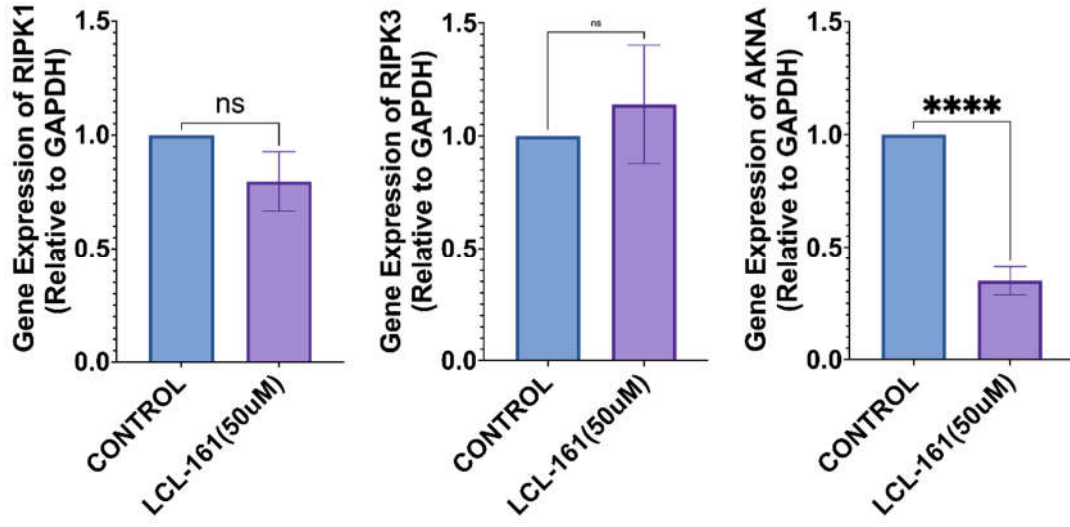
4.5.1 Tek- başına LCL-161 Uygulaması Sonucunda Gen Ekspresyon Değişimleri

RNA sekanslama sonuçlarını doğrulamak için bir Q-RT-PCR analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla RNA sekanslama deneyinde olduğu gibi 50 µM LCL-161 ile 48 saat muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen mRNA'lar Q-RT-PCR analizlerinde kullanıldı. Gen ifadelerindeki değişimler genlere spesifik primerler ve GAPDH kontrol primer kullanılarak delta-delta Ct metodu ile analiz edildi. İstatiksel olarak koşullar arası farklılık t testi kullanılarak hesaplandı.

İlk etapta RNA sekanslama sonuçlarında gen ifadesi en fazla anlamlı değişkenlik gösteren genler incelendi. LCL-161 ile indüklenen hücrelerde Tribbles Pseudokinase 3 (TRIB3) ($p=0,0225$), Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A (PPP1R15A) ($p=0,0277$) gen ekspresyonları anlamlı derecede artış gösterirken, Angiomotin (AMOT) ($p=0,0187$) gen ekspresyonu anlamlı düzeyde düşük çıkmıştır. Elde edilen bu Q-RT-PCR sonuçları, RNA sekanslama sonuçlarına paraleldir. RNA sekanslama çalışmasında AKNA gen ekspresyonunda artış gözlenirken Q-RT-PCR sonuçlarında ise AKNA gen ekspresyonunda ($p<0,001$) anlamlı düzeyde azalış saptanmıştır.

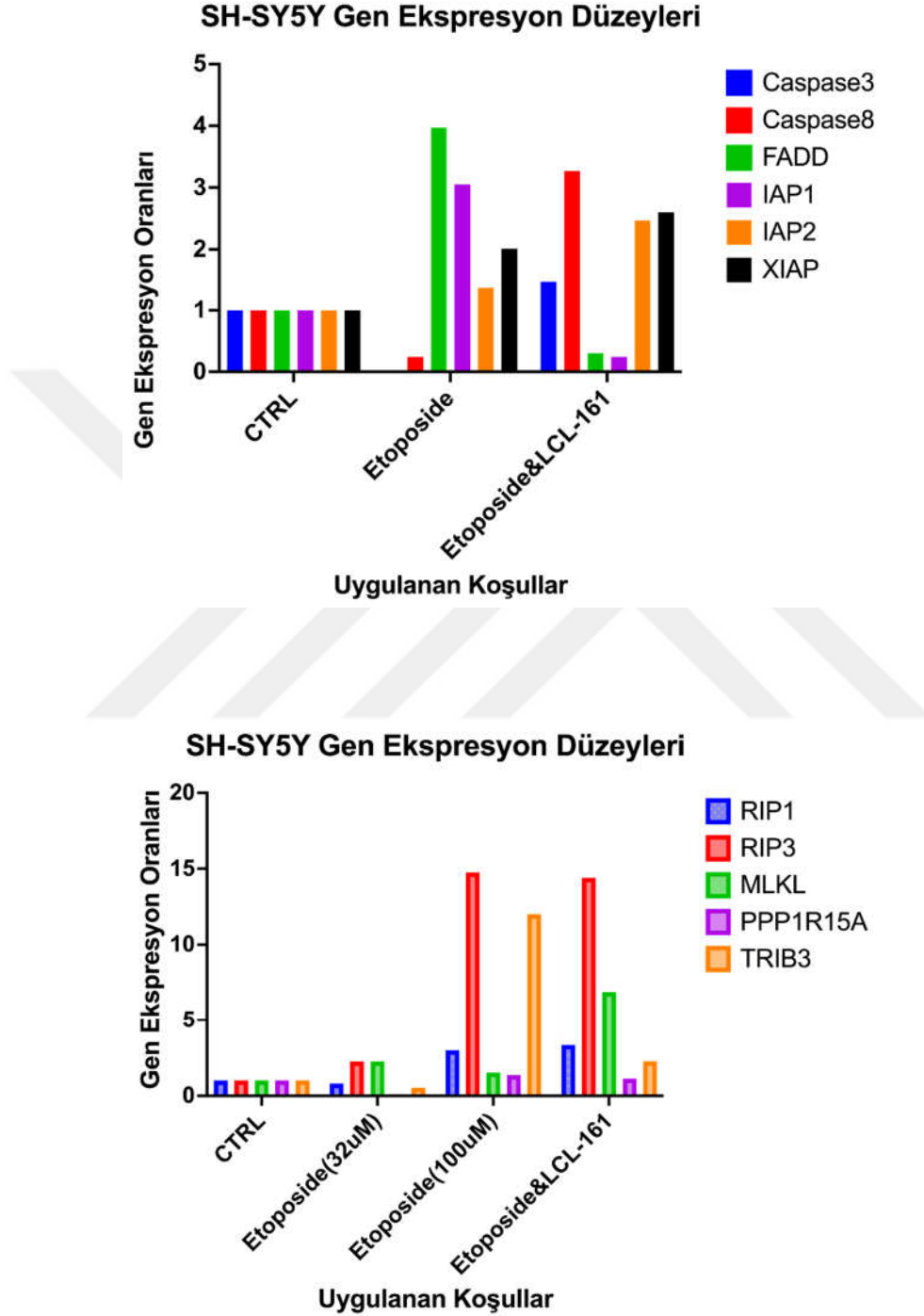
Çalışmanın devamında LCL-161 ile indüklenen hücrelerde apoptotik gen ekspresyonları Kaspaz 8 (CAS8), Kaspaz 3 (CAS3), C/EBP-Homolog Protein (CHOP veya DDIT3) incelenmiştir. CAS8 ($p=0,0008$) ve CHOP ($p=0,0018$) gen ekspresyonlarında anlamlı düzeyde bir artış gözlenirken, CAS3 gen ekspresyonunda artış gözlenmesine rağmen anlamlı düzeyde ($p=0,0752$) bulunmamıştır. Anti-apoptotik gen ekspresyonlarında IAP'ler incelenmiştir. Hücrede SMAC proteini aktivitesini IAP'leri inhibe ederek göstermektedir. LCL-161'in hedefleri arasında cIAP1, cIAP2 ve XIAP yer almaktadır. cIAP1 ($p=0,0152$) gen ekspresyonunda anlamlı düşüş gözlenirken cIAP2 ($p=0,3027$) ve XIAP ($p=0,6919$) gen ekspresyonlarında herhangi anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Devamında nekroptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonları incelendi. Reseptör Interaksiyon Kinaz 1 (RIPK1) ($p=0,0542$) ve Reseptör Interaksiyon Kinaz 3 (RIPK3) ($p=0,4073$)'de gen ekspresyonlarında anlamlı değişiklik saptanmadı.





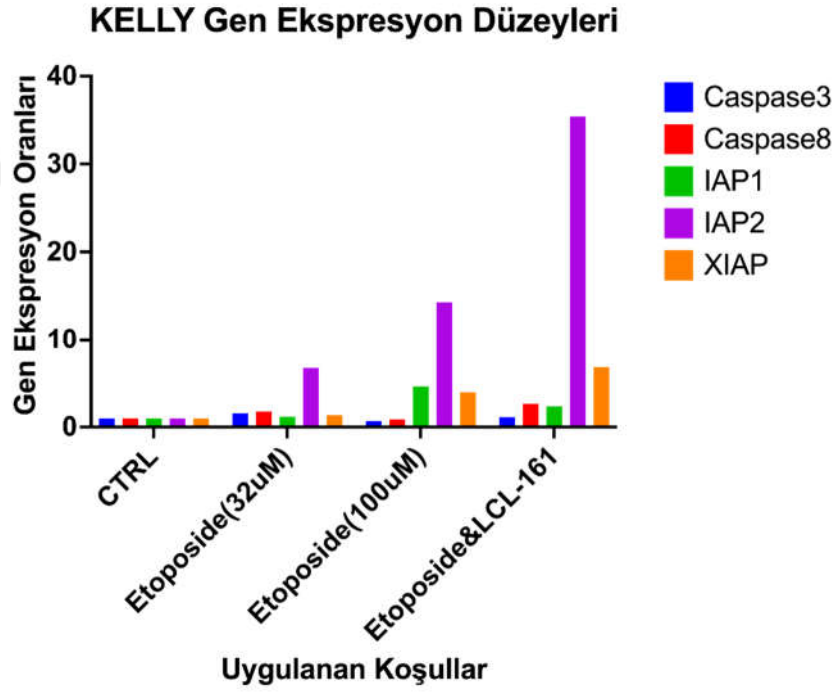
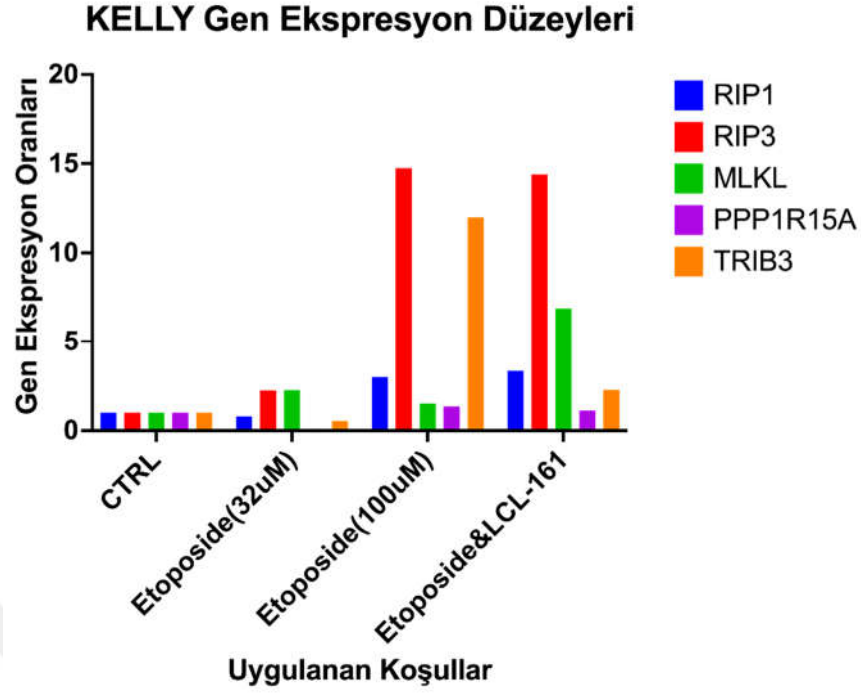
Şekil 28. Q-PCR ile LCL-161 tek başına uygulamasına bağlı olarak gen ekspresyonlarının değişimlerinin incelenmesi

4.5.2 Kemoterapi ile LCL-161 Uygulaması Sonrasında Gen Ekspresyonlarının Analizleri



Şekil 29. SH-SY5Y hücrelerinde uygulanan koşullara bağlı olarak apoptotik ve nekroptotik gen ekspresyon değişimlerinin gösterilmesi.

Bu set için uygulanan koşullardaki gen ekspresyonları ilk olarak GAPDH genine orantılanmış devamında da uygulanan koşullar negatif kontrol koşuluna orantılanarak negatif kontrole göre gen ekspresyon değişimleri incelenmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde tek başına Etoposid uygulaması FADD ve antiapoptotik genler IAP1, IAP2, XIAP ekspresyonlarını arttırmıştır, Etoposid ve LCL-161 kombine uygulaması ise pro-apoptotik genler Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 ekspresyonunu artırırken FADD ve IAP1 ekspresyonlarını düşürmüştür. Tek başına Etoposid uygulaması RIPK3 ve TRIB3 ekspresyonunu artırırken, Etoposid ve LCL-161 kombine uygulaması nekroptotik genler RIPK1, RIPK3 ve MLKL gen ekspresyonlarını arttırılmış ve TRIB3 gen ekspresyonunu azaltmıştır.



Şekil 30. KELLY hücrelerinde uygulanan koşullara bağlı olarak apoptotik (Kaspaz 3, Kaspaz 8, IAP1, IAP2, XIAP) setin rölatif gen ekspresyon değişimlerinin gösterilmesi

Bu set için uygulanan koşullardaki gen ekspresyonları ilk olarak GAPDH genine orantılanmış devamında da uygulanan koşullar negatif kontrol koşuluna orantılanarak negatif kontrole göre gen ekspresyon değışimleri incelenmiştir.

KELLY hücrelerinde tek başına Etoposid uygulaması RIP3 ve TRIB3 gen ekspresyonlarını arttırırken, Etoposid ve LCL-161 kombine uygulaması nekroptotik RIPK1, RIPK3 ve MLKL gen ekspresyonlarını arttırmıştır. Kombine uygulama TRIB3 gen ekspresyonunu azaltmıştır.

Yine tek başına Etoposid uygulaması anti-apoptotik genler IAP1, IAP2 ve XIAP gen ekspresyonlarını arttırmıştır, LCL-161 ve Etoposid kombine uygulaması ise hem pro-apoptotik Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 hem de anti-apoptotik IAP1, IAP2 ve XIAP gen ekspresyonlarını arttırmıştır.

5. TARTIŞMA

Pek çok tümör tipinde IAP'lerin aşırı ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (136). Yine, yüksek SMAC ekspresyonu gösteren hastaların ise daha iyi prognoza ve sağ kalıma sahip oldukları gösterilmiştir (137). İlk etapta IAP'lere karşı antisens oligomerler geliştirilmiştir, devamında ise SMAC proteinin yapısından yola çıkılarak SMAC mimetikler yani SMAC proteinini taklit eden kimyasal ajanlar geliştirilmiştir (138, 139). SMAC proteinini N ucunda bulunan AVPI motifi aracılıklı olarak IAP'lerin BIR motiflerine bağlanmakta ve onları inhibe etmektedirler. SMAC mimetikler de bu AVPI motifleri üzerine geliştirilmiş ajanlardır. Tek AVPI motif içeren ajanlar monovalent tip olarak adlandırılırken iki AVPI motif içeren ajanlar ise bivalent olarak adlandırılmaktadırlar (139). LCL-161, Novartis firması tarafından geliştirilen monovalent tipte bir SMAC mimetiktir. LCL-161'in hücre hatları üzerindeki etkinliği farklı çalışmalarla incelenmiştir. Yapılan çalışmada daha önce nöroblastom hücre hatları üzerinde bu ajan denendiği için LCL-161'i kullanmayı tercih edildi. Ancak LCL-161'in etkinliği daha önce hiç SH-SY5Y hücre hatlarında ve Cisplatin ile çalışılmamıştı. Çalışmada iki farklı nöroblastom hücre hattı kullanıldı. KELLY, NMYC pozitif ve kötü prognozu yansıtan bir hücre hattıyken SH-SY5Y ise NMYC negatif iyi prognozu yansıtan bir hücre hattı olarak kullanılmıştır. Çalışmada iki farklı kemoterapi Cisplatin ve Etoposid ile LCL-161 etkinliğinin incelenmesi ve LCL-161'in bu hücre hatları üzerinde bu kemoterapi ilaçlarının etkinliğini arttırıp arttırmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada mono terapi olarak LCL-161 uygulamasında, LCL-161 için 24 saatlik sürede SH-SY5Y hücre hatlarında hücrelerin %50'sini öldüren (lethal doz 50) LD50 dozu 50 μ M belirlenirken KELLY hücre hattı için LD50 dozu 100 μ M olarak belirlenmiştir. SH-SY5Y hücre hattında hücre canlılığı 24 ve 48 saatlik sürelerde ciddi bir değişim göstermezken, KELLY hücre hattında ise yüksek dozlarda 48 saatlik süre sonunda 24 saate göre canlılıkta ciddi azalma gözlenmiştir. Najem ve ark tarafından yapılan çalışmada farklı nöroblastom hücre hatları üzerinde tek başına LCL-161 uygulaması için LD50 dozları 49.4-77.9 μ M olarak saptanmıştır (12). Biz de yapılan çalışmada kullandığımız hücre hatlarında bu dozlara yakın LD50 değerleri saptadık.

Çalışmanın devamında LCL-161 ile Cisplatin veya Etoposid ilaçlarıyla kombine kullanımın hücre canlılığı üzerindeki etkisi ölçülmüştür. Her iki hücre hattının da kemoterapi ilaçlarına duyarlılığı farklı olarak saptanmıştır. Cisplatin, beklenenin aksine SH-SY5Y hücre

hatlarında hücre ölümünü tetiklemede yetersiz kalmıştır. Tek başına ve LCL-161 kombine Cisplatin uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde 48.saat sonunda bile hücre canlılığı %50'den fazladır. 100µM gibi yüksek dozlarda bile Cisplatin SH-SY5Y hücrelerinde hücre ölüm yanıtını başlatmakta yetersiz kalmıştır. LCL-161'in ise SH-SY5Y hücrelerinde Cisplatin'in etkinliğine hiçbir katkısı gözlenmemiştir. Etoposid uygulaması ise SH-SY5Y hücrelerinde daha çok hücre ölümünü tetikleyebilmiştir. Özellikle 48.saatten sonra 10µM dozlarında da hücrelerin canlılığını %50'nden fazla azalmıştır. Uygulanan yüksek dozlar da daha yüksek canlılığa ulaşılmıştır. Najem ve ark çalışmasında Etoposid uygulamaları 0-20µM dozları arasında yapılırken Eschenburg ve ark çalışmasında ise Etoposid uygulaması 0-5µM dozları arasında yapılmıştır (12; 134). Çalışmamızda daha önce yapılan her iki çalışmaya göre daha yüksek doz kullanılmıştır. Daha yüksek dozlarda (10µM) 48 saatlik sürede LD50 değerlerine ulaşılabilmektedir. LCL-161 uygulamasının ise Etoposid etkinliğine SH-SY5Y hücrelerinde katkısı olmamıştır.

KELLY hücrelerinde Cisplatin uygulaması hücre ölümünü ciddi oranda arttırmıştır. Tek başına Cisplatin uygulaması 24 saatlik sürede 12,5µM gibi uygulanan en düşük dozlar da bile %90'a yakın hücre ölümünü tetiklemiştir. Benzer şekilde 48 saatlik sürelerde de Cisplatin uygulaması KELLY hücrelerinde ciddi oranda hücre ölümünü tetiklemiş, LCL-161 uygulaması az da olsa bu ölüm yanıtını arttırıcı yönde etki etmiştir. KELLY hücrelerinde Etoposid uygulaması 24 saatlik sürede 200µM gibi yüksek dozlarda hücre ölüm yanıtını tetiklemede etkisiz kalmıştır, 48 saatlik sürenin sonunda Etoposid uygulaması bu hücrelerin %50'sinde ölüm yanıtını tetikleyebilmiştir. Yine LCL-161 kombine uygulamasının bu hücrelerde Etoposid yanıtına hiçbir etkisi olmamıştır.

Annexin V/PI boyaması yapıp akım sitometrisinde analiz edilerek SH-SY5Y ve KELLY hücrelerinde LCL-161, Cisplatin, Etoposid, Cisplatin&LCL-161, Etoposid&LCL-161 uygulamalarının hücredeki apoptotik yanıt ve nekrotik yanıt etkisi ölçülmüştür. Tek başına LCL-161 uygulaması 100µM gibi yüksek dozda bile 24 saatlik sürede SH-SY5Y hücrelerinde sağ kalımı ancak %10 civarında azaltabilmiştir. Bu etkinin de daha çok apoptotik ölüm üzerinden gerçekleştiği gözlenmiştir. Cisplatin uygulaması da SH-SY5Y hücrelerinde %13 gibi ölüme yol açmış, bu etkinin yarısı apoptotik yarısı da nekrotik olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. LCL-161 uygulamasının ise Cisplatin etkinliğine hiçbir katkı yapmadığı yine akım sitometrisi analizlerinde de gözlenmiştir. Akım sitometrisi analizlerinde Etoposid uygulaması da SH-SY5Y hücrelerinde canlılığı azaltamamıştır. Hem tek başına Etoposid uygulanan hem de

Etoposid ve LCL-161 kombine uygulanan hücrelerde canlılık %90'ların üzerindedir. Yani hücre canlılık analizlerinin aksine, akım sitometrisi analizlerinde Etoposid uygulaması SH-SY5Y hücrelerinde hiçbir hücre ölüm yanıtını tetiklememiştir.

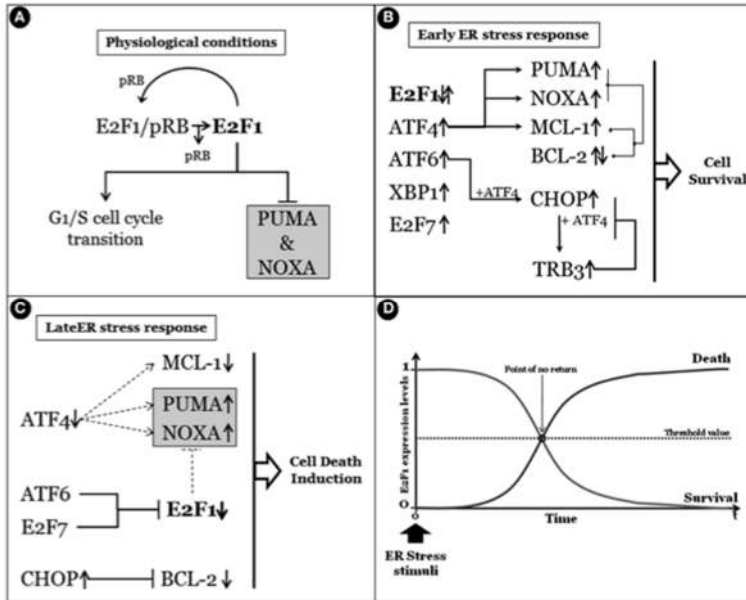
Akım sitometri analizlerinde, KELLY hücrelerinde tek başına 100µM LCL-161 uygulaması hücrelerin %80'inde hücre ölüm yanıtını tetiklemiştir. Hücrelerin büyük çoğunluğu (%60) apoptotik ölüme giderken daha az miktarda hücrenin (%20) ise nekrotik ölüme gittiği gözlenmiştir. KELLY hücrelerine tek başına Cisplatin uygulaması hücrelerin %86'sında hücre ölümünü tetiklerken, gözlenen bu ölüm tamamen apoptotik mekanizmalar üzerinden gerçekleşmiştir. LCL-161 kombine uygulaması ise az da olsa Cisplatin etkinliğini artırarak bu hücrelerde hem apoptotik hem de nekrotik ölüm miktarlarını arttırmıştır. KELLY hücrelerinde tek başına Etoposid uygulaması hücrelerin %40'ında ölüm yanıtı yol açarken, oluşan bu ölüm yanıtının apoptotik aracılıklı olduğu gözlenmiştir. LCL-161 uygulamasının Etoposid yanıtına hiçbir etkisi olmamıştır.

Çalışmadaki bir diğer iş paketinde ise; RNA sekanslama ile SH-SY5Y hücrelerinde LCL-161 uygulaması sonrasında total gen ekspresyon değişimlerini incelenerek LCL-161'in hücrede etki ettiği moleküler mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla SH-SY5Y hücreleri LD50 dozu olarak belirlenen 50µM LCL-161 ile 48 saat boyunca muamele edilmişler ve devamından bu hücrelerden ve kontrol hücrelerinden (<0.05% DMSO ile muamele edilmiş) RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA'lar konsantrasyon ve bütünlük açısından yeterli bulunduktan sonra bu RNA'lar kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar Novaseq platformu kullanılarak sekanslanmışlardır. Farklı biyoinformatik araçlar kullanılarak okumalar analiz edilmiştir. İlk etapta okumalar FASTQ programında kalite yönünden kontrol edilmiştir. Devamında Trimmomatic aracı kullanılarak okumalardan düşük kalitede ve indeks adaptörleri çıkartılmıştır. HISAT aracı kullanılarak referans genom olarak GRCh38.p13 kabul edilerek hizalama yapılmıştır. Hizalama işlemi önemlidir çünkü bu sayede gen eşlemesi yapılabilir. Devamında her transkriptteki okuma sayıları Subread 2.0.3 aracı kullanılarak yapılmış, her bir gen için okuma sayıları (count) belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra her bir okuma sayısının kalite kontrolü için normalizasyon yapılmış ve veri setinden çok düşük veya ifade etmeyen genler çıkartılmıştır. Bu amaçla R programında Bioconductor/edgeR paketi kullanılmıştır. EdgeR paketi ampirik Bayes tahmini ve negatif binom dağılımına dayalı istatistiksel testlere dayanan bir programdır. Analizin devamında limma paketi kullanılarak diferansiyel eksprese eden genler log2-fold değerlerine göre belirlenmiştir. Yine bu genler

log2-fold değerlerine göre sıralanmış, istatistiksel olarak p değeri 0.05'ten küçük olanlar anlamlı olarak kabul edilmişlerdir. Tüm bu analizlere göre 1555 genin ekspresyonunda azalma saptanırken 1382 genin ekspresyonunda artış saptanmıştır. Değişimler R programında ggplot paketleri kullanılarak Volkan grafiği ve ısı haritası grafiğinde gösterilmiştir. Devamında gen ekspresyonu en çok anlamlı değişkenlik gösteren proteinler arasındaki ilişki STRING veri tabanında incelenmiştir. Buna göre özellikle endoplazmik retikulum stres aracılıklı olarak içsel apoptoza yol açan TRIB3, PPP1R15A, ATF3, XBP1, JUND gibi gen ekspresyonlarında anlamlı derecede artış saptanmıştır ve bu genlerin proteinleri arasındaki bağlantı STRING veri tabanında gösterilmektedir (140). Gen ontoloji analizlerinde de ekspresyonu anlamlı değişkenlik gösteren genler ile ilişkili yollar incelendiğinde içsel apoptotik yolak ve ER-stres-aracılıklı içsel apoptotik yolak göze çarpmaktadır. Tüm bunlar ER-stres aracılıklı yolağın hücrede LCL-161 yanıtında yol oynayabileceğini göstermektedir. RNA sekanslama analizini konfirm etmek için bu analizde en çok diferansiyel eksprese olan genlerin ekspresyonları eş zamanlı PCR ile çalışılmıştır. Yine TRIB3, PPP1R15A gen ekspresyonunda anlamlı artış saptanırken, AMOT gen ekspresyonunda anlamlı azalış saptanmıştır. Apoptotik genlerden ise Kaspaz 8 ekspresyonunda anlamlı artış saptanmış, yine ER-aracılıklı apoptotik gen CHOP ekspresyonunda da anlamlı artış saptanmıştır. Buna karşın Kaspaz 3 gen ekspresyonlarında değişiklik saptanmamıştır. Anti-apoptotik gen ekspresyonları da eş-zamanlı PCR analizleri ile incelenmiştir. Sadece cIAP1 geninin ekspresyonunda anlamlı azalış saptanmıştır, diğer IAP (cIAP2 ve XIAP) genlerinin ekspresyon düzeylerinde herhangi bir değişim izlenmemiştir. Bu durum LCL-161'in etkinliğini daha çok cIAP1 üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektedir. Ancak IAP'lerin protein ekspresyonlarının da incelenmesine ihtiyaç vardır. Yine LCL-161 tek başına uygulamasına bağlı olarak nekroptotik RIPK1 ve RIPK3 genlerinin ekspresyonları da incelenmiş ve ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu durum LCL-161 etkinliğinin daha çok apoptotik mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

RNA sekanslama sonuçlarında LCL-161 uygulamasına bağlı olarak ekspresyonu artan ER-stresle ilişkili genler çalışmada özellikle dikkatimizi çekmiştir. *Corazzi ve ark.* Tarafından yazılan derleme makalede erken ER-stresi ile ilişkili genler E2F1, ATF4, ATF6, XBP1, E2F7, PUMA, NOXA, MCL-1, BCL-2, CHOP, TRIB3 olarak listelenmiştir (Şekil 31) (141). Yapılan çalışmamızda anlamlı değişkenlik gösteren gen listemizde NOXA1 haricinde tüm genlerde anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. Bu da ER-stres yollarının LCL-161 uygulamasına bağlı olarak gelişen apoptotik ölüm yanıtının regülasyonunda önemli bir rol üstlenebileceğini işaret

etmektedir. B konuda literatür taraması yapılarak SMAC mimetik ve ER-stres ilişkisini inceleyen sadece iki yayın bulunabilmiştir (142 ; 143) . Her iki yayında da SMAC mimetiğin uygulanan kemoterapi ilaçlarının yarattığı ER-stresi baskıladığından ve bu sayede apoptotik ölüme katkıda bulunduğundan bahsedilmiştir. Ancak bu çalışmalarda uygulanan SMAC mimetik dozlarının (birisinde 3 μ M, diğerinde ise 5 μ M) oldukça düşük olduğunu göz ardı edemeyiz. Çalışmamızda uygulanan SMAC mimetiğin dozu 50 μ M, yani çalışmalarda uygulanan dozun 10 katı kadardır. Düşük dozlarda SMAC mimetik uygulaması ER-stresi baskımlarken yüksek dozda ve uzun süre uygulanması ER-stres ve ER-stres aracılıklı apoptoza yol açıyor olabilir.



Şekil 31. ER-stres yanıtında rol oynayan genler (141)

LCL-161 uygulamasının hücrede başlattığı ölüm yanıtının, ölüm reseptörleri ile başlatılan ve bunların tetiklediği FADD, TRADD gibi adaptör proteinleri ile tetiklenen kaspazların aktivasyonu devam ettirilen dışsal apoptotik mekanizma veya sitokrom c ile indüklenen kaspazlarla devam eden içsel apoptotik mekanizma ve ya tamamen bunlardan ayrı olarak RIPK1, RIPK3 ve MLKL yani nekroptoz aracılıklı olarak gerçekleştiği bilinmekteydi. Biz bu çalışmamızda LCL-161 uygulamasının endoplazmik retikulum stresi arttırarak TRIB3, PPP1R15A, ATF3 gibi proteinlerin yer aldığı ER-stres aracılıklı olarak da içsel apoptozu düzenleyerek hücre ölümü yanıtını regüle edebileceğini gösterdik.

Çalışmamızda ayrıca kemoterapi ilaçlarıyla LCL-161'in kombine kullanımının gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelenmiştir. Tek başına Etoposid ve LCL-161- Etoposid kombine uygulamasının NB hücrelerinde özellikle nekroptotik genler RIPK1, RIPK3 ve MLKL ekspresyonlarını arttırdığı gözlenmiştir. İlginç bir şekilde tek başına Etoposid uygulaması TRIB3 ekspresyonunu arttırırken kombine uygulamada TRIB3 ekspresyonunun azaldığı gözlemledik. Yine Etoposid uygulamasının NB hücrelerinde anti-apoptotik IAP1, IAP2 ve XIAP gen ekspresyonlarını arttırdığını gözlemledik. Etoposid, hücrede Topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA'da çift zincir kırıkları oluşturarak etki eden bir ilaçtır (144). Anti-apoptotik gen ekspresyonundaki artış hücrede Etoposid etkinliğine bir direnç mekanizması olarak gerçekleşmiş olabilir. LCL-161 ve Etoposid uygulaması sonrasında IAP1 gen ekspresyonunda bir düşüş izlense de IAP2 ve XIAP gen ekspresyonlarında bir değişim izlenmemiştir hatta IAP2 gen ekspresyonu daha da artış göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmamızda SH-SY5Y ve KELLY hücrelerinde LCL-161 etkinliği tek başına ve Cisplatin ve Etoposid ilaçlarıyla kombine olan etkinliği incelenmiştir. N-MYC pozitif KELLY hücrelerinin Cisplatin, Etoposid ve LCL-161 ilaçlarına tek başına ve ya kombine kullanımda daha duyarlı oldukları yani daha fazla hücre ölümünün gerçekleştiği gözlenirken, N-MYC negatif SH-SY5Y hücrelerinin ise Cisplatin, Etoposid ve LCL-161 ilaçlarına tek başına ve ya kombine kullanımda daha az duyarlı olduğu ve daha az hücre ölümünün gerçekleştiği gözlenmiştir. LCL-161, KELLY hücrelerinde Cisplatin etkinliğini artırıcı yönde etki etmiş ancak Etoposid etkinliğine herhangi bir katkısı olmamıştır. Her iki ilacın etkinliğinin de yüksek oranda apoptotik ölüm üzerinden gerçekleştiği saptanmıştır. SH-SY5Y hücrelerinde ise hücreler Cisplatin uygulamasına ciddi direnç göstermişler ve Cisplatin çok az oranda bu hücrelerde ölümü tetikleyebilmiştir. Etoposid ise canlılık analizlerinde nispeten daha çok hücreleri ölüme götürmüştür. LCL-161 uygulamasının ise SH-SY5Y hücrelerinde Cisplatin ve Etoposid etkinliğine herhangi bir katkısı olmamıştır.

Yapılan bu deneylere ek olarak RNA sekanslama yöntemi kullanılarak LCL-161'in hücrede etkilediği yolların daha iyi araştırılması hedeflenmiştir. İlginç bir şekilde bilinen yolların dışında endoplazmik retikulum stres yolağı ile ilgili genlerin (TRIB3, ATF3, PPP1R15A, XBP1 vb.) aşırı derecede ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. Bu da LCL-161 uygulamasının ER-stres aracılıklı olarak da apoptozu regüle edebileceğini göstermektedir. ER-stres 'in ve burada yer alan genlerin fonksiyonunun daha iyi anlaşılabilmesi için ilerleyen süreçlerde protein düzeylerinin araştırılması, over-ekspresyon ve ya knock-out deneylerinin yapılması planlanabilir. Biz bu çalışma sürecinde kısıtlı bir bütçeyle çalışmayı gerçekleştirebildiğimiz için bu deneyleri de çalışmamıza ekleyemedik. Sonuç olarak çalışmamızda ilk defa ER-stres aracılıklı yolağın LCL-161 yanıtında rol oynadığını gösterdik. ER-stres yolağında yer alan genler ve bu genlerin hedeflenmesi, hücrede LCL-161'e bağlı olarak indüklenen apoptotik yanıtın arttırılabilmesi için iyi birer adaydır.

7. KAYNAKLAR

1. Çeçen RE, İnce D, Olgun N. Nöroblastoma. Cabı Ünal E, editör. Çocukluk Çağında Nadir Görülen Tümörler. 1.baskı. Ankara:Türkiye Klinikleri, 2021, 22-31
2. Zafar A, Wang W, Liu G, Wang X, Xian W, McKeon F ve ark. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Med Res Rev.* 2021;41(2):961-1021. doi: 10.1002/med.21750.
3. Nakagawara A, Li Y, Izumi H, Muramori K, Inada H, Nishi M. Neuroblastoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2018; 1;48(3):214-241. doi: 10.1093/jjco/hyx176.
4. Tolbert VP, Matthay KK. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res.* 2018;372(2):195-209. doi: 10.1007/s00441-018-2821-2
5. Aksoylar S, Varan A, Vergin C, Hazar V, Akici F, Dagdemir A ve ark. Treatment of high-risk neuroblastoma: National protocol results of the Turkish Pediatric Oncology Group. *J Cancer Res Ther.* 2017;13(2):284-290. doi: 10.4103/0973-1482.183205.
6. Newman EA, Abdessalam S, Aldrink JH, Austin M, Heaton TE, Bruny J ve ark. Update on neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 2019;54(3):383-389. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2018.09.004.
7. Smith V, Foster J. High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children (Basel).* 2018;28;5(9):114. doi: 10.3390/children5090114.
8. Cetraro P, Plaza-Diaz J, MacKenzie A, Abadía-Molina F. A Review of the Current Impact of Inhibitors of Apoptosis Proteins and Their Repression in Cancer. *Cancers (Basel).* 2022; 25,14(7):1671. doi: 10.3390/cancers14071671.
9. Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU ve ark. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell.* 2007; 16,131(4):682-93. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.037.
10. Chen DJ, Huerta S. Smac mimetics as new cancer therapeutics. *Anticancer Drugs.* 2009;20(8):646-58. doi: 10.1097/CAD.0b013e32832ced78.
11. Houghton PJ, Kang MH, Reynolds CP, Morton CL, Kolb EA, Gorlick R ve ark. Initial testing (stage 1) of LCL161, a SMAC mimetic, by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Apr;58(4):636-9. doi: 10.1002/pbc.23167.
12. Najem S, Langemann D, Appl B, Trochimiuk M, Hundsdoerfer P, Reinshagen K, Eschenburg G. Smac mimetic LCL161 supports neuroblastoma chemotherapy in a drug class-dependent manner and synergistically interacts with ALK inhibitor TAE684 in cells with ALK mutation F1174L. *Oncotarget.* 2016; 8,7(45):72634-72653. doi: 10.18632/oncotarget.12055.
13. Olgun N. Neuroblastoma. *Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci.* 2009;5(4):49-61
14. Qiu B, Matthay KK. Advancing therapy for neuroblastoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(8):515-533. doi: 10.1038/s41571-022-00643-z.
15. Johnsen JI, Dyberg C, Wickström M. Neuroblastoma-A Neural Crest Derived Embryonal Malignancy. *Front Mol Neurosci.* 2019; 29;12:9. doi: 10.3389/fnmol.2019.00009.
16. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010; 10;362(23):2202-11. doi: 10.1056/NEJMra0804577.
17. Van Arendonk KJ, Chung DH. Neuroblastoma: Tumor Biology and Its Implications for Staging and Treatment. *Children (Basel).* 2019;17;6(1):12. doi: 10.3390/children6010012.
18. Vo KT, Matthay KK, Neuhaus J, London WB, Hero B, Ambros PF ve ark. Clinical, biologic, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in

- neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project. *J Clin Oncol.* 2014; 1;32(28):3169-76. doi: 10.1200/JCO.2014.56.1621.
19. DuBois SG, Kalika Y, Lukens JN, Brodeur GM, Seeger RC, Atkinson JB ve ark. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1999;21(3):181-9. doi: 10.1097/00043426-199905000-00005.
 20. Brodeur GM. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell Tissue Res.* 2018;372(2):277-286. doi: 10.1007/s00441-017-2761-2.
 21. Irwin MS, Naranjo A, Zhang FF, Cohn SL, London WB, Gastier-Foster JM ve ark. Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2021;10;39(29):3229-3241. doi: 10.1200/JCO.21.00278.
 22. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, Cetingul N, Vergin C, Oniz H ve ark. Experience of the Izmir Pediatric Oncology Group on Neuroblastoma: IPOG-NBL-92 Protocol. *Pediatr Hematol Oncol.* 2003;20(3):211-8.
 23. Dalianis T, Lukoseviciute M, Holzhauser S, Kostopoulou ON. New Approaches Towards Targeted Therapy for Childhood Neuroblastoma. *Anticancer Res.* 2023;43(9):3829-3839. doi: 10.21873/anticancer.16570.
 24. Yalçın B, Kremer LC, Caron HN, van Dalen EC. High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 22;(8):CD006301. doi: 10.1002/14651858.CD006301.pub3.
 25. Furlan A, Dyachuk V, Kastri ME, Calvo-Enrique L, Abdo H, Hadjab S ve ark. Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. *Science.* 2017; 7;357(6346):eaal3753. doi: 10.1126/science.aal3753.
 26. Tsubota S, Kadomatsu K. Origin and mechanism of neuroblastoma. *Oncoscience.* 2017;21;4(7-8):70-72. doi: 10.18632/oncoscience.360.
 27. Rettig WJ, Spengler BA, Chesa PG, Old LJ, Biedler JL. Coordinate changes in neuronal phenotype and surface antigen expression in human neuroblastoma cell variants. *Cancer Res.* 1987;1;47(5):1383-9.
 28. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* 1989; 1;49(1):219-25.
 29. Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, Cheung NK, Ross RA. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia.* 2004;6(6):838-45. doi: 10.1593/neo.04310.
 30. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1983;71(4):741-7.
 31. van Groningen T, Koster J, Valentijn LJ, Zwijnenburg DA, Akogul N, Hasselt NE ve ark. Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states. *Nat Genet.* 2017;49(8):1261-1266. doi: 10.1038/ng.3899.
 32. Boeva V, Louis-Brennetot C, Peltier A, Durand S, Pierre-Eugène C, Raynal V ve ark. Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries. *Nat Genet.* 2017;49(9):1408-1413. doi: 10.1038/ng.3921.
 33. Altun Z, Yuan H, Baran B, Aktaş S, Sönmez EE, Küçük C, Olgun N. Whole-exome sequencing reveals genetic variants in low-risk and high-risk neuroblastoma. *Gene.* 2023;15;860:147233. doi: 10.1016/j.gene.2023.147233.
 34. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell.* 2012; 30;149(1):22-35. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.003.

35. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):976-90. doi: 10.1038/nrc2231.
36. Chen H, Liu H, Qing G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther*. 2018; 23;3:5. doi: 10.1038/s41392-018-0008-7.
37. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F ve ark. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*. 1983; 15-21;305(5931):245-8. doi: 10.1038/305245a0.
38. Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, Alt FW. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 1983; 35: 359–367
39. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984; 8;224(4653):1121-4. doi: 10.1126/science.6719137.
40. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM ve ark. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009; 10;27(2):289-97. doi: 10.1200/JCO.2008.16.6785.
41. Shapiro DN, Valentine MB, Rowe ST, Sinclair AE, Sublett JE, Roberts WM, ve ark. Detection of N-myc gene amplification by fluorescence in situ hybridization. Diagnostic utility for neuroblastoma. *Am J Pathol*. 1993;142(5):1339-46.
42. Oude Luttikhuis ME, Iyer VK, Dyer S, Ramani P, McConville CM. Detection of MYCN amplification in neuroblastoma using competitive PCR quantitation. *Lab Invest*. 2000;80:271-273. doi: 10.1038/labinvest.3780030.
43. Park JR, Bagatell R, London WB, Maris JM, Cohn SL, Mattay KK ve ark. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(6):985-93. doi: 10.1002/pbc.24433.
44. Rasmuson A, Segerström L, Nethander M, Finnman J, Elfman LH, Javanmardi N, ve ark. Tumor development, growth characteristics and spectrum of genetic aberrations in the TH-MYCN mouse model of neuroblastoma. *PLoS One*. 2012;7(12):e51297. doi: 10.1371/journal.pone.0051297.
45. Althoff K, Beckers A, Bell E, Nortmeyer M, Thor T, Sprüssel A ve ark. A Cre-conditional MYCN-driven neuroblastoma mouse model as an improved tool for preclinical studies. *Oncogene*. 2015 Jun;34(26):3357-68. doi: 10.1038/onc.2014.269.
46. Zhu Y, Paul P, Lee S, Craig BT, Rellinger EJ, Qiao J ve ark. Antioxidant inhibition of steady-state reactive oxygen species and cell growth in neuroblastoma. *Surgery*. 2015;158(3):827-36. doi: 10.1016/j.surg.2015.03.062.
47. Schulte JH, Horn S, Otto T, Samans B, Heukamp LC, Eilers UC ve ark. MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer*. 2008; 1,122(3):699-704. doi: 10.1002/ijc.23153.
48. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D ve ark. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2010 Mar;12(3):247-56. doi: 10.1038/ncb2024.
49. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;1;3(10):a014415. doi: 10.1101/cshperspect.a014415.
50. Powers JT, Tsanov KM, Pearson DS, Roels F, Spina CS, Ebright R ve ark. Multiple mechanisms disrupt the let-7 microRNA family in neuroblastoma. *Nature*. 2016; 14;535(7611):246-51. doi: 10.1038/nature18632.

51. Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, LaPierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP ve ark. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*. 2011; 23;147(5):1066-79. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.039.
52. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S ve ark. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet*. 2009;41(7):843-8. doi: 10.1038/ng.392.
53. Diskin SJ, Capasso M, Schnepf RW, Cole KA, Attiyeh EF, Hou C ve ark. Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nat Genet*. 2012;44(10):1126-30. doi: 10.1038/ng.2387.
54. Schnepf RW, Khurana P, Attiyeh EF, Raman P, Chodosh SE, Oldridge DA ve ark. A LIN28B-RAN-AURKA Signaling Network Promotes Neuroblastoma Tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2015; 9;28(5):599-609. doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.012.
55. Molenaar JJ, Domingo-Fernández R, Ebus ME, Lindner S, Koster J, Drabek K ve ark. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet*. 2012;44(11):1199-206. doi: 10.1038/ng.2436.
56. Mossé YP, Wood A, Maris JM. Inhibition of ALK signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2009;15,15(18):5609-14. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2762.
57. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF ve ark. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):930-5. doi: 10.1038/nature07261.
58. Azarova AM, Gautam G, George RE. Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(4):267-75. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.09.005.
59. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM ve ark. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res*. 2010; 1;16(17):4353-62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2660.
60. Hasan MK, Nafady A, Takatori A, Kishida S, Ohira M, Suenaga Y ve ark. ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci Rep*. 2013; 20;3:3450. doi: 10.1038/srep03450.
61. Bachetti T, Di Paolo D, Di Lascio S, Mirisola V, Brignole C, Bellotti M ve ark. PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: in vitro identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma. *PLoS One*. 2010;1;5(10):e13108. doi: 10.1371/journal.pone.0013108.
62. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bökkerink J, Egeler M, Laureys G, Slater R, Westerveld A, Voûte PA, Versteeg R. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996;25;334(4):225-30. doi: 10.1056/NEJM199601253340404.
63. Shi H, Tao T, Abraham BJ, Durbin AD, Zimmerman MW, Kadoch C ve ark. ARID1A loss in neuroblastoma promotes the adrenergic-to-mesenchymal transition by regulating enhancer-mediated gene expression. *Sci Adv*. 2020;15;6(29):eaaz3440. doi: 10.1126/sciadv.aaz3440.
64. García-López J, Wallace K, Otero JH, Olsen R, Wang YD, Finkelstein D ve ark. Large 1p36 Deletions Affecting Arid1a Locus Facilitate Mycn-Driven Oncogenesis in Neuroblastoma. *Cell Rep*. 2020;14;30(2):454-464.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.048.
65. Mullen J, Kato S, Sicklick JK, Kurzrock R. Targeting ARID1A mutations in cancer. *Cancer Treat Rev*. 2021;100:102287. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102287.
66. Sausen M, Leary RJ, Jones S, Wu J, Reynolds CP, Liu X, Blackford A, Parmigiani G, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Hogarty MD.

- Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat Genet.* 2013;45(1):12-7. doi: 10.1038/ng.2493.
67. Guan J, Hallberg B, Palmer RH. Chromosome Imbalances in Neuroblastoma-Recent Molecular Insight into Chromosome 1p-deletion, 2p-gain, and 11q-deletion Identifies New Friends and Foes for the Future. *Cancers (Basel).* 2021;24;13(23):5897. doi: 10.3390/cancers13235897.
 68. Caren H, Kryh H, Nethander M, Martinsson T. High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* .2010;107(9):4323-4328. doi: 10.1073/pnas.0910684107
 69. Schleiermacher G, Mosseri V, London WB, Maris JM, Brodeur GM, Attiyeh E ve ark. Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Br J Cancer.* 2012; 9;107(8):1418-22. doi: 10.1038/bjc.2012.375.
 70. Mlakar V, Jurkovic Mlakar S, Lopez G, Maris JM, Ansari M, Gumy-Pause F. 11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications. *Mol Cancer.* 2017 Jun 29;16(1):114. doi: 10.1186/s12943-017-0686-8.
 71. Keane S, Ameen S, Lindlöf A, Ejeskär K. Low DLG2 gene expression, a link between 11q-deleted and MYCN-amplified neuroblastoma, causes forced cell cycle progression, and predicts poor patient survival. *Cell Commun Signal.* 2020;18,65.doi: 10.1186/s12964-020-00553-6
 72. Siaw JT, Javanmardi N, Van den Eynden J, Lind DE, Fransson S, Martinez-Monleon A ve ark. 11q Deletion or ALK Activity Curbs DLG2 Expression to Maintain an Undifferentiated State in Neuroblastoma. *Cell Rep.* 2020; 22;32(12):108171. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108171.
 73. Theissen, J., Oberthuer, A., Hombach, A., Volland, R., Hertwig, F., Fischer, M., Spitz, R., Zapatka, M., Brors, B., Ortmann, M., Simon, T., Hero, B. and Berthold, F. (2014), Chromosome 17/17q gain and unaltered profiles in high resolution array-CGH are prognostically informative in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014;53: 639-649 doi:10.1002/gcc.22174
 74. Lastowska M, Cotterill S, Pearson AD, Roberts P, McGuckin A, Lewis I ve ark. Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group. *Eur J Cancer.* 1997;33(10):1627-33. doi: 10.1016/s0959-8049(97)00282-7.
 75. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D ve ark. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1999;24;340(25):1954-61. doi: 10.1056/NEJM199906243402504.
 76. Brady SW, Liu Y, Ma X, Gout AM, Hagiwara K, Zhou X ve ark. Pan-neuroblastoma analysis reveals age- and signature-associated driver alterations. *Nat Commun.* 2020; 14;11(1):5183. doi: 10.1038/s41467-020-18987-4.
 77. Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1984; 26;311(4):231-5. doi: 10.1056/NEJM198407263110405.
 78. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC ve ark. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1991;9(4):581-91. doi: 10.1200/JCO.1991.9.4.581.
 79. Schneiderman J, London WB, Brodeur GM, Castleberry RP, Look AT, Cohn SL. Clinical significance of MYCN amplification and ploidy in favorable-stage

- neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008;20;26(6):913-8. doi: 10.1200/JCO.2007.13.9493.
80. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 ;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
 81. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
 82. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
 83. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*. 2019;29(5):347-364. doi: 10.1038/s41422-019-0164-5.
 84. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57. doi: 10.1038/bjc.1972.33.
 85. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*. 1999;1;59(7 Suppl):1701s-1706s.
 86. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
 87. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137.
 88. Tsujimoto Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep*. 2002;22,47-58. doi:10.1023/A:1016061006256
 89. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2011;351(1-2):41-58. doi: 10.1007/s11010-010-0709-x.
 90. Roberts AW. Therapeutic development and current uses of BCL-2 inhibition. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2020;4;2020(1):1-9. doi: 10.1182/hematology.2020000154.
 91. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF ve ark. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 24;20(17):4133. doi: 10.3390/ijms20174133.
 92. Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res*. 2007;17(9):759-71. doi: 10.1038/cr.2007.52.
 93. Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ*. 2011;18(9):1441-9. doi: 10.1038/cdd.2011.30.
 94. Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J Cell Physiol*. 2017;232(11):2977-2984. doi: 10.1002/jcp.25785.
 95. Hetz C, Saxena S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol*. 2017 Aug;13(8):477-491. doi: 10.1038/nrneurol.2017.99.
 96. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):3460-3470. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.028.
 97. Mao J, Hu Y, Ruan L, Ji Y and Lou Z: Role of endoplasmic reticulum stress in depression. *Mol Med Rep*. 2019; 20: 4774-4780
 98. B'chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y ve ark. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(16):7683-99. doi: 10.1093/nar/gkt563.
 99. Yi S, Chen K, Zhang L, Shi W, Zhang Y, Niu S ve ark. Endoplasmic Reticulum Stress Is Involved in Stress-Induced Hypothalamic Neuronal Injury in Rats via the PERK-

- ATF4-CHOP and IRE1-ASK1-JNK Pathways. *Front Cell Neurosci.* 2019;3;13:190. doi: 10.3389/fncel.2019.00190.
100. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol.* 2019 Jan 4;9:3083. doi: 10.3389/fimmu.2018.03083.
 101. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* 2016;283(14):2640-52. doi: 10.1111/febs.13598.
 102. Abdullah A, Ravanian P. The unknown face of IRE1 α - Beyond ER stress. *Eur J Cell Biol.* 2018;97(5):359-368. doi: 10.1016/j.ejcb.2018.05.002.
 103. Ron D, Hubbard SR. How IRE1 reacts to ER stress. *Cell.* 2008;11;132(1):24-6. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.017.
 104. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med.* 2014;30;370(5):455-65. doi: 10.1056/NEJMr1310050.
 105. Vanden Berghe T, Hassannia B, Vandenabeele P. An outline of necrosome triggers. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11-12):2137-52. doi: 10.1007/s00018-016-2189-y.
 106. Laukens B, Jennewein C, Schenk B, Vanlangenakker N, Schier A, Cristofanon S ve ark. Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in FADD- or caspase-8-deficient cells by priming for tumor necrosis factor α -induced necroptosis. *Neoplasia.* 2011;13(10):971-9. doi: 10.1593/neo.11610.
 107. He GW, Günther C, Thonn V, Yu YQ, Martini E, Buchen B ve ark. Regression of apoptosis-resistant colorectal tumors by induction of necroptosis in mice. *J Exp Med.* 2017;5;214(6):1655-1662. doi: 10.1084/jem.20160442.
 108. Salvesen GS, Walsh CM. Functions of caspase 8: the identified and the mysterious. *Semin Immunol.* 2014;26(3):246-52. doi: 10.1016/j.smim.2014.03.005.
 109. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene.* 2008; 20;27(48):6252-75. doi: 10.1038/onc.2008.302.
 110. Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;1;11(2):109-24. doi: 10.1038/nrd3627.
 111. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res.* 2015 Apr;141(4):389-97. doi: 10.4103/0971-5916.159250.
 112. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 1997;17;388(6639):300-4. doi: 10.1038/40901.
 113. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula S ve ark. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998;15;17(8):2215-23. doi: 10.1093/emboj/17.8.2215.
 114. Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(7):550-6. doi: 10.1038/35080103.
 115. Chen C, Liu TS, Zhao SC, Yang WZ, Chen ZP, Yan Y. XIAP impairs mitochondrial function during apoptosis by regulating the Bcl-2 family in renal cell carcinoma. *Exp Ther Med.* 2018;15(5):4587-4593. doi: 10.3892/etm.2018.5974.
 116. Huang H, Joazeiro CAP, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD, Hunter T. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspase 3 and 7. *J Biol Chem.* 2000;275,35:26661-26664.
 117. Silke J, Kratina T, Chu D, Ekert PG, Day CL, Pakusch M ve ark. Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein

- abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 8;102(45):16182-7. doi: 10.1073/pnas.0502828102.
118. Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J ve ark. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell*. 2008; 20;30(6):689-700. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.014.
 119. Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshayes K ve ark. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 2008;5;283(36):24295-9. doi: 10.1074/jbc.C800128200.
 120. Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H ve ark. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1364-70. doi: 10.1038/ni.1678.
 121. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J et al. Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1371-8. doi: 10.1038/ni.1676.
 122. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):561-74. doi: 10.1038/nrc2889.
 123. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther*. 2013;16;9:1285-304. doi: 10.2147/OTT.S33375.
 124. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X ve ark. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*. 2000; 21-28;408(6815):1008-12. doi: 10.1038/35050012.
 125. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T ve ark. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*. 2000; 21-28;408(6815):1004-8. doi: 10.1038/35050006.
 126. Silke J, Verhagen AM, Ekert PG, Vaux DL. Sequence as well as functional similarity for DIABLO/Smac and Grim, Reaper and Hid? *Cell Death Differ*. 2000 ;7(12):1275. doi: 10.1038/sj.cdd.4400790.
 127. Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci*. 2004;29(9):486-94. doi: 10.1016/j.tibs.2004.07.003.
 128. Bai L, Smith DC, Wang S. Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacol Ther*. 2014;144(1):82-95. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.05.007.
 129. Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F ve ark. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell*. 2011;5;43(3):432-48. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.006.
 130. Fulda S. Smac Mimetics to Therapeutically Target IAP Proteins in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2017;330:157-169. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.004.
 131. Morrish E, Brumatti G, Silke J. Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells*. 2020;11;9(2):406. doi: 10.3390/cells9020406.
 132. Chang YC, Cheung CHA. An Updated Review of Smac Mimetics, LCL161, Birinapant, and GDC-0152 in Cancer Treatment. *Appl Sci*. 2021;11, 335. doi:10.3390/app11010335.

133. Wagner L, Marschall V, Karl S, Cristofanon S, Zobel K, Deshayes K ve ark. Smac mimetic sensitizes glioblastoma cells to Temozolomide-induced apoptosis in a RIP1- and NF- κ B-dependent manner. *Oncogene*. 2013;21;32(8):988-97. doi: 10.1038/onc.2012.108.
134. Eschenburg G, Eggert A, Schramm A, Lode HN, Hundsdoerfer P. Smac mimetic LBW242 sensitizes XIAP-overexpressing neuroblastoma cells for TNF- α -independent apoptosis. *Cancer Res*. 2012;15;72(10):2645-56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4072.
135. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
136. Wan Y, Liu T, Hou X, Dun Y, Guan P, Fang H. Antagonists of IAP proteins: novel anti-tumor agents. *Curr Med Chem*. 2014;21(34):3877-92. doi: 10.2174/0929867321666140826115258.
137. Pluta P, Jesionek-Kupnicka D, Kubicka-Wołkowska J, Pluta A, Brzozowski K, Potemski P ve ark. SMAC protein expression as a potent favorable prognostic factor in locally advanced breast cancer. *Pol J Pathol*. 2018;69(1):33-41. doi: 10.5114/pjp.2018.75334.
138. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 2004; 64:7138-7190
139. Fulda S. Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2015;15;21(22):5030-6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0365.
140. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R ve ark. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res*. 2023; 6;51(D1):D638-D646. doi: 10.1093/nar/gkac1000.
141. Corazzari M, Gagliardi M, Fimia GM, Piacentini M. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front Oncol*. 2017; 26;7:78. doi: 10.3389/fonc.2017.00078.
142. Ramakrishnan V, Gomez M, Prasad V, Kimlinger T, Painuly U, Mukhopadhyay B ve ark. Smac mimetic LCL161 overcomes protective ER stress induced by obatoclax, synergistically causing cell death in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2016; 30;7(35):56253-56265. doi: 10.18632/oncotarget.11028.
143. Abhari BA, McCarthy N, Le Berre M, Kilcoyne M, Joshi L, Agostinis P, Fulda S. Smac mimetic suppresses tunicamycin-induced apoptosis via resolution of ER stress. *Cell Death Dis*. 2019; 15;10(3):155. doi: 10.1038/s41419-019-1381-z.
144. Fırat O, Yıldız Y. Topoizomeraz II enzim inhibitörleri. *Ankara Ecz Fak Derg*. 2020;44(2):356-372. doi:10.33483/jfpau.696349
145. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016; 1;2016(4):pdb.prot087379. doi: 10.1101/pdb.prot087379.

8. EKLER

Ek 1. Tez önerisi Kabulü

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI : 01

TOPLANTI GÜNÜ : Perşembe

TOPLANTI TARİHİ : 03.01.2019

TOPLANTI SAATİ: 11.00

KARAR 04 / Enstitümüz Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji doktora programı öğrencisi **Burçin BARAN**'ın 20.12.2018 tarih ve 388 sayılı Doktora Tez Önerisi Formu okundu. Tez danışmanı Prof. Dr. Nur OLGUN tarafından önerilen ve ve Etik Kurul onayı alınan (Etik Kurul Onay Tarihi: 18.10.2018, Karar No: 2018/26-07) tez konusunun aşağıdaki şekilde kabulüne oybirliği ile karar verildi.

Tez Konusu: "SMAC mimetiklerinin Nöroblastom Hücreleri Üzerinde Apoptotik ve Nekropolitik Ölüm Mekanizmalarına Etkisi"

Not 1 : Teze DEU.HSI.PHD -2016970160 kodu verilmiştir. Tezin iç ve dış kapaklarında yer alması gereklidir.

Not 2 : Tez konusu önerisi Enstitü Yönetim Kurulu tarafından onaylanan öğrencilerin Enstitümüz Web sayfasında yer alan Tez Veri Giriş Formunu doldurarak Enstitümüze teslim etmesi gerekmektedir.



EK.2 Etik kurul raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr.Nur Olgun

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4313-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☒ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	SMAC Mimetiklerinin Nöroblastom Hücreleri Üzerinde Apoptotik ve Nekrotik Ölüm Mekanizmalarına Etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Nur Olgun Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

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

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/26-07	Tarih:18.10.2018
	Prof.Dr.Nur Olgun'un sorumlusu olduğu "SMAC Mimetiklerinin Nöroblastom Hücreleri Üzerinde Apoptotik ve Nekrotik Ölüm Mekanizmalarına Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi	
	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Ali Rıza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

EK.3 Tezle ilişkili araştırma makaleleri

- 1) İlk isim yayın (SCI-expanded): Baran B, Sanlav G, Kızmaoğlu D, Kum Özşengezer S, Aktaş S, Altun Z, Olgun N. Comparing Tribbles Homolog 3 (TRIB3) Protein Expression Levels with Clinicopathological Characteristics and Survival Among Neuroblastoma Patients. Clinical Medicine Insights: Oncology. 2023;17:1-8



Comparing Tribbles Homolog 3 (TRIB3) Protein Expression Levels with Clinicopathological Characteristics and Survival Among Neuroblastoma Patients

Clinical Medicine Insights: Oncology
Volume 17: 1-8
© The Author(s) 2023
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/11795549231199926



Burçin Baran¹ , Gamze Sanlav¹, Deniz Kızmaoğlu²,
Selen Kum Özşengezer¹, Safiye Aktaş¹, Zekiye Altun¹ and Nur Olgun²

ABSTRACT

BACKGROUND: Tribbles Homolog 3 (TRIB3) is a member of the pseudokinase family of tribbles and acts as an adaptor protein to regulate different cellular processes. Upregulation of TRIB3 expression was shown either as a favorable or an adverse prognostic factor in various adult malignancies. However, TRIB3 expression has not been examined in pediatric cancers. Neuroblastoma is the most common malignant solid tumor of childhood, which affects mostly children under 5 years old. Risk stratification of patients defined by International Neuroblastoma Risk Group was used to determine prognosis and treatment of the disease. This study aimed to examine the relationship between TRIB3 protein expression levels and clinicopathological features and survival of patients.

METHODS: TRIB3 protein expression was analyzed using immunohistochemical staining on formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of neuroblastoma patients (n = 56). Survival analyses were performed with Kaplan-Meier method and log-rank tests. Association between TRIB3 expression and clinicopathological characteristics were analyzed with Spearman's correlation.

RESULTS: Of the patients, 32.1% were in the low-risk group, 21.4% in the medium-risk group, and 46.4% in the high-risk group. Survival analysis was performed in the entire neuroblastoma patient group and sub-risk groups of neuroblastoma patients. In the entire patient group, there was no significant difference in overall survival ($P = .202$) and event-free survival ($P = .172$) between TRIB3-positive and -negative patients. However, when survival analyses were performed in each risk group, TRIB3 expression was significantly associated with higher overall survival ($P = .034$) and event-free survival ($P = .032$) in low-risk group neuroblastoma patients. Nevertheless, no association was found between TRIB3 expression and overall survival ($P = .799$) and event-free survival ($P = .448$) in high-risk neuroblastoma patients. Furthermore, a significant correlation was identified between 1p36 loss-of-heterozygosity and TRIB3 expression ($P = .030$). However, TRIB3 expression did not correlate with other clinicopathological features.

CONCLUSION: TRIB3 expression is a potential predictive biomarker for low-risk neuroblastoma patients.

KEYWORDS: Neuroblastoma, TRIB3, prognosis, biomarker, survival

Journal indexing and metrics

Impact metrics

The following citation metrics are produced by abstracting and indexing databases using their respective datasets. These metrics represent a variety of methods for measuring the citation impact of published research on a journal level.

Journal Citation Reports

Scopus

Google Scholar

Sources: Journal Citation Reports from Clarivate, 2023, Scopus®, 2022 release and Google Scholar.

Readership

Full Text Usage

97,923

Full text usage is the sum of PDF and HTML downloads from the journal platform during the prior calendar year.

Abstracting and indexing

This journal is included in the following abstracting and indexing databases.

- Clarivate Analytics: Current Contents - Life Sciences
- Clarivate Analytics: Science Citation Index Expanded (SCIE)
- Directory of Open Access Journals (DOAJ)
- EBSCO
- PubMed Central (PMC)
- Scopus

- 2) Altun Z, Yuan H, Baran B, Aktaş S, Sönmez EE, Küçük C, Olgun N. Whole-exome sequencing reveals genetic variants in low-risk and high-risk neuroblastoma. *Gene*. 2023.15;860:147233

Whole-exome sequencing reveals genetic variants in low-risk and high-risk neuroblastoma	
By	Altun, Z (Altun, Zekiye) ^[1] ; Yuan, HL (Yuan, Hongling) ^[1] ; Baran, B (Baran, Burcin) ^[1] ; Aktas, S (Aktas, Safiye) ^[1] ; Sonmez, EE (Sonmez, Esra Esmeray) ^[2] , ^[3] ; Kucuk, C (Kucuk, Can) ^[2] , ^[3] , ^[4] ; Olgun, N (Olgun, Nur) ^[5] View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)
Source	GENE Volume: 860 DOI: 10.1016/j.gene.2023.147233
Article Number	147233
Published	APR 15 2023
Early Access	FEB 2023
Indexed	2023-03-11
Document Type	Article
Abstract	This study aimed to investigate the genetic aberrations in neuroblastoma (NB) by comparing high and low-risk NB patients by whole-exome sequencing (WES) and to reveal the heterogeneity and association between somatic variants and clinical features. Seven NB patients with available clinical data were included in the study (4 in the low-risk group and 3 in the high-risk group). WES was performed and somatic variants associated with NB genes in the COSMIC database were selected through bioinformatics pipeline analysis. Variants were determined using the Integrative Genomics Viewer (IGV). Some gene variations were found in both groups, including variations in oncogene and tumor suppressor genes. In general, candidate gene variations were associated with chromatin remodeling complexes, the RAS pathway, cell proliferation, and DNA repair mechanism. Some variations in CSF1R, MSH6, PTPN11, SOX9, RET, TSC1, and DNMT1 genes were detected only in high-risk patients, while EP300, TET2, MYCN, PRDM1, and ARID2 gene variations were detected only in low-risk patients. When high-risk gene variants were compared with the cBioportal cancer genomic database, two common gene variants (ARID1A and NCOR2) were identified. However, when low-risk gene variants were compared with the cBioportal cancer genomic database, no common genes were found. GO/KEGG enrichment analysis was performed to find relevant biological processes and molecular pathways related to gene variants, which will help to decipher the molecular mechanisms of NB tumorigenesis and the phenotypic differences between high-risk and low-risk patients.
Keywords	Author Keywords: Neuroblastoma; Whole-exome sequencing; Gene variations; COSMIC; cBioportal Keywords Plus: CANCER; MUTATIONS; DNA
Author Information	

- 3) Yıldırım HT, Aktaş S, Diniz G, Aktaş TC, Baran B, Bayrak S, Altun Z, Çakır Y, Olgun N. Scanning all chromosomal abnormalities with microarray-based comparative genomic hybridization in differential diagnosis of pediatric cancers. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2019. 12,8:3140-3148

Scanning all chromosomal abnormalities with microarray-based comparative genomic hybridization in differential diagnosis of pediatric cancers

By Yıldırım, HT (Yıldırım, Hulya Tosun) [1] ; Aktaş, S (Aktaş, Safiye) [2] ; Diniz, G (Diniz, Gulden) [3] ; Aktaş, TC (Aktaş, Tekincan Cagri) [2] ; Baran, B (Baran, Burcin) [2] ; Bayrak, S (Bayrak, Serdar) [2] ; Altun, Z (Altun, Zekiye) [2] ; Çakır, Y (Çakır, Yasemin) [2] ; Olgun, N (Olgun, Nur) [2]

[View Web of Science ResearcherID and ORCID](#) (provided by Clarivate)

Source INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY

Volume: 12 Issue: 8 Page: 3140-3148

Published 2019

Indexed 2019-09-17

Document Type Article

Abstract Objective: Despite conventional histopathological and immunohistochemical methods, difficulties may be experienced in the differential diagnosis of pediatric cancers, especially in small round-cell undifferentiated tumors. In these cases, the determination of chromosomal abnormalities may be helpful. The aim of this study was to evaluate the place of the whole genome array comparative genomic hybridization method in pediatric cancers where difficulty is experienced in differential diagnosis. Method: In Comparative Genomic Hybridization (CGH), 135,000 probes were scanned as 3 probes per gene in all genomes. It was possible to analyze paraffin block tissues obtained from the archive of the Pathology Laboratory of Dr. Behcet Uz Children's Hospital. DNA extraction was made from the paraffin blocks of 24 cases where difficulty had been experienced in making the differential diagnosis and in each case, comparisons with the control samples were made for all anomalies in all chromosomes using microarray technology. Results: Together with the typically observed chromosomal anomalies, additional derangements with debatable importance were determined. Conclusion: The whole genome CGH method may be useful in pediatric cancers where difficulties are experienced in making differential diagnoses. Since technical difficulties are experienced in the examination of paraffin-embedded tissue samples, storing fresh tissue samples from each tumor will be helpful for genetic and molecular examinations.

Keywords **Author Keywords:** Comparative genomic hybridization (CGH); pediatric cancers; small round cell malignant tumors; differential diagnosis

Keywords Plus: CYCLOPHILIN-B; GENE; EXPRESSION; FAMILY; IDENTIFICATION; TUMORS

Author Information Corresponding Address: Diniz, Gulden (corresponding author)

NÖROBLASTOMDA ANTI-TÜMÖR AJANI OLARAK SMAC MİMETİKLERİN KULLANIMI

Burçin Baran¹, Zekiye Altun², Safiye Aktaş³, Nur Olgun²

Özet:

Smac mimetikleri, hücredeki sekonder mitokondriyel bağımlı kaspaz aktivatörü (SMAC) proteinlerini taklit eden kimyasal ajanlardır. SMAC proteinleri hücre içerisinde bulunan inhibitör apoptoz proteinlerine (IAP) bağlanarak, onların ubiquitinlenip parçalanmasını sağlar ve ya onları inhibe eder. Bu sayede hücre ölüm yollarının (apoptoz ve nekroptoz gibi) aktifleşmesine katkıda bulunurlar. SMAC mimetiklerinin tek başına veya kemoterapilerle birlikte etkinlikleri *in-vitro* ve *in-vivo* fare modellerinde farklı çalışmalarda incelenmiştir. SMAC mimetiklerin tek başına veya kemoterapilerle kombine kullanıldığı faz 3 çalışmaları da mevcuttur.

SMAC mimetiklerinin etkinliği pediatrik tümörlerde de denenmektedir. Pediatrik Preklinik Test Programı (Pediatric Preclinical Testing Program) kapsamında farklı pediatrik hücre hatlarında tek başına SMAC mimetiklerin etkinliği test edilmiştir. Ancak çalışmada kapsamında SMAC mimetiklerin kemoterapilerle kombine etkinliği bugüne dek incelenmemiştir.

Bu çalışmada insan Nöroblastom (NB) hücreleri üzerinde SMAC mimetigi olan LCL-161 ve kemoterapi ajanları Sisplatin ve Etoposid tek başlarına ve SMAC mimetigi ile birlikte kombine etkinliği hücre canlılığı ve apoptoz üzerinden değerlendirilmiştir.

Giriş ve Amaç:

Nöroblastom (NB) çocukluk çağıının en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür. (Pizzo PA, 2016; Aksoylar S, 2017; Olgun N, 2009). *Inhibitör apoptoz proteinleri (IAP)*, hücre ölüm yollarını inhibe eden ve hücre sağ kalımını arttıran proteinlerdir. Kaspaz aktivitesini bloklayarak veya çeşitli proteinleri ubiquitinleyerek anti-apoptotik yanıtı sebep olurlar. Yine hücre sağ kalımıyla ilişkili NF-kB yolağının aktivitesini düzenlerler (Fulda S, 2012). IAP'lerin birçok kanser türünde aşırı eksprese oldukları gösterilmiştir (LaCasse EC, 2008).

SMAC proteinleri mitokondriyel membran içerisinde bulunan proteinlerdir. İntrensek apoptotik yolağın başlaması sonrasında sitoplazmaya salınarak apoptoz sürecine katkıda bulunurlar. SMAC proteinleri direkt olarak IAP'leri inhibe ederler veya onları ubiquitinleyerek parçalanmaya gönderirler (Vince JE, 2007 ; Chen DJ, 2009). LCL-161, oral yolla alınan monovalent tipte bir SMAC mimetiktir, IAP türlerinden cIAP1, cIAP2 ve XIAP'yi inhibe etmektedir (Weisberg E, 2010). SMAC mimetiklerin etkinliği pediatrik tümörlerde de denenmiştir. Pediatrik Preklinik Test Programı kapsamında tek başına LCL-161'in etkinliği NB-1643, NB-EBc1, CHLA-90 ve CHLA-136 hücreleri üzerinde çalışılmıştır (Houghton PJ, 2012). Yine bir başka çalışmada ise NB hücre hatları KELLY, SK-N-AS, HGW üzerinde LCL-161 ve vinka alkaloid grubu (Vinkristin, Vinblastin ve ya Vindesin) uygulamasının bu hücrelerde apoptozu arttırdığı görülmüştür (Najem S, 2016).

Bizim de merkezimizde Prof.Dr.Nur Olgun Hocamızın yürütücülüğünde 2000li yılların başından beri Türk Pediatrik Onkoloji grubunun NB tedavi protokolü yürütülmektedir (Aksoylar S, 2017). SMAC mimetiklerin pre-klinik modellerde başarılı etkinliğinden yola

P24

THE EFFECT OF SMAC MIMETIC ON APOPTOTIC GENE EXPRESSIONS

Burçin Baran¹, Zekiye Altun¹, Hongling Yuan¹, Safiye Aktaş¹, Nur Olgun²

Introduction: Inhibitory Apoptosis Proteins (IAP) are a group of functionally and structurally related proteins that inhibit the execution of cell death pathways. Overexpression of IAP has been demonstrated in many cancer types and has been associated with poor prognosis or resistance to treatment. Secondary Mitochondrial Caspase Activator (SMAC/DIABLO) proteins are located in the mitochondrial membrane of the cell and are released into the cytosol during apoptosis and bind to IAPs. Hence, they inhibit IAPs. SMAC mimetics are agents, which developed on the chemical structure of SMAC proteins. In many pre-clinical studies using cancer cell lines and xenograft mouse models, it has been observed that both SMAC mimetics trigger cell death in some cells and increase the efficacy of chemotherapy and radiotherapy.

In this study, it was aimed to examine how the SMAC mimetic LCL-161 affects cell death-related gene expression levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells.

Material - Methods: LCL-161 was used as a monovalent type SMAC mimetic. SH-SY5Y human neuroblastoma cells were incubated with 50µM LCL-161 for 48 hours. RNA isolation was performed using the kit. The concentration of RNAs was measured with Nanodrop and then translated into cDNA. Expressions of apoptotic and necroptotic genes were studied in Nano Real-time PCR device with relevant primers using SYBR green master mix. The results were analyzed statistically.

Results: Caspase-8, Caspase-3, RIP1, RIP3, TRIB3, ATF4, ATF6, PERK, XBP1, IRE1, IAP1, IAP2, XIAP, CHOP gene associated with apoptotic and necroptotic pathways in SH-SY5Y cells after incubation with LCL-161. The changes in their expression were examined. While a statistically significant change was observed in the expression of TRIB3 and CHOP, XBP1 and IRE1 ($p < 0.05$), no significant change was observed in the expression of RIP1, RIP3, Caspase-8, Caspase-3, XIAP, GADD34. A statistically significant decrease was found in IAP1 and IAP2 genes ($p < 0.05$).

Discussion: It has been shown that ER-stress mediated death pathway plays a more important role in LCL-161-induced neuroblastoma cells instead of the extrinsic apoptotic and necroptotic pathway involving Caspase-8.

Conclusion: The effect of SMAC mimetic LCL-161 on apoptotic and necroptotic gene expressions in SH-SY5Y neuroblastoma cells was studied.

Keywords: SMAC mimetic, Neuroblastoma, Apoptosis



PP8 - ANALYSIS OF TRIBBLES HOMOLOG 3 (TRIB3) EXPRESSION LEVELS IN NEUROBLASTOMA: PRELIMINARY STUDY

BARAN Burcin¹, SANLAV Gamze¹, KIZMAZOGU Deniz², OZSENGEZER KUM Selen¹, AKTAS Safiye¹, ALTUN Zekiye¹, OLGUN Nur²

¹Dokuz Eylul University, Institute of Oncology, Basic Oncology; ²Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Pediatric Oncology, Izmir, Turkey

Objective: Tribbles protein (TRIB) family was first identified in *Drosophila*, plays role in coordinating cell division and morphogenesis. TRIB3 is one of the members of this family, its protein expression levels and patient prognosis has been examined in various studies. While TRIB3 expression was correlated with poor prognosis in hepatocellular cancer patients, its expression levels were associated with increased disease-free survival and a better response to therapy in luminal breast cancer patients.

Neuroblastoma (NB) is the most common solid tumor in children and accounts for ~15% of childhood cancer-related mortality. In the present study, we aimed to investigate the TRIB3 expression levels among NB patients and to determine if TRIB3 expression levels could be prognostic biomarker for NB.

Material-Methods: 40 children with different stages of NB were studied. The patients were staged according to criteria defined by Turkish Pediatric Oncology Group and International Neuroblastoma Staging System. Protein expression levels of TRIB3 was determined with immunohistochemical staining on paraffin sections of NB patient tissue samples. All sections were independently and blindly studied for protein expression under microscopic examination. P values <0.05 was accepted statistically significant.

Results: TRIB3 expression was found to be upregulated in low grade samples and ganglioneuroblastoma samples and downregulated in neuroblastoma cells in the tissue sections of high-grade NB samples.

Conclusion: While study is still ongoing, preliminary results showed that TRIB3 could be a candidate prognostic marker for NB patients.

Keywords: Neuroblastoma, Cell signaling, Biomarker, Prognostic marker



Whole Exome Sequencing Analysis of Good and Bad Prognostic Neuroblastoma Patients (on the Behalf of Turkish Pediatric Oncology Group) [†]

Zekiye Altun ^{1,*}, Burçin Baran ¹, Safiye Aktaş ¹, HongLing Yuan ¹ and Nur Olgun ²

Published: 6 December 2018

Abstract: Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in children with incidence rate 10.2 *per* 1 million children under 15 years old. NB has great diversity in clinical behavior while some tumors are easily curable and spontaneously regressed, the others are resistant to chemotherapies and exhibiting high relapse rates. Despite intensive usage of chemotherapies, still 5-year survival rate is about 40% for advanced stage bad prognostic patient group. Hence, there is need for more effective therapeutics and novel biomarkers for early detection of high-risk patients. In the present study we aimed to study molecular mutation profile of both good and bad prognostic NB patients with whole exome sequencing (WES). The NB patients whose risk group previously was confirmed according to TPOG-2009 protocol. 5 patients with good prognosis (low risk & intermediate with good histology) and 5 patients with bad prognosis (intermediate poor histology & high risk) were chosen. As a result, 23 common mutations were found in both prognostic group. While 7 mutations were found to be specific to bad prognostic group, 2 mutations were only observed in good prognostic group patients. The commonly mutated genes were located commonly in cell membrane and extracellular space and mostly interfering with cell signaling and cell communication pathways.

Keywords: neuroblastoma; childhood cancers; whole exome sequencing; mutation profile



PP7 - S-100 PROTEIN EXPRESSION LEVELS AS A POTENTIAL PROGNOSTIC MARKER IN NEUROBLASTOMA

SANLAV Gamze¹, BARAN Burcin¹, KIZMAZOGLU Deniz², OZSENGEZER KUM Selen¹, AKTAS Safiye¹, ALTUN Zekiye¹, OLGUN Nur²

¹Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Basic Oncology; ²Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Pediatric Oncology, Izmir, Turkey

Objective: S-100 is an acidic-calcium-binding protein and was first described in cells of neuroendocrine origin. It plays an important role in various cellular processes such as cell differentiation and proliferation. S-100 is described to be a negative prognostic marker for the advanced stages of melanoma and was evaluated to be prognostic biomarker for different cancers. Neuroblastoma(NB) is remarkable for its broad spectrum of clinical behavior, varying from spontaneous regression to progressive disease and accounts for ~15% of childhood cancer-related mortality. This diversity in behavior correlates closely with defined clinical and biologic features and combinations of prognostic variables are used for risk-group assignment. The aim of this study is to investigate the S-100 expression levels among neuroblastoma patients and to determine if S-100 expression levels could be prognostic biomarker for neuroblastoma.

Material-Methods: Histological tumor sections of 40 cases of varying stages and risk groups of neuroblastoma were studied. The patients were staged according to criteria defined by Turkish Pediatric Oncology Group and International Neuroblastoma Staging System(INSS). Risk groups were determined according to the International Neuroblastoma Risk Group(INRG) classification system. S-100 protein expression levels were evaluated by immunohistochemical staining on paraffin sections of neuroblastoma patient tissue samples. All sections were independently and blindly studied for protein expression under microscopic examination. P values<0.05 was accepted statistically significant.

Results: Schwann cells in the ganglioneuromas and ganglioneuroblastomas always strongly stained. Neuroblastoma cases with early stage and low-to-intermediate risk showed upregulated expression.

Conclusion: While study is still ongoing, preliminary results showed that S-100 could be a candidate prognostic marker for neuroblastoma patients.

Keywords: neuroblastoma, prognosis, s-100, biomarker

EK.5 Katkı

“Yapılan tez çalışması Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından **2021.KB.SAG.044** no’lu projeyle ve TUBİTAK 2214/A programı kapsamında (**Dönem 2018/2, No: 1059B141801571**) no’lu proje ile desteklenmiştir. Her iki kuruma da destekleri için teşekkür ederiz.”



EK.6 Özgeçmiş

BURÇİN BARAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Şubat 2017 - Şu Anda (6 yıl 8 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (DR)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 4.0 / 4.0

01 Eylül 2010 - 01 Ağustos 2013 (3 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (DR)
Tez Başlığı: Hepatokarsinogenez Sürecinde Cullin2 Gen Ekspresyonu Ve
Aktivasyonunun Rolünün Hepatoselüler Karsinom Hücre Dizilerinde İncelenmesi
Tez Konusu: Hepatoselüler Karsinoma, Kanser Biyolojisi, Sinyal Yolakları
Tarih: 2012
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.96 / 4.0

01 Eylül 2005 - 01 Temmuz 2010 (4 yıl 11 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
MÜHENDİSLİK-MİMARLIK FAKÜLTESİ, GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Mayıs 2019 - Şu Anda (4 yıl 5 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ

01 Haziran 2015 - 01 Eylül 2016 (1 yıl 4 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, RWTH AACHEN UNIVERSITY

01 Ekim 2013 - 01 Mayıs 2015 (1 yıl 8 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, YALE UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE

Yabancı Dil Bilgileri

İNGLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

ALMANCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Temel Bilimler → Yaşam Bilimleri → Moleküler Biyoloji ve Genetik → Kanser
Moleküler Biyolojisi

Anahtar Kelimeler

Nöroblastoma
Kanser Biyolojisi
Gen Düzenlemesi
Genom Bilimi
Gen Ekspresyon Analizi
Kanser Genetiği
Kanser Sinyal Yolakları
Antikanser İlaç

Ar-Ge Yetkinlik

Kitaplar

B. BARAN & Z. S. ALTUN, Kanser Araştırmalarında Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürü Modelleri ve Kullanımları, Hastalıkta ve Sağlıkta Hücre Ölümü- Mekanizmaları ve Deneysel araştırma Modelleri(356 - 367), ISBN: 978-605-73554-1-6: <https://basimevilmcbu.edu.tr/>, Kitapta Bölüm.

B. BARAN, N. O. MERT, G. C. KOCAL & Y. BASKIN, MicroRNAs (miRNAs) in Colorectal Cancer, Oncogenes and Carcinogenesis, ISBN: 978-953-51-3892-1: InTech Open, Kitapta Bölüm.

Makaleler

K. MISHRA-GORUR, T. BARAK, L. D. KAULEN, O. HENEGARIU, S. C. JIN, S. M. AGUILERA, E. YALBIR, G. GOLES, S. NISHIMURA, D. MIYAGISHIMA, L. DJENOUE, S. ALTINOK, D. K. RAJ, S. VIVIANO, A. PRENDERGAST, C. ZERILLO, K. OZCAN, B. BARAN, L. SENCAR, N. GOC, Y. YARMAN, A. G. ERCAN-SENCICEK, K. BILGUVAR, R. P. LIFTON, J. MOLITERNO, A. LOUVI, S. YUAN, E. DENİZ, M. BRUECKNER & M. GUNEL, Pleiotropic role of TRAF7 in skull-base meningiomas and congenital heart disease, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 2023, 0027-8424, 120, 16.

Z. ALTUN, H. YUAN, B. BARAN, S. AKTAS, E. E. SONMEZ, C. KUCUK & N. OLGUN, Whole-exome sequencing reveals genetic variants in low-risk and high-risk neuroblastoma, GENE, 2023, 0378-1119, 860.

B. BARAN, G. SANLAV, D. KIZMAZDOĞLU, S. KUM ÖZŞENGEZER, S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN & H. N. OLGUN, omparing Tribbles Homolog 3 (TRIB3) Protein Expression Levels with Clinicopathological Characteristics and Survival Among Neuroblastoma Patients, Clinical Medicine Insights: Oncology, 2023, 1179-5549, 17, 17, 1-8.

H. TOSUN YILDIRIM, S. AKTAŞ, A. G. DİNİZ ÜNLÜ, T. Ç. AKTAŞ, B. BARAN, S. BAYRAK, Z. S. ALTUN, Y. ÇAKIR & H. N. OLGUN, Scanning all chromosomal abnormalities with microarray-based comparative genomic hybridization in differential diagnosis of pediatric cancers, INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY, 2019, 1936-2625, 12, 8, 3140-3148.

B. BARAN, N. MERT ÖZÜPEK, N. Y. TETİK, E. ACAR AKKAYA, Ö. BEKİCİOĞLU & Y. BASKIN, Difference Between Left-sided And Right-sided Colorectal Cancer: A Focused Review Of Literature, GASTROENTEROLOGY RESEARCH, 2018, 1918-2831, 11, 4, 264-273.

M. W. YOUNGBLOOD, A. S. HARMANCI, A. O. VORTMEYER, B. J. ABRAHAM, J. SCHRAMM, B. KRISCHEK, V. E. CLARK, S. COSKUN, H. BAİ, M. GUENEL, O. HENEGARIU, S. B. OMAI, D. DURAN, M. SIMON, K. MISHRA-GORUR, M. TIMMER, E. Z. ERSON-OMAI, L. D. KAULEN, K. BILGUEVAR, R. A. YOUNG, J. BARANOSKI, G. CARRION-GRANT, R. GOLDBRUNNER, T. I. LEE, K. YASUNO, B. BARAN & J. MOLITERNO, Integrated genomic analyses of de novo pathways underlying atypical meningiomas, NATURE COMMUNICATIONS, 2017, 2041-1723, 8.

A. O. CAGLAYAN, B. TÜYSÜZ, S. COSKUN, J. QUON, A. SERİN HARMANCI, J. BARANOSKI, B. BARAN, Z. E. OMA, O. HENEGARU, S. MANE, K. BILGUVAR, K. YASUNO & M. GUNEL, A Patient With A Novel Homozygous Missense Mutation In Pto And Concomitant Nonsense Mutation In Cctp, JOURNAL OF HUMAN GENETICS, 2016, 1434-5161, 61, 5, 395-403.

H. PER, M. CANPOLAT, A. K. BAYRAM, E. ÜLGEN, B. BARAN, F. KARDAS, H. GÜMÜŞ, S. KUMANDAS, K. BILGUVAR & A. O. CAGLAYAN, Clinical, Electrodiagnostic, And Genetic Features Of Tangier Disease In An Adolescent Girl With Presentation Of Peripheral Neuropathy, Neuropediatrics, 2015, 0174-304X, 46, 6, 420-3.

J. LI, A. O. CAGLAYAN, E. Z. ERSON-OMAY, M. N. PAMIR, J. M. GUNEL, N. SCHULTZ, N. WEINHOLD, K. MISHRA-GORUR, K. BILGUVAR, K. YASUNO, A. J. HUTTNER, S. B. OMA, G. CARRION-GRANT, J. BARANOSKI, B. BARAN, C. SANDER, K. OZDUMAN, Y. KOKSAL, A. VORTMEYER, A. S. HARMANCI, C. CAGLAR, T. BARAK, D. KOSE, J. SUN, S. COSKUN, V. CLARK, M. GUNEL & M. BAKIRCIÖGLU, Somatic POLE mutations cause an ultramutated giant cell high-grade glioma subtype with better prognosis, NEURO-ONCOLOGY, 2015, 1522-8517, 17, 10, 1356-1364.

A. O. CAGLAYAN, K. MISHRA-GORUR, A. E. SCHAFER, C. CHABU, M. GUENEL, S. KUMANDAS, E. Z. ERSON-OMAY, T. XU, J. RIVIERE, J. F. BARANOSKI, M. S. ZAKI, F. J. MINJA, W. B. DOBYNS, C. CAGLAR, H. A. A. HOSSNI, O. HENEGARU, C. DILBER, H. KESHISHIAN, H. KAYSERILI, E. G. SPENCER, H. GUMUS, D. DOELN, F. VONHOFF, H. PER, N. C. CHL, G. T. AKGUEMUES, S. NISHIMURA, R. O. ROSTI, S. M. MANE, C. CAGLAR, N. SESTAN, A. LOUVI, K. YASUNO, R. P. LIFTON, K. BILGUEVAR, J. G. GLEESON, S. TU, W. HAN, B. BARAN & J. SCHROTH, Mutations in KATNB1 Cause Complex Cerebral Malformations by Disrupting Asymmetrically Dividing Neural Progenitors, NEURON, 2014, 0896-6273, 84, 6, 1226-1239.

Bildiriler

B. BARAN, G. SANLAV, D. KIZMAZOĞLU, S. KUM ÖZŞENGİZER, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, ANALYSIS OF TRIBBLER HOMOLOG 3 (TRIB3) EXPRESSION LEVELS IN NEUROBLASTOMA: PRELIMINARY STUDY, Özet Bildiri, 1st International Basic Oncology Congress, 02 Haziran 2022, 04 Haziran 2022.

S. KUM ÖZŞENGİZER, B. BARAN, D. KIZMAZOĞLU, G. SANLAV, S. AKTAŞ, T. Ç. AKTAŞ, Z. S. ALTUN & H. N. OLGUN, INVESTIGATION OF THE POTENTIAL EFFECTS OF YAP-1 AND NESTIN ON RISK CLASSES AND PROGNOSIS IN NEUROBLASTOMA, Poster Sunumu, 1st International Basic Oncology Congress, 02 Haziran 2022, 04 Haziran 2022.

G. SANLAV, B. BARAN, D. KIZMAZOĞLU, S. KUM ÖZŞENGİZER, S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN & H. N. OLGUN, S-100 PROTEIN EXPRESSION LEVELS AS A POTENTIAL PROGNOSTIC MARKER IN NEUROBLASTOMA, Poster Sunumu, 1st International Basic Oncology Congress, 02 Haziran 2022, 04 Haziran 2022.

B. BARAN, Z. S. ALTUN, H. YUAN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, SMAC MİMETİĞİN APOPTOTİK GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ, Poster Sunumu, 4. Uluslararası Kabımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi, 17 Mart 2022, 19 Mart 2022.

B. BARAN, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, NÖROBLASTOMDA ANTİ-TÜMÖR AJANI OLARAK SMAC MİMETİKLERİN KULLANIMI, Özet Bildiri, 9. ONKOLOJİDE ARAYIŞLAR SEMPOZYUMU, 12 Kasım 2021, 13 Kasım 2021.

Z. S. ALTUN, B. BARAN, S. AKTAŞ, H. LING & H. N. OLGUN, Whole Exome Sequencing Analysis Of Good And Bad Prognostic Neuroblastoma Patients (on The Behalf Of Turkish Pediatric Oncology Group), Sözlü Sunum, 2nd International Cell Death Research Congress, 01 Kasım 2018, 04 Kasım 2018, 2504-3900.

B. BARAN, S. AKTAŞ, H. TOSUN YILDIRIM, A. G. DİNİZ ÜNLÜ, Y. ÇAKIR, T. Ç. AKTAŞ, Z. S. ALTUN & H. N. OLGUN, Whole Genome Comparative Genomic Hybridization Of Ewing Sarcoma Indicates Cytoskeleton, Migration And Protein Trafficking, Sözlü

Sunum, 2nd International Cell Death Research Congress, 01 Kasım 2018, 04 Kasım 2018, 2504-3900.

T. Ç. AKTAŞ, S. AKTAŞ, B. BARAN, H. TOSUN, A. G. DİNİZ ÜNLÜ, Y. ÇAKIR, Z. S. ALTUN & H. N. OLGUN, Comparative Genomic Hybridisation In Neuroblastoma: A Molecular Approach For Tumor Heterogeneity, Sözlü Sunum, 7. multi?dizi?pli?ner Kanser Araştırma & 1.temel Onkoloji? Kongresi?, 11 Ekim 2018, 14 Ekim 2018.

B. BARAN, G. C. KOÇAL, E. ELLİDOKUZ, Y. BASKIN & H. ELLİDOKUZ, Bireyselleştirilmiş Tıp Araştırmalarında In Vitro Model Olarak Organoidler, Sözlü Sunum, 1.temel Onkoloji Sempozyumu, 09 Mayıs 2018, 11 Mayıs 2018.

B. BARAN, E. OZEN, A. GOZUKİZİL & N. ATABEY, Regulation Of Cullin2 Ubiquitin Ligase Expression By Hgf/c-met Signaling Pathway, Poster Sunumu, Febs Protein Quality Control And Ubiquitin Systems In Health And Disease, 14 Kasım 2012, 16 Kasım 2012.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

BURÇİN BARAN, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Türkiye'ye Döndü, 2018 - 2, 01.06.2019 - 01.06.2020.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

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