

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEMOZOLOMİD VE VİSMODEGİB KOMBİNASYONUNUN BEYİN
TÜMÖRÜ PATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER BOYUTTA
İNCELENMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Özgün ÖZALP

DANIŞMAN
Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

İZMİR
2015

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEMOZOLOMİD VE VİSMODEGİB KOMBİNASYONUNUN BEYİN
TÜMÖRÜ PATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER BOYUTTA
İNCELENMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Özgün ÖZALP

DANIŞMAN
Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

İZMİR
2015

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.Cumhur GÜNDÜZ

Üye : Yard. Doç. Gülçin ITIRLI ASLAN

.....
.....
.....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

02.12.15.....

Önsöz

Yüksek lisans eğitimim süresinde bana her konuda özveri ile destek olan, bilimsel fikirleri ve deneyimleri ile yol gösteren, değerli hocam ve tez danışmanım

Sayın Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya,

Tez çalışmalarımda sabırla yardımcı olan, değerli görüşlerini paylaşan değerli hocam ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Sayın Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e,

Bilgi ve deneyimleriyle yardımcı olan, anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri; **Sayın Doç. Dr. Zuhale EROĞLU**'na, **Sayın Doç. Dr. Buket KOSOVA**'ya ve **Sayın Yard. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL**'e,

Deneyimleri ile fikir veren; **Araş. Gör. Sn. Burçin TEZCANLI KAYMAZ**'a, **Araş. Gör. Sn. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ**'a, **Araş. Gör. Sn. Aslı TETİK VARDARLI**'ya, **Araş. Gör. Sn. Sunde YILMAZ SÜSLÜER**'e ve **Araş. Gör. Sn. Duygu AYGÜNEŞ**'e,

Deneysel çalışmalarım ve tezimin yazımında bana büyük yardımları olan ekip arkadaşlarım; tezimin her aşamasında yanımda olan ve değerli zamanını düşünmeden harcayan **Araş. Gör. Bakiye GÖKER**'e, esprileri ve taklitleriyle çalışma ortamımızı şenlendiren **Doktora Öğrencisi Cansu CALIŞKAN**'a, yüksek lisansım boyunca yardımlarını ve önerilerini esirgemeyen **Doktora Öğrencisi Zeynep MUTLU**'ya,

Yüksek lisans sürecinde fikirleriyle bana yol gösteren sevgili arkadaşlarım; deneylerimde bana yol gösteren **Doktora Öğrencisi Tuğçe BALCI**'ya, yüksek lisansa başlamam için beni teşvik eden **Doktora Öğrencisi Çağla KAYABAŞI**'na, her türlü akademik önerilerini benimle paylaşan **Doktora Öğrencisi Besra ÖZMEN YELKEN**'e, gerek akademik gerekse hayata dair önerilerini dikkate aldığım **Doktora Öğrencisi Sezgi KIPÇAK**'a, yüksek lisansa beraber başladığım yol arkadaşım **Yüksek Lisans Öğrencisi Buket ÖZEL**'e, her türlü teknik desteğini aldığım **Araş. Gör. Zekeriya DÜZGÜN**'e, eğitim sürecine birlikte adım attığım **Doktora Öğrencisi Metin ÇALIŞKAN**'a, akademik olarak önerilerini esirgemeyen **Doktora Öğrencisi Hasan Onur ÇAĞLAR**'a ve **Yüksek Lisans Öğrencisi Ceren ERDEM**'e teşekkür ederim.

Onlar olmadan hayatımda her şeyin eksik kalacağını bildiğim, biyolojik olmasa da sonsuza dek kardeşlerim olarak kalacak olan; **Ceren SARIZEYBEK'e, Mustafa CAN YENİGÜN'e ve Duygu ÖZTÜRK'e** benimle her anı paylaştıkları için sonsuz teşekkürler.

Hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen ve beni akademik yolda cesaretlendiren; annem **Necmiye ÖZALP'e**, babam **Ahmet ÖZALP'e** ve sevgili kardeşim **Özhan ÖZALP'e** sonsuz teşekkür ederim.

Özgün ÖZALP

İzmir, 06.11.2015

ÖZET

TEMOZOLOMİD VE VİSMODEGİB KOMBİNASYONUNUN BEYİN TÜMÖRÜ PATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN MOLEKÜLER BOYUTTA İNCELENMESİ

Beyin tümörleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen histopatolojik sınıflandırmaya göre I-IV arası değişen derecelerde isimlendirilir. Malign gliomlar en yaygın primer beyin tümörleridir. Glioblastom (GBM) en agresif formudur ve derece IV olarak sınıflandırılır.

Kendilerini sürekli yenileme özelliğindeki olan ve etkili tümörijenik potansiyel sergileyen gliom kök hücrelerinin keşfi, GBM tedavisinin geliştirilmesinde kazanımlar sağlamıştır. Gliomların heterojen yapısı bu tip tümörlerin tedavisini zorlaştırmaktadır.

Güncel tedavi stratejisi cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapiyi içermekle birlikte, hastaların ortalama sağkalım süresi 15 aydır. Temozolomid (TMZ), DNA alkilleyici kemoterapötik bir ajandır. İntrinsik ya da kazanılmış direnç, başarılı TMZ tedavisinin önünde ilaç etkinliğini sınırlayan bir engeldir.

Embriyonik dönemde, hücrel büyüme ve farklılaşmada önemli rol oynayan Hedgehog (Hh) sinyal yolağı, GBM de dahil olmak üzere birçok kanser tipi ile ilişkilidir. Metastatik ya da bölgesel olarak ileri bazal hücreli karsinom tedavisi için FDA tarafından onaylanan ve bir Hh yolağı inhibitörü olan Vismodegib (VIS), normal hücrelerin proliferasyonunu engellemeden tümör hücrelerinin proliferasyonunu durdurur.

Anahtar kelimeler: Beyin Kanseri Kök Hücresi, Hedgehog, Nekroptozis, Temozolomid, Vismodegib

ABSTRACT

**INVESTIGATING THE ROLE OF TEMOZOLOMIDE AND VISMODEGIB
COMBINATION ON BRAIN TUMOR PATHOGENESIS IN MOLECULAR
DIMENSION**

Brain tumors are classified into four degrees (I-IV) according to their histopathological features. Malign gliomas are most common primary brain tumors. Glioblastoma (GBM) is the most aggressive form of gliomas and classified as degree IV.

The discovery of the glioma stem cells which have self-renewal ability and show efficient potential tumorigenic activity had provided benefits for the treatment of GBM. Treatment of gliomas are limited because of their heterogeneity.

Although the current treatment strategy consists of radiotherapy and chemotherapy, the average survival of patients remain 15 months. Temozolomide (TMZ) is a DNA alkylating chemotherapeutic agent. Intrinsic or acquired resistance is an obstacle for efficiency of drug in successful TMZ treatment.

Hedgehog signaling pathway plays crucial roles in cellular growth and differentiation during embryonic period and is also associated with several cancer types, including GBM. Vismodegib (VIS) is a FDA approved Hh inhibitor that was designed for metastatic and basal cell carcinoma treatment. VIS inhibits the proliferation of tumor cells without inhibiting normal cells proliferation.

Currently, it is considered that necrosis is a controlled and programmed cell death mechanism as apoptosis, for that reason it is named as programmed necrosis or necroptosis.

The aim of this study is to detect the cytotoxic and apoptotic effects of combination of TMZ and VIS on human brain cancer stem cell and human neuronal stem cell lines and also to determine the changes in gene expressions levels related to necroptosis and Hh pathway.

As a result, the combination of TMZ and VIS induced apoptosis on human brain cancer stem cell line. Significant changes on gene expressions which are related to necroptosis and Hh pathway were obtained. In this regard, we suggest that this approach may provide a novel strategy for brain cancer therapy.

Keywords: Brain Cancer Stem Cell, Hedgehog, Necroptosis, Temozolomide, Vismodegib

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beyin Tümörleri	3
2.2. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması	3
2.3. Gliomlar	3
2.3.1. Glioblastom multiforme	4
2.4. Kök Hücre	4
2.4.1. Nöronal Kök Hücre	4
2.4.2. Kanser Kök Hücresi	5
2.5. Kanser Heterojenitesi	6
2.5.1. Glioblastom Kök Hücresi	7
2.6. Kullanılan İlaçlar	8
2.6.1. Temozolomid ve Etki Mekanizması	8
2.6.2. Vismodegib ve Etki Mekanizması	10
2.7. DNA Tamiri	11
2.8. Hedgehog Sinyal Yolağı	12
2.9. Hücre Ölüm Mekanizmaları	13
2.9.1. Apoptoz	14
2.9.2. Nekroz	16
2.9.3. Otofaji	17
2.9.4. Nekroptoz	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Hücre Kültürü	18
3.2. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	18
3.3. Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi	20
3.4. Hücre Hatlarının Pasaj İşlemleri	21
3.5. Hücre Hatlarının Dondurularak Saklanması	22
3.6. Dondurulan Hücre Hatlarının Çözdürülmesi	22
3.7. Sitotoksikite Testi	23
3.8. İzobologram Analizi	23
3.9. Apoptoz Analizleri	24
3.9.1. Anneksin V Yöntemi	24

3.9.2. Mitoprobe JC-1 Analizi	26
3.10. Gen Ekspresyonu Seviyesi Değişimlerinin Belirlenmesi	27
4. BULGULAR	42
4.1. Etken Maddelerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	42
4.2. Etken Maddelerin Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkileri	46
4.3. Etken Maddelerin Kombinasyonunun Hücre Hatları Üzerinde Oluşturduğu Gen Ekspresyon Değişimleri	50
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
7. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	69



Kısaltmalar Listesi

WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü
GBM	:	Glioblastom Multiforme
TMZ	:	Temozolomid
Hh	:	Hedgehog Sinyal Yolağı
Shh	:	Sonic Hedgehog Sinyal Yolağı
VIS	:	Vismodegib
FDA	:	Amerikan Gıda Ve İlaç Dairesi
SMO	:	Smoothened Proteini
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
RNA	:	Ribonükleik Asit
cDNA	:	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
MGMT	:	O6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz
PTCH1	:	Patched-1 Proteini
TNF	:	Tümör Nekrozis Faktör
MPT	:	Mitokondriyal Permeabilite Transisyon
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
cm	:	Santimetre
°C	:	Santigrat
µl	:	Mikrolitre
ml	:	Mililitre
µM	:	Mikromolar
mM	:	Milimolar
rpm	:	Revolutions Per Minute
dk	:	Dakika
IC₅₀	:	İnhibitör Konsantrasyon Oranı
WST-1	:	Water Soluble Tetrazolium
nm	:	Nanometre
PS	:	Fosfotidilserin
kD	:	Kilodalton
g (rcf)	:	Relative Centrifugal Force
Δψ	:	Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Tablo Dizini

Tablo 1	: Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
Tablo 2	: Kullanılan Cihazlar Ve Sarf Malzemeler	19
Tablo 3	: Genomik DNA Eliminasyon Karışımı	30
Tablo 4	: Ters Transkripsiyon Karışımı	30
Tablo 5	: Nekroptoz Profili Tasarımı	32
Tablo 6	: Nekroptoz Profili Genleri	32
Tablo 7	: Hedgehog Sinyal Yolağı Profili Tasarımı	36
Tablo 8	: Hedgehog Sinyal Yolağı Profili Genleri	36
Tablo 9	: PCR Karışımı	40
Tablo 10	: PCR Programı Çalıştırma Protokolü	41
Tablo 11	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücrelerinin Hedgehog Gen Ekspresyonlarına Etkisi	53
Tablo 12	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Nekroptoz Gen Ekspresyonlarına Etkisi	55
Tablo 13	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Hedgehog Gen Ekspresyonlarına Etkisi	56

Şekil Dizini

Şekil 1	:	Kanser heterojenitesi modeli	7
Şekil 2	:	Temozolomid'in Kimyasal Yapısı	9
Şekil 3	:	Temozolomid'in Etki Mekanizması	10
Şekil 4	:	Vismodegib'in Kimyasal Yapısı	11
Şekil 5	:	Vismodegib'in Etki Mekanizması	11
Şekil 6	:	Hedgehog Sinyal Yolağı	13
Şekil 7	:	Apoptotik Yolaklar	15
Şekil 8	:	Neubauer Lamı	21



Grafik Dizini

Grafik 1	: İnsan Nöronal Kök Hücrelerinde Temozolomidin IC ₅₀ dozu	42
Grafik 2	: İnsan Nöronal Kök Hücrelerinde Vismodegibin IC ₅₀ dozu	43
Grafik 3	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücrelerin Canlılığı Üzerine Etkisi	44
Grafik 4	: Beyin Kanseri Kök Hücrelerinde Temozolomidin IC ₅₀ dozu	44
Grafik 5	: Beyin Kanseri Kök Hücrelerinde Vismodegibin IC ₅₀ dozu	45
Grafik 6	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	46
Grafik 7	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Anneksin V Yöntemi İle Değerlendirilmesi	47
Grafik 8	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin JC-1 Yöntemi İle Değerlendirilmesi	48
Grafik 9	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun Beyin Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Anneksin V Yöntemi İle Değerlendirilmesi	49
Grafik 10	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun Beyin Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin JC-1 Yöntemi İle Değerlendirilmesi	50
Grafik 11	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücrelerinin Nekroptoz İle İlişkili Genleri Üzerindeki Etkisini Gösteren Isı Haritası	51
Grafik 12	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücrelerinin Hedgehog Yolağı İle İlişkili Genleri Üzerindeki Etkisini Gösteren Isı Haritası	52
Grafik 13	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Nekroptoz İle İlişkili Genleri Üzerindeki Etkisini Gösteren Isı Haritası	54
Grafik 14	: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Hedgehog Yolağı İle İlişkili Genleri Üzerindeki Etkisini Gösteren Isı Haritası	55

1. GİRİŞ

Kanser, çok hücreli gelişmiş organizmalarda görülen, normal hücresel programda bulunan hücre bölünmesini ve farklılaşmasını kontrol eden çok sayıdaki genin ekspresyonundaki değişiklikler ile karakterize bir grup hastalığa verilen isimdir. Kanser, heterojenik yapısı gereği evrensel bir tedavi stratejisini imkansız kılan ve dolayısıyla farklı tipte araştırma alanları sunan bir hastalıktır.

Beyin tümörlerinin oluşumuna sinyal yollarının düzenlenmesindeki işlevsel bozukluklar ya da nöronal kök hücrelerden türevlenebilme potansiyeli katkı sağlamaktadır. Beyin tümörleri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen sınıflandırmaya göre I-IV arası değişen derecelerde isimlendirilir. Malign gliomlar en yaygın primer beyin tümörleridir. Glioblastom multiforme (GBM) en agresif formudur ve derece IV olarak sınıflandırılır. Gliomların heterojen yapısı bu tip tümörlerin tedavisini zorlaştırmaktadır.

Güncel tedavi stratejisi cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapiden oluşmakla birlikte, hastaların ortalama sağkalım süresi 15 aydır. GBM tedavisinde kullanılan temozolomid (TMZ), kan-beyin bariyerini aşabilen ve DNA alkilleyici kemoterapötik bir ajandır.

Kanser kök hücreleri, proliferasyona neden olabilen ve yeni tümörler oluşturabilen kanser fenotipi ile ilişkili hücrelerdir. Gliom kök hücrelerinin de tedavi sonrasında bu tümörlerin oluşumundan sorumlu oldukları düşünülmektedir.

Hedgehog sinyal yolağı (Hh), embriyonik gelişimde kritik role sahiptir ve anormal düzenlenmesi halinde kanser kök hücresi fenotipinin devam ettirilmesini destekler. Sonic hedgehog sinyal yolağı (Shh) gliom kök hücrelerinin kendini yenilemesinden ve tümör gelişiminden sorumludur.

Vismodegib (VIS), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış Hh yolağı inhibitörüdür. Bazal hücreli karsinom tedavisi için kullanılmakta olan ilaç, Hh sinyalini pozitif yönde düzenleyen “*Smoothened*” (SMO) molekülünü inaktif hale getirir.

GBM tedavisinde apoptoz mekanizmasının yetersiz kalarak tümör hücrelerinin direnç kazanması hastalığın tedavisini zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda, nekroptozun

GBM proliferasyonu, anjiyogenezi ve invazyonu ile ilişkili olması, tümör hücresi nekroptozunun potansiyel terapötik değer taşımasına dikkat çekmektedir. Güncel olarak, nekroptotik hücre ölümünün apoptoz gibi düzenlenebilir ve kontrol edilebilir bir proses olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, gliom hücrelerinde nekroptoz modüle edilerek daha iyi terapötik yanıt sağlanabilir.

Bu çalışmada; insan beyin kanseri kök hücre hattı ve insan nöronal kök hücre hattı kullanılarak, TMZ ve VIS için IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, TMZ ile VIS kombinasyonu belirtilen hücre hatlarına uygulanarak doz ve zaman bağımlı sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bu iki etken maddenin ve kombinasyonlarının IC_{50} dozlarının insan beyin kanseri kök hücrelerinde apoptozu indüklediği, nekroptoz ve Hh sinyal yolağı ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinde anlamlı değişiklikler oluşturduğu saptanmıştır.

Bu bağlamda, TMZ ve VIS kombinasyonu ile Hh sinyal yolağının hedeflenmesi ve kanser kök hücrelerinin programlı şekilde nekroptoza yönlendirilmesi glioblastomda proliferasyonu önlemede terapötik bir strateji olarak değerlendirilebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Beyin Tümörleri

Beyin gelişimi süresince normal işlevini gerçekleştiren sinyal yollarının düzenlenmesindeki hatalar ya da nöronal kök hücrelerin mutasyonları beyin tümörü oluşumuna katkı sağlamaktadır (1). Beyin hücrelerinden türevlenen beyin tümörleri vücudun diğer bölümlerinden gelen hücrelerin aksine, nadiren merkezi sinir sistemi dışına metastaz yaparlar (2). Beyin tümörleri geniş bir araştırma alanı sunmaktadır. Gliom, alışılagelmiş radyasyon ve kemoterapi tedavi yöntemlerini etkisiz kılarak hastaların çoğunun ölümüne neden olan tümör tipidir. Kapsamlı araştırmalara rağmen, bu hastalık için etkili bir tedavi yöntemi güncel olarak mevcut değildir. Daha başarılı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, ilaç direnci, tümör oluşumu ve metastaz mekanizmalarının detaylı olarak anlaşılmasına dayanmaktadır. Buna ek olarak, tümör hedeflenirken özellikle kan-beyin bariyerinin de üstesinden gelebilen stratejiler geliştirilmelidir (3).

2.2. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması

Primer beyin tümörleri hangi hücre tipinin tümörü başlattığına dayanarak sınıflandırılabilir. Gliomlar en yaygın primer beyin tümörü formudur. Astrositomalar, yıldız şekilli astrosit benzeri hücrelerden türevlenmektedir (WHO derece I ve IV). Yüksek derece astrositomalar anaplastik astrositomalar (WHO derece III) ve glioblastom multiforme (GBM – WHO derece IV) olarak adlandırılır (4).

WHO tarafından oluşturulan sınıflandırmaya göre, gliomlar astrositomlar, oligodendrogliomlar, ependimomlar ve oligo-astrositomlar (karışık gliomlar) olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (5).

2.3. Gliomlar

Malign gliomlar en yaygın tipteki primer beyin tümörleridir (3). Malign gliomlar yüksek oranda infiltratif primer beyin tümörlerinin belirgin histopatolojik ve moleküler özellikteki heterojen bir grubunu oluşturmaktadır (6).

Gliom hücrelerinin orijini ve hücresel çoğalmanın altında yatan mekanizmaları anlayarak daha etkili tedaviler sağlamak için çalışmalar devam etmektedir. Her

tipteki gliom morfolojik, fenotipik ve genetik olarak heterojen hücrelerden oluşmakla beraber, gliomlardaki hücreSEL heterojeniteyi anlamaya yönelik çaba sarf edilmektedir (6).

2.3.1 Glioblastom multiforme

WHO tarafından astrositomlar, oligodendrogliomlar, ependimomlar ve oligo-astrositomlar (karışık gliomlar) olmak üzere dört gruba ayrılan malign gliomlar en yaygın tipteki primer beyin tümörleridir.

Malignite derecesine göre, oligodendrogliomlar ve oligoastrositomlar derece II ve derece III olarak sınıflandırılırken, astrositomlar pilositik (derece I), diffüz (derece II) anaplastik (derece III) ve glioblastom multiforme (GBM) (derece IV) olmak üzere dört alt sınıfta ayrılmaktadır (3).

GBM farklı astrositik farklılaşma dereceleri gösteren beyin kanseri tipidir. Güncel olarak GBM'in nöronal kök hücrelerden ya da öncül hücrelerden kaynaklandığı ve bu öncül hücrelerde çeşitli sinyal yollarının glial tümörler için gerekli olan anahtar rolü oynadıkları ileri sürülmüştür (1).

2.4. Kök Hücre

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran özellikler; kendi kendilerini yenileyebilme, farklılaşabilme ve klonal olma özelliklerinin hepsine birden sahip olmalarıdır. Bu özellikleri sayesinde kök hücreler hem sayılarını sabit tutmakta hem de gerektiğinde farklılaşarak, farklılaşmış hücrelerin çoğalmasını sağlayabilmektedirler. Özel bir işlev görmek için farklılaşmış pek çok vücut hücresinin aksine, kök hücreler uygun uyarı alana kadar farklılaşmadan kalabilmektedir (7).

2.4.1. Nöronal Kök Hücre

Kök hücreler, beyin hücreleri de dahil olmak üzere, vücudun özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilme ve kendilerini dikkate değer ölçüde yenileyebilme kapasitelerine sahip benzersiz hücrelerdir (8).

Nöronal kök hücreler, yeni nöronların ve glial hücrelerin sürekli üretimi için büyük önem taşırlar ve kök hücre nişleri olarak adlandırılan beynin farklı bölgelerinde ayrı tutulurlar. Embriyoda, multipotent kök hücreler nöronal tübün nöroepitelyal bölümünü oluştururlar. Bu hücrelerin farklılaşması, kesin bir zaman diliminde kritik pozisyonel işaretlerle yönlendirilir. Bu yönlendirme, beyinde çeşitli nöronal ve glial fenotiplerin bulunması ile sonuçlanır. Sinir sistemi olgunlaştıkça, merkezi sinir sistemindeki nöronal kök hücrelerin sayısı azalmaktadır. Yetişkinlikte, nöronal kök hücreler merkezi sinir sisteminin yalnızca kök hücre nişleri olarak bilinen belirli bölgelerinde bulunur (9).

2.4.2. Kanseri Kök Hücresi

Tümör kitlesindeki kanser hücrelerinin sınırlı bölünme yetenekleri vardır, dolayısıyla azınlıkta bir tümörjenik popülasyon yansıtlar. Buna karşın, kanser hücrelerinin tanımlanmış alt kümesi geniş çaplı bir kendini yenileme potansiyeli sunmaktadır. Bu şekilde yeni bir tümörü oluşturabilme kapasitesine sahip hücre popülasyonları kanser kök hücreleri ya da kanser başlatan hücreler olarak adlandırılmaktadır (10).

Kanseri kök hücrelerini tümör sağkalımının kilit noktası yapan özgün niteliklerinin arka planında kendini yenileme, çok yönlü farklılaşma, tümörjenisite yetenekleri yer almaktadır (11). Kanseri kök hücreleri belirli özellikleri esas alınarak tanımlanır. Bunlar arasında, alt popülasyonlarının yüzey belirteçleri seviyelerine göre izole edilebilmeleri, kültür ortamında küresel koloniler oluşturabilmeleri ve kemoterapötik ajanlara ya da radyasyona maruz kaldıklarında bile sağ kalımlarının yüksek olması yer almaktadır. Bu nedenle, birçok kanseri tedavi stratejisi tümör kitlesindeki hücreleri öldürmesine rağmen, yeni tümörler oluşturabilen dirençli kanseri kök hücresi popülasyonunu bertaraf edememektedir (10).

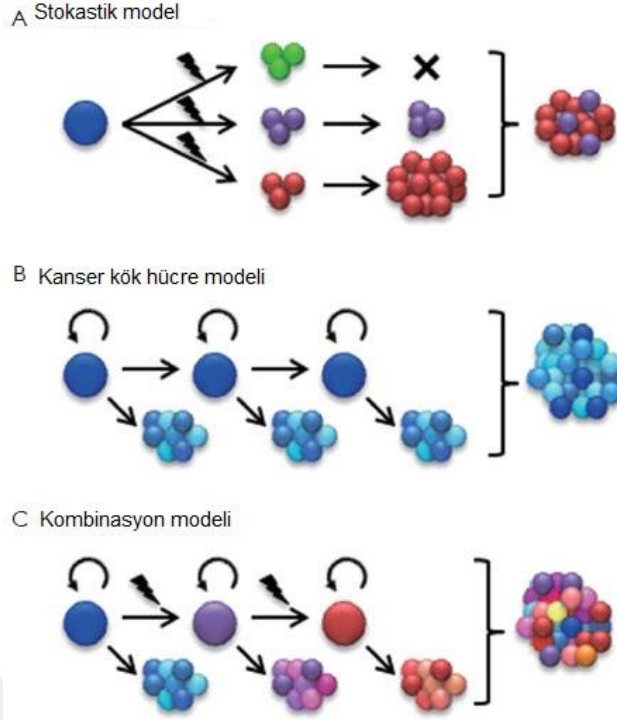
Tedavinin başarısızlığa uğramasındaki esas neden radyasyon ya da standart kemoterapiye olan dirençtir. Kanıtlar, kanseri kök hücresinde zengin popülasyonların kanseri kök hücresi içermeyen popülasyonlardan daha dirençli olduklarını ortaya koymaktadır. Kanseri kök hücrelerinin kemoterapiye direnç sağladıkları meme, pankreas, beyin kanserleri ve lösemi de dahil olmak üzere birçok kanseri tipinde belirtilmiştir. Aynı zamanda, beyin ve meme kanserlerinde kanseri kök hücrelerinin

radasyona direnç gösterdikleri kanıtlanmıştır. Terapötik etkinliğin sağlanması, yüzey belirteçleri ve sinyal yollarındaki çok yönlü değişimler hedeflenerek başarılabılır. Bu amaçla yapılan araştırmalar sayesinde; transkripsiyon faktörleri, hücre yüzey belirteçleri ve köklülük ilişkili sinyal yolları gibi potansiyel kanser kök hücresi hedefleri tanımlanmıştır (10).

2.5. Kanser Heterojenitesi

Gliom da dahil olmak üzere birçok kanser tipi teşhis esnasında monoklonal orijinli görünüyorsa da, tümörler genetik ve fenotipik olarak heterojen klonlardan oluşmaktadır. Tümör içindeki heterojenite 1976'da Peter Nowell tarafından özetlenen stokastik modele göre karakteristik olarak incelenmiştir. Bu açıdan, kanser heterojenitesi ve çoğalması, tek bir orijin hücresinden kaynaklanan neoplazmlar ve genetik olarak stabil olmayan hücre popülasyonlarındaki somatik mutasyonların birikiminden kaynaklanan tümör progresyonu aracılığıyla evrilen bir süreçtir. Bu modele göre, tümör büyümesini yönlendiren rastgele mutasyonlar ve neoplastik hücrelerden tedaviye dirençli subklonların oluşması nedeniyle, her kanser tipinin bireye özgü tedaviye gereksinim duyabileceği ileri sürülmüştür (6).

Stokastik model, kanser hücresi fenotiplerinin öncelikle intrinsik faktörler tarafından belirlendiğini varsaymaktadır. Kanser klonal evrimi indüklenmektedir. Ancak, bu model bireysel klonlardaki fenotipik varyasyonları etkili şekilde ele alamaz. Kanser kök hücre modeli ise, kanserin kısmen orijinal dokuya benzer hiyerarşik bir yapıda düzenlendiğini varsaymaktadır. Tümörjenik potansiyel kanser kök hücresi altpopülasyonu ile sınırlıdır. Buna ek olarak, kanserde hücreler heterojenite multipotent kanser kök hücrelerinin bir ürünüdür. Ancak, bu model en geç evre kanserlerde genetik olarak farklı klonların bir arada idame ettirilmesini açıklamada yetersiz kalmaktadır. Gelişen kanıtlar, bazıları hiyerarşik bir biçimde düzenlenen, bir ya da birden fazla baskın klon tarafından yönlendirilmiş kanserlerde bu iki modelin bir kombinasyonunu önermektedir. Tanı esnasında, orijinal hiyerarşik tümörjenik kapasiteyi destekleyen ve farklılaşmayı azaltan genetik ya da epigenetik olaylar nedeniyle değişime uğrayabilir (6).



Şekil 1: Kanser heterojenitesi modeli (6)

2.5.1. Glioblastom Kök Hücresi

Kanser kök hücrelerinin fenotipik belirteçlerle diğer tümör hücrelerinden ayrılması çalışmalarda kolaylık sağlamıştır. Gliom kök hücreleri ilk kez nöronal ve hematopoetik kök hücre belirteci olan CD133 ile tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda, CD133- tümör hücreleri tümörjenik potansiyel için yetersiz kalırken, 100 CD133+ gliom hücresinin ksenograft tümör geliştirmek için yeterli olduğu gösterilmiştir (6).

Gliomda kanser kök hücrelerinin keşfi ile bu ölümcül hastalığın anlaşılmasında köklü değişiklikler sağlanmıştır. Kendilerini sürekli yenileyen gliom kök hücreleri etkili tümörjenik potansiyel sergilemektedir ve güncel tedavilere yanıtta daha özelleşmiş gruplardan farklıdır. Tekrarlayan hastalık büyük ihtimalle gliom kök hücrelerden ya da önemli terapötik hedef olan kök hücre fenotipini indükleyerek kök hücre benzeri fenotipleri kazanmak için yeniden programlanmış soylardan kaynaklanmaktadır. Kanser kök hücresi ve klonal evrim modelleri üzerindeki

tartışma devam ederken, geçen on yıllık sürede gliom kök hücre araştırmalarından ve beklenen klinik etkilerden önemli bilgiler kazanılmıştır (6).

Kanser kök hücre modeli, heterojen “*transit-amplifying*” ve farklılaşmış kanser hücresi tiplerini meydana getiren, kendi kendini idame ettiren kanser kök hücrelerinin en üstte olduğu fonksiyonel heterojenitenin hiyerarşik bir modelini önermektedir. Kanser kök hücrelerinin bölünmesinin iki anahtar sonucu heterojen kanser hücresi tiplerine farklılaşma ve bir kanser kök hücresi havuzunu devam ettirmek için kendi kendini yenilemedir (6).

Birçok çalışma glioblastomda kanser kök hücrelerinin varlığına dair kanıt sağlamaktadır ve devam eden nöroonkolojik araştırmaların çoğu hastalığın patogenezinde ve tedavisinde bu kanser kök hücrelerinin kesin rolünün daha iyi anlaşılabilmesine odaklanmaktadır. Kanser kök hücresi hipotezi, glioblastom heterojenitesini ve bu tümörlerin konvansiyonel tedavilere direncini oldukça açıklamaktadır, dolayısıyla yeni ilaçların tanımlanmasına destek vermektedir. Kanser kök hücreleri tümör kitlesini oluşturan hücrelerden ayırt edici özelliklere sahip olduğundan, deneysel ve farmakolojik yaklaşımlar tercihen bu rezidüel, kemoterapi ve radyoterapiye dirençli hücreleri hedefleyerek yok etmeye yönelmiştir. Gelecekte kanser kök hücresi alt popülasyonları hedeflenerek önemli ilerlemeler elde edilecektir. Geleneksel tedavi yöntemleri ile sinerjistik etki sağlanarak glioblastom tedavisinin etkinliği artacaktır (11).

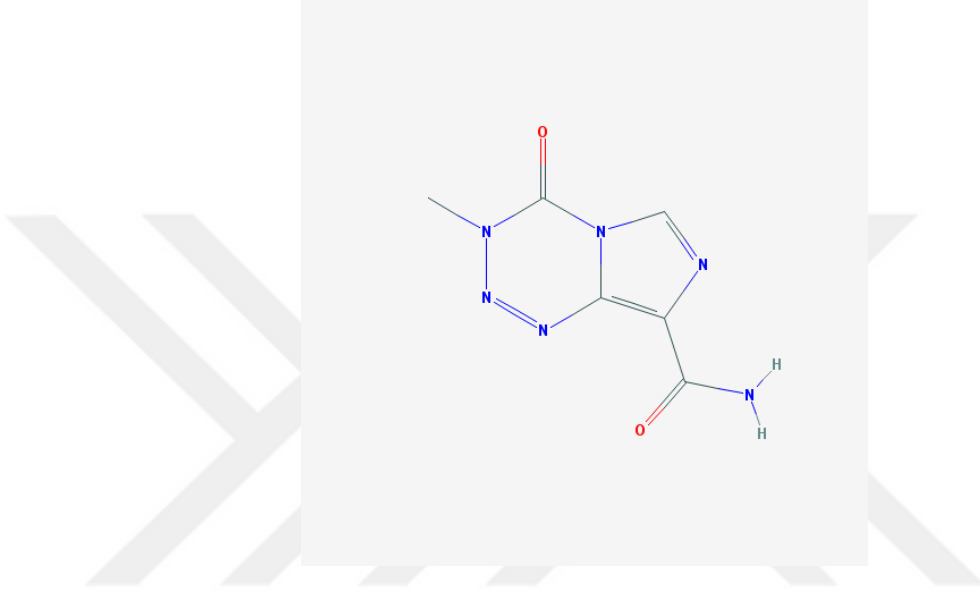
Gliom kök hücrelerinde normal olarak çalışan yollara rastlamak zordur. p53 beyindeki kök hücrelerin proliferasyonunu düzenler. p53 mutant nöronal kök hücrelerde, transkriptom analizleri ile çeşitli hücre döngüsü düzenleyicilerinin düzenlenmesindeki hatalar tanımlamıştır (4).

2.6. Kullanılan İlaçlar

2.6.1. Temozolomid ve Etki Mekanizması

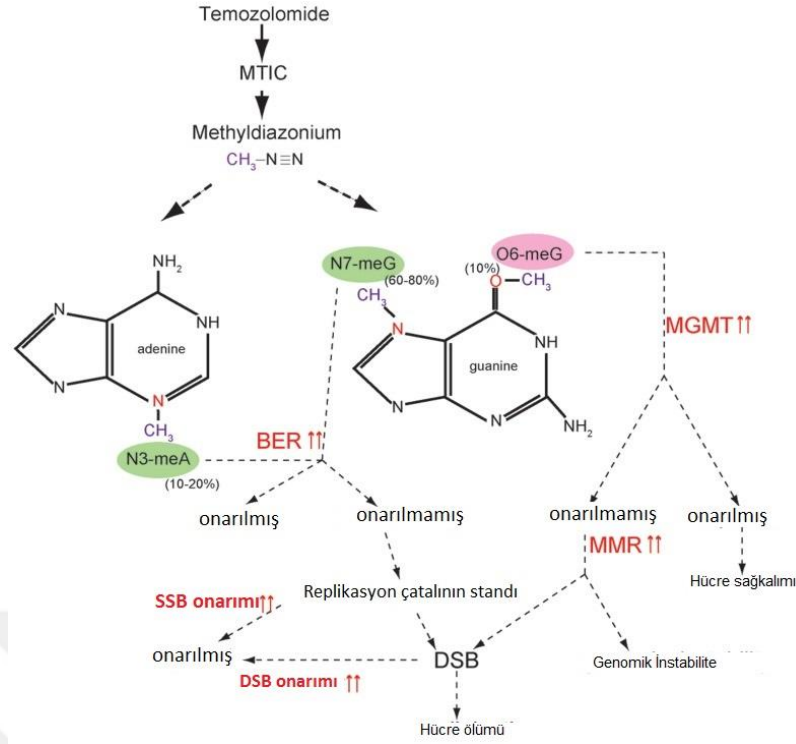
Temozolomid (TMZ) gliom tedavisinde en sık kullanılan alkilleyici ajan olmakla beraber, çoğu hasta tarafından iyi tolere edilmektedir ve uygun farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklere sahiptir (4).

Birçok çalışma, GBM prognozunu geliştiren çeşitli yaklaşımları kullanarak TMZ'ye olan direncin üstesinden gelmeyi amaçlamaktadır. Bu nedenle, TMZ uygulamasının modifiye edilmesi, TMZ'nin diğer ajanlarla kombine edilmesi ve gliom kök hücrelerini hedefleyen yeni stratejilerin ve ajanların geliştirilmesi gerekmektedir (12).



Şekil 2: Temozolomidin Kimyasal Yapısı (13)

Alkilleyici bir ajan olan TMZ, hücre döngüsüne özgü olmayan ve DNA metilasyonuna neden olan bir antikanser ilaçtır (14). O⁶-metilguaninin DNA replikasyonu için timin ile yanlış eşleşerek TMZ sitotoksitesine neden olduğu düşünülmektedir (15). DNA tamir enzimi olan O⁶-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT), TMZ tarafından oluşturulan sitotoksik lezyonları ortadan kaldırır. MGMT, TMZ ile indüklenmiş DNA hasarının tamirinde iş gören en önemli DNA tamir mekanizmalarından biri olarak yer almaktadır. Bu nedenle, MGMT ifadesi, aktivitesi ve promotör metilasyon durumu GBM'de TMZ'ye yanıtla ilişkilidir. MGMT'yi ifade eden tümör hücreleri TMZ'ye daha dirençlidir, bu açıdan MGMT aktivitesini hedeflemek TMZ'nin terapötik etkinliğini arttırabilir. Sonuç olarak, TMZ'ye karşı olan direnci MGMT'nin teşvik ettiği doğrulanmıştır (16).



Şekil 3: Temozolomidin Etki Mekanizması (17)

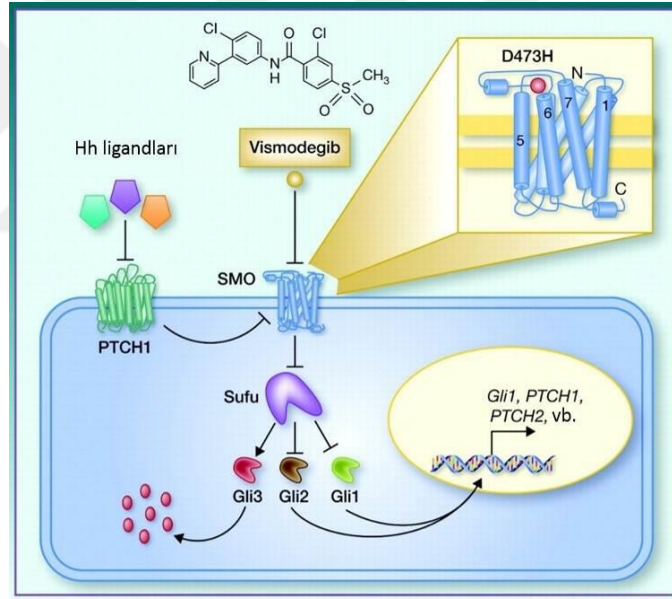
2.6.2. Vismodegib ve Etki Mekanizması

Vismodegib (VIS) seçici olarak “*Smoothened*” (SMO)’ya bağlanarak aktivitesini engelleyen sentetik, oral ve küçük moleküler yapıda bir ajandır. SMO aktivasyonunun engellenmesi, “*Hedgehog*” (Hh) hedef genlerinin aşağı yönde ifadesinden sorumludur ve tümör hücresinin proliferasyonunu durdurur. Preklinik çalışmalarda çok aktif olan VIS’in normal hücrelerin proliferasyonunu engellemeden tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği bulunmuştur. Ocak 2012’de metastatik ya da bölgesel olarak ileri bazal hücreli karsinom tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (18).



Şekil 4: Vismodegib'in Kimyasal Yapısı (19)

VIS önemli derecede aşağı akım sinyalleşmesini engelleyerek, SMO'nun ekstrasellüler bölgesine bağlanır. VIS'e karşı kazanılmış olan direnç, SMO'nun D473H olarak adlandırılan ekstrasellüler bölgesinde VIS bağlanmasını önleyen ikinci bir mutasyondan kaynaklanır (20).



Şekil 5: Vismodegib'in Etki Mekanizması (20)

2.7. DNA Tamiri

DNA tamiri gliomlarda bir direnç mekanizması olarak klinik açıdan önem teşkil etmektedir. Güncel çalışmalar gliomlardaki tüm hücrelerin eşit derecede malignant olmadığını göstermektedir. Belirli alt popülasyonlar özellikle tümör progresyonuna yönlendirmeye ve kemoterapi ve radyoterapiye dirence yatkındır. Bu hücreler, olası normal kök hücre kökenleri nedeniyle farklı tipteki kanser kök

hücreleri ya da kanser başlatan hücreler veya tümör yayan hücreler olarak adlandırılırlar. DNA tamirinin kemoterapötiklerinin etkisini ve gliom kitlesine karşı iyonize radyasyonu azaltmasına rağmen, nadir gliom kök hücre popülasyonlarının direncine olan katkısı belirgin değildir. DNA tamirinin haricindeki mekanizmalar (özellikle düşük proliferasyon ve DNA hasar kontrol noktası yanıtı) gliom kök hücrelerindeki direncin esas oyuncularıdır ve hedeflenmeleri önemli terapötik kazanımlar sağlayabilir (4).

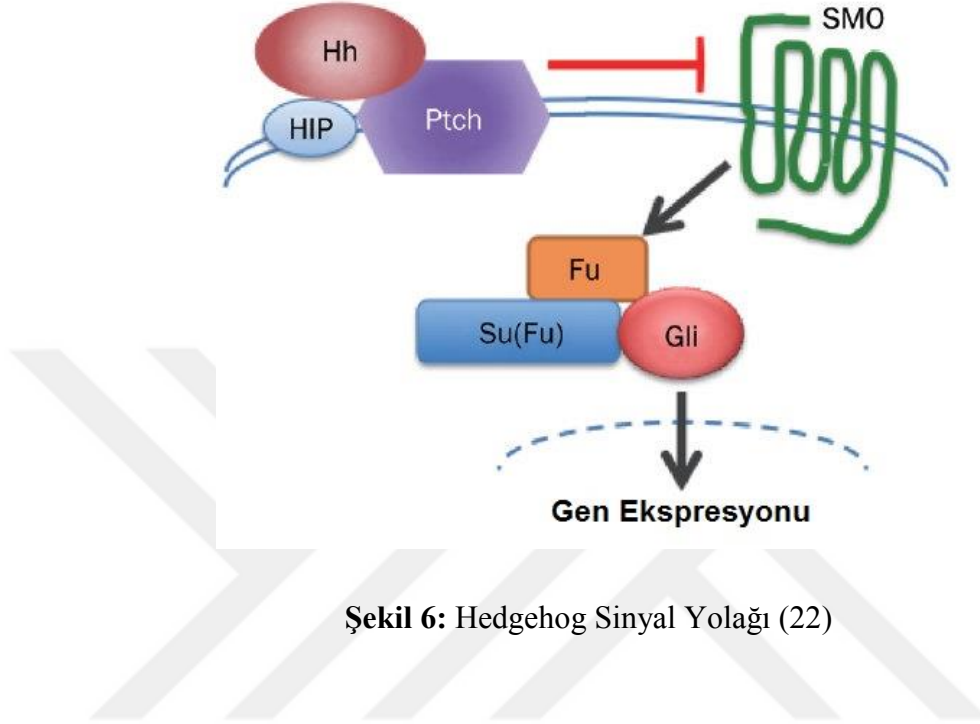
2.8. Hedgehog Sinyal Yolağı

Hedgehog (Hh) sinyal yolağı embriyonik dönemde hücrel büyüme ve farklılaşmada önemli rol oynar. Hh sinyal yolağının karsinogenezdeki rolü ilk kez Gorlin sendromunda genetik mutasyonların keşfi sayesinde gösterilmiştir. Bu mutasyon Hh sinyal yolağının hatalı düzenlenmesinden ve bazal hücreli karsinom gelişiminden sorumludur. Hatalı düzenlenmiş Hh yolağı aynı zamanda medulloblastom ve beyin, akciğer, meme ve prostat kanseri gibi diğer birçok kanser tipinde belirtilmiştir (18).

Hh sinyal yolağı GBM da dahil olmak üzere birçok kanser tipi ile ilişkilidir. Bu sinyal yolağı çok hücreli organizmalarda evrimsel olarak korunmuştur ve hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu konumsal ve geçici olarak kontrol eden embriyonik paternin yönetilmesinde önemlidir. Hh sinyalindeki anormallikler sonucunda sinyal iletimi yokluğunda ya da azaldığında holoprosensefali gibi gelişimsel defektler ya da yolak disregüle olduğunda Gorlin sendromunda olduğu gibi kansere yatkınlık meydana gelebilir (21).

Hh yolağında üretilen proteinler embriyonik doku gelişimi ve postnatal doku homeostazı için son derece önemlidir. Hh yolağının anormal aktivasyonu, kök hücre ya da progenitor hücre ilişkili yolağın etkisine bağlı olarak birçok malignansinin gelişiminde rol almaktadır. Hh sinyaline hücrel yanıtlar Patched-1 (PTCH1) ve Smoothed (SMO) olarak adlandırılan transmembran proteinleri aracılığıyla düzenlenmektedir. PTCH1, SMO aktivitesini baskılamada işlev görmektedir. PTCH1'e bağlanan Hh ligandı, GLI transkripsiyon faktörü ailesini aktive etmek için bu işlevi engellemektedir. PTCH1 ve GLI1, Hh sinyal yolağının transkripsiyonel gen

hedefleridir ve uygun ekspresyon düzeylerinde malignansilerde Hh yolağı aktivitesini gözlemlemekte kullanılabilir (22).



Şekil 6: Hedgehog Sinyal Yolağı (22)

Anormal Hh sinyalinin tumörigenezdeki rolü ilk kez Hh sinyal transdüksiyon bileşenlerindeki mutasyonların keşfi ile değerlendirilmiştir. Bu bileşenlerdeki mutasyonlar, ligand bağımsız yolak aktivasyonunda medulloblastoma ve bazal hücre karsinomasının sporadik ya da kalıtsal (Gorlin ya da bazal hücre nevus sendromu) formları ile ilişkilidir (22).

Cyclopia üzerinde yapılan çalışmalar, direkt bağlanma ve antagonistlik aracılığıyla potansiyel Hh inhibitörü olarak siklopamin teratojenini tanımlamıştır. Siklopamin bitki türevli bir alkaloiddir ve çeşitli sentetik SMO antagonistleri tanımlanmıştır. Bazı SMO antagonistleri klinik denemelere ilerletilmiştir ve bunlardan biri olan vismodegib, metastatik BCC tedavisi için FDA onayı almıştır (6).

2.9. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücre ölümü gelişim esnasında vücudun şekillenmesinde ve doku homeostazının düzenlenmesinde büyük rol oynayan temel bir hücresel yanıttır.

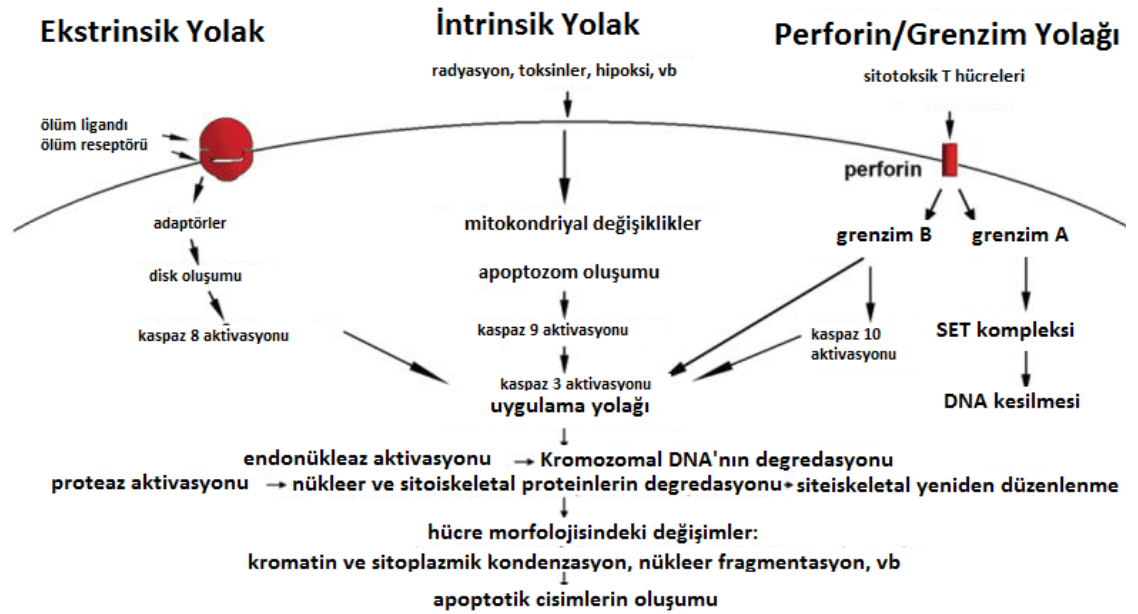
Hücre ölüm şekilleri kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve immün hastalıklar gibi ölümle bağlantılı hastalıklarla ilişkilidir. Çok hücreli organizmalarda hücre ölümü sınıflandırması yapıldığında, apoptoz, nekroz ve otofaji olmak üzere morfolojik olarak üç farklı ölüm mekanizması tanımlanmıştır (23).

Tip I programlı hücre ölümü iyi bilinen kaspaz bağımlı apoptozdur ve hücre büzüşmesi, nükleer yoğunlaşma ve parçalanma, hücre yüzeyinde çıkıntı, ekstraselüler matrikse veya komşu hücrelere adezyonda kayıp ile karakterizedir. Biyokimyasal değişiklikler, kromozomal DNA yarığını, fosfatidilserin salınımını, ve spesifik proteolizis ile birkaç hücre içi madde parçalanmasını içerir. Tip II programlı hücre ölümü veya otofaji, otofagozom oluşumu ile başlayan evrimsel olarak korunmuş katabolik bir süreçtir. Tip III programlı ölümü ise hücrede şişme, organel fonksiyon bozukluğu ve hücre lizisi ile karakterize nekroz olarak tanımlanmaktadır (24). Son olarak tanımlanan nekroptoz, programlı hücre ölümünün bir tipi olup morfolojik özellikler açısından nekroza benzerlik göstermektedir, ancak apoptozda olduğu gibi birçok protein tarafından sıkıca denetlenmektedir (25).

2.9.1. Apoptoz

Apoptoz kelimesi Yunan dilinden türemiştir ve ağaçlardan veya çiçeklerden yaprakların “düşmesi” olarak tanımlanarak, sonbaharda ağaçların yapraklarını dökmesi anlamına gelir. Apoptoz, programlanmış bir hücre ölümü olarak, hücre metabolizması için gereklidir. Apoptoz olayları ilk olarak, 1842 yılında Alman bilim adamı Carl Vogt tarafından tarif edilmiş iken 1972 yılında, John Foxton Ross Kerr ve ark. doku hücre ölümünü açıklamak için apoptoz terimini ilk olarak kullanmışlardır ve bu araştırmalar apoptoz çalışmalarının başlangıcını oluşturmaktadır. Apoptoz ile ilgili ikinci dönem biyokimyasal düzeyinin ve apoptotik hücrenin morfolojik değişikliklerinin araştırılmasıdır. Bu çağda insanlar apoptozun buruşuk hücre membranı, DNA fragmentasyonu ve sitozol kalsiyum artışı ile eşlik ettiğini biliyordu. Bu süre içerisinde elektron mikroskobu araştırmalarda hayati bir öneme sahipti. Apoptoz araştırmalarını takiben araştırmalar son yıllarda üçüncü döneme geldi. Bu dönemde bilim adamları apoptozun moleküler mekanizmasını araştırmaya ve klinik tedavi için bu hücre ölümünü kullanmaya başladı. Apoptoz sırasında Bcl-2 ailesi proteini, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, Bid, Bax vb. gibi bazı anahtar proteinler bulunmuştur (26).

Apoptoz mekanizmaları moleküler olayların enerji bağımlı bir kaskadını içeren, son derece kompleks ve karmaşık mekanizmalardır. Bugüne kadar, araştırmalar iki ana apoptotik yolak olduğunu işaret etmektedir; ekstrinsik veya ölüm reseptör yolağı ve intrinsik veya mitokondriyal yolak. Fakat şimdiki kanıtlar bu iki yolağın birbiri ile ilişkili olduğu ve bir yolaktaki moleküllerin diğerini etkileyebileceği yönündedir. T-hücre aracılı sitotoksisite ve hücrenin perforin granzim bağımlı ölümü içeren ek bir yolak vardır. Perforin / granzim yolağı granzim B veya granzim A vasıtasıyla apoptozu indükleyebilir. Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B yolakları aynı bağlantı ya da uygulama yolağı üzerinde birleşir (Şekil 7). Bu yolak, kaspaz-3 tarafından başlatılır ve DNA parçalanması, sitoskeletal ve nükleer proteinlerin degradasyonu, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşumu fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ile sonuçlanır ve sonunda fagositik hücreler tarafından alınır. Granzim A yolağı, tek zincirli DNA hasarı ile, kaspaz-bağımsız hücre ölümü yolağı aktive edilir (27).



Şekil 7: Apoptotik Yolaklar (27)

Ekstrinsik sinyal yolakları ile başlayan, apoptoz transmembran reseptör-aracılı etkileşimleri içerir. Bu ölüm reseptörleri tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör gen süperailisinin üyeleridir. TNF reseptör ailesinin üyeleri benzer sistein-zengin ekstraselüler alanlar paylaşır ve “ölüm alanı” olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik sitoplazmik bir alana sahiptir. Bu ölüm alanı hücre yüzeyinden intrasellüller

sinyal yolağına ölüm sinyalinin iletilmesinde kritik bir rol oynar. Şimdiye kadar, en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve uyumlu ölüm reseptörleri FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4ve Apo2L/DR5'i içerir (27).

İntrinsik sinyal yolları ile başlayan apoptoz, direkt olarak hedef hücre üzerinde rol oynayan intrasellüler sinyal üreten non-reseptör aracılı uyarının çeşitli bir sırasını ve mitokondriyal-başlatımlı olayları içerir. İntrinsik yolağı başlatan uyarı, negatif veya pozitif biçimde rol oynayabilen intrasellüler sinyaller üretir. Negatif sinyaller, ölüm programlarının bastırılmasının yetmezliğine yol açabilen belirli büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin eksikliğini içerir. Pozitif bir biçimde rol oynayan diğer bir uyarı, radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertemi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller içerir (27).

Bu uyarıların tümü, mitokondriyal permeabilite transisyon (MPT) porunun açılması, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı ve pro-apoptotik proteinlerin iki ana grubunun intermembran boşluktan sitozole salınımı ile sonuçlanan mitokondri iç membranında değişikliklere neden olur. Birinci grup sitokrom c, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi'den oluşur. Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive eder. Sitokrom c bağlanır ve hem Apaf-1'i hem de prokaspaz-9'u aktive eder, bir apoptozom oluşur. Prokaspaz-9'un kümelenmesi bu şekilde kaspaz-9'un aktivasyonuna yol açar (27).

2.9.2. Nekroz

Yunanca ölü anlamında olan nekroz, hücrenin mekanik hasarlara maruz kalması ile ilişkili olan genellikle fizyolojik olmadığı kabul edilen, patolojik hücre ölümüdür. Nekroza yanıtta bozulan iyon homeostazı endoplazmik retikulum, golgi kompleksi gibi zarlı organellerin şişmesine, organellerin ve takiben hücrenin lizise uğrayarak parçalanmasına ve dokuda enflamasyona neden olur. Proteaz aktivitesine bağlı olarak nekroz, DNA'da rastgele, düzensiz kırıklara neden olur (28).

GBM'de apoptotik süreç yetersiz olmasına rağmen, patolojik ve radyolojik şartlar neredeyse her zaman görünür nekroz odakları ortaya koymaktadır. Nekrozun GBM proliferasyonu, anjiyogenezi ve invazyonu ile ilişkili olduğu görünmektedir. Buna ek olarak, tümör hücresi nekrozu potansiyel terapötik değer taşıyan çeşitli tedaviler tarafından indüklenmektedir (23).

2.9.3. Otofaji

İlk kez Christian De Duve tarafından kullanılan otofaji sözcüğü kendini- yeme anlamına gelmektedir. Mikroskopik olarak otofajik hücreler otofagozom adı verilen hücre içi kabarcık yapılarını oluşturmalarıyla karakterize edilirler. Otofagozomların lizozomlarla birleşmesi ile meydana gelen otolizozomlar içinde hücre içeriği ya da hücrenin tamamı lizozomal enzimler aracılığıyla degrade edilir. Otofaji hem hücrenin homeostazını korumak için geliştirdiği evrimsel olarak en eski savunma mekanizmasıdır hem de hücre hasarının onarılamayacak boyutlarda olduğu durumlarda hücreyi ölüme götüren katabolik süreçleri içermektedir. Otofajik proseslerin bozulması kanseri de içeren pek çok patoloji ile ilişkilendirilmiştir (27).

2.9.4. Nekroptoz

Nekrozun kazara, kontrol edilmeyen ve pasif bir hücre ölüm şekli olduğu on yıllardır savunulmasına rağmen, artan kanıtlar nekrozun da moleküler mekanizmalar tarafından düzenlenerek ve nekroptoz (programlı nekroz) adını alarak gerçekleşebileceğini belirtmektedir.

Erken evrede tedaviye rağmen, GBM hastalarının ortalama yaşam süresi zayıf kalmaktadır. GBM tümörigenezi, proliferasyonu ve tedaviye direncin nedeni olarak apoptoz mekanizmasındaki fonksiyonel düzensizliklerin olduğuna inanılmaktadır. Güncel olarak, nekrotik hücre ölümünün apoptoz gibi kontrollü ve düzenlenen bir proses olduğu düşünülmektedir ve programlı nekroz ya da nekroptoz olarak tanımlanmaktadır. GBM tedavisinde apoptozun indüklenmesi, tümör hücrelerinin çoğunlukla apoptoza karşı geliştirdikleri dirençten dolayı kayda değer bir başarı sağlamamıştır. GBM’de nekroptoz modülasyonu sayesinde apoptoz direnci alt edilerek tedavide daha iyi sonuçlar alınabilir (23).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Sahip oldukları avantajlar nedeniyle in vitro kanser araştırmalarında ve ilaç geliştirme çalışmalarında sıklıkla hücre hatlarından yararlanılmaktadır. Kanser araştırmalarında hücre hatlarının önemli bir model olarak kullanılmasının nedenlerinin başında, genetik olarak homojen yapıda olmaları, uygun olmayan koşullarda da korudukları sınırsız üreme özellikleri, kullanım ve uygulanabilirliklerinin kolay olması, etik kurul belgesi gerektirmemeleri ve ticari olarak temin edilebilmeleri gibi çok sayıda özellik gelmektedir.

Hücre kültürü çalışmaları sırasında hücrelerin yaşayabilmesi ve çoğalabilmesi için kullanılan besiyerleri uygun maddeleri içerecek şekilde seçilmeli, hücreler gelişimlerini sürdürebilecekleri optimal koşullarda inkübe edilmelidir. Tez çalışmamız dahilinde kullanılan, insan beyin kanseri kök hücreleri ve insan nöronal kök hücreleri Celprogen'den temin edildi. Bu hücre hatları için sırasıyla Human Brain Cancer Stem Cell Complete Growth Media with Serum ve Human Neuronal Stem Cell (Ventricles) Complete Media with Serum besiyerleri kullanıldı. Hücreler çalışma için uygun yoğunluk değerine ulaşana kadar 37°C' de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde, yatay konumda kullanılan 75cm²' lik flasklar aracılığıyla kültür koşullarında çoğaltıldı. Hücrelerin düzenli olarak takip aşamaları ve kontrolleri ışık ve inverted mikroskopları kullanılarak yapıldı. Tüm hücre kültürü çalışmaları sterillaminar akım kabini içerisinde, kontaminasyondan uzak olacak şekilde gerçekleştirildi. Hücrelere belirlenen doz aralığında TMZ ve VIS etken maddeleri ve TMZ+VIS kombinasyonu uygulandı. Doz uygulanmayan kontrol hücreleri için çalışmalar doz uygulanan gruplara paralel şekilde yürütüldü. Çalışmamızda ticari olarak elde edilen hücre hatları kullanıldığından, etik kurul belgesine ihtiyaç duyulmadı.

3.2. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan kimyasallar ve cihazlar Tablo1 ve Tablo2'de belirtildi.

Tablo 1: Kullanılan Kimyasal Maddeler

MADDE	MARKA
Human Brain Cancer Stem Cell Complete Growth Media With Serum	Celprogen
Human Neuronal Stem Cell (Ventricles) Complete Media With Serum	Celprogen
Cell Freezing Media	Celprogen
Trypsin	Biological Industries
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma
Tripan Mavisı Boyası	Sigma
DNase/ RNase Free Su	Fermentas
Temozolomid (25 MG)	Sigma
Vismodegib (10 MG)	Selleckchem
Wst-1 Cell Proliferation Reagent	Roche
Anneksin V Fitc	Becton Dickinson
Mitoscreen Kit (JC-1)	Becton Dickinson
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RT ² First Strand Kit	Qiagen
RT ² SYBR Green qPCR Mastermiks	Qiagen
RT ² Profiler PCR Arrays	Qiagen

Tablo 2: Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

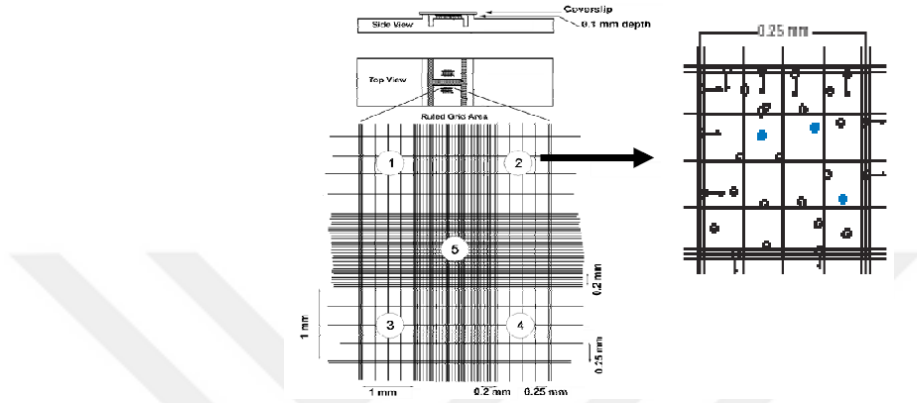
CİHAZLAR ve SARF MALZEMELER	MARKA
15 ve 50 ml Falkon Tüp	Corning
Steril Kültür Kapları	Corning
Extra-Cellular Matrix Pre-Coated T25 Flasks	Celprogen
Extra-Cellular Matrix Pre-Coated T75 Flasks	Celprogen

Extra-Cellular Matrix Pre-Coated 6 Well Flasks	Celprogen
6' lı Mikroplak	Corning
96' lı Mikroplak	Corning
Cell Scraper	Corning
CO₂' li İnkübatör (Hepa Class 100)	Thermo Electron Co.
Laminar Air Flow	Hera Safe Heraeus
Inverted Mikroskop	Olympus
Fluoresan, Işık Mikroskobu	Olympus
Real-Time Online PCR LightCycler 480 Instrument II	Roche
Pipetman Seti(0,1–1000µl)	Eppendorf
-86°C Derin Dondurucu	Revco Ultima II
-20°C Derin Dondurucu	Vestel
Hassas Terazi	Sartorius TE 214S
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen
Thermal Cycler	Techne Genius
Santrifüj	Eppendorf
Neubauer Lam	Marienfeld, Almanya
Multiskan™ Fc Microplate Photometer	Thermo Scientific
BD Accuri C6	BD Biosciences
NanoDrop 1000	Thermo Scientific

3.3. Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi

Tripan mavisi boyası kültürü yapılan hücre hatlarının canlılıklarını ve sayılarını belirlemek amacıyla kullanıldı. Bunun için, 50 µl süspanse hücre ile 50 µl boya karışımı 4x4' lük kareler içeren “Neubauer” lamına aktarılarak ışık mikroskopunda hücrelerin canlılığı ve sayısı belirlendi (Şekil 8). Tripan mavisi boyası testi gereğince boyayı içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı içine almayanlar ise canlı olarak değerlendirildi. Canlı hücre toplamının ortalaması alınarak 2×10^4 ile

arpılmasıyla, ml başına düşen canlı hücre sayısı saptandı. Aynı işlem ölü hücreler için de gerçekleştirilerek, ml başına düşen ölü hücre sayısı belirlendi. Hücre canlılığı ise, toplam hücre sayısının canlı hücrelere oranlanmasıyla, yüzde değeri olarak belirlendi.



Şekil 8: Neubauer Lami

3.4. Hücre Hatlarının Pasaj İşlemleri

Hücreler üreyerek tüm flask yüzeyini kapladığında, hücrelere yeni üreme alanı kazandırmak amacıyla 75 cm²' lik flaslara pasajlandı. Çalışmada kullanılan hücre hatları monolayer üreme özelliğine sahip olduğundan pasaj işlemi için öncelikle yapıştıkları yüzeyden kaldırıldı. Bu işlem sırasında kök hücrelerin yüzeyden ayrılabilmesi için scraper kullanıldı. Pasajlama için uygulanan işlem sırası aşağıdaki gibidir:

- 1) İçlerinde ortam bulunan flaskların yüzeyleri, scraper aracılığıyla kazınarak tüm hücrelerin süspanse duruma geçmesi sağlandı.
- 2) Tüm flasklardan elde edilen hücre-ortam karışımı 15 ml' lik falkon tüplerine aktarıldı ve 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edildi.
- 3) Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücreler 10 ml kendi uygun besiyerleri içerisinde süspanse edilerek 2 adet 75 cm²' lik flaska eşit şekilde ayrıldı.

- 4) Flasklara 10 ml daha besiyeri ilave edilerek pasajlama işlemine son verilmiş oldu.
- 5) Flasklar inkübatöre konularak hücrelerin tekrar yüzeye yapışmaları ve proliferasyonları sağlandı.

3.5. Hücre Hatlarının Dondurularak Saklanması

- 1) Dondurulmak istenen hücreler scraper ile yapışmış oldukları flask yüzeyinden kaldırıldı.
- 2) Hücre-ortam karışımı 15 ml' lik falkon tüplere alınarak 1200 rpm' de 5 dk süre ile santrifüj edildi.
- 3) Bu esnada buz üzerinde 9:1 oranında serum: DMSO karışımı hazırlandı.
- 4) Santrifüjden alınan falkon tüplerindeki süpernatant uzaklaştırılarak dipteki hücreler 800 µl serum-DMSO karışımı ile buz üzerinde resüspanse edildi.
- 5) Resüspanse edilen hücreler buz içerisinde olan kriyotüplere aktararak -86°C'ye kaldırıldı.

3.6. Dondurulan Hücre Hatlarının Çözdürülmesi

- 1) Kriyotüpler içerisinde -86°C' de muhafaza edilen hücreler oda ısısına alındı.
- 2) DMSO' nun hücreler üzerindeki negatif etkisini indirmek için kriyotüp içerisine hızlı şekilde besiyerleri eklenerek, çözünen hücreler 15 ml besiyeri içeren falkon tüp içerisine alındı.
- 3) 1200 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.
- 4) Süpernatant uzaklaştırıldı ve çöken hücreler tekrar 15 ml besiyeri içinde süspanse edilerek 1200 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.
- 5) Süpernatant uzaklaştırıldı ve çöken hücrelere 15 ml besiyeri eklenerek 75 cm²' lik flasklara ekildi.
- 6) Flasklar, 37 °C, % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre alındı.

7) Her bir hücre hattı kendi ikilenme süresince üremeye başladı. Yaklaşık 1 hafta sonra tüm yüzeyi kaplayan hücrelere, canlılıklarını korumak ve devamlılıklarını sağlamak için pasaj işlemi uygulandı.

3.7. Sitotoksisite Testi

Sitotoksisite analizleri hücre biyolojisinde rutin uygulamalar için özel bir önem taşımaktadır. Her hücre hattında TMZ, VIS ve TMZ + VIS kombinasyonunun sitotoksik etkileri WST-1 Cell Proliferation Reagent yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde stabil tetrazolyum tuzu olan WST-1, canlı hücrelerde NAD(P)H'nin glikolitik üretimine bağlı olarak, hücre yüzeyinde meydana gelen kompleks bir hücresel mekanizma ile çözünebilir formazana bölünmektedir. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakasına ekilen hücrelerin, 0.5- 4 saat boyunca WST-1 reaktifi ile inkübasyonun ardından meydana gelen değişim spektrofotometre aracılığıyla ölçülerek canlı hücrelerin oranı, elde edilen absorbans değerleri aracılığıyla belirlenir.

İnsan beyin kanseri kök hücreleri ve insan nöronal kök hücreleri 96-kuyucuklu plaklara, 1 ml'de 2×10^4 hücre olacak şekilde her kuyucuğa 100 µl dağıtıldı. Hücre hatlarına 2.5 µM- 500 µM aralığında TEM, 1 µM- 200 µM konsantrasyon aralığında VIS uygulamasının ardından, 24., 48. ve 72. saat inkübasyonların her biri için kuyucuk başına 10 µl WST-1 solüsyonu eklenerek 0.5- 4 saat boyunca spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi. Bu inkübasyon süresince oluşan formazan boyasının kantitatif ölçümü 15 dk' da bir Multiskan FC spektrometresinde 450 nm absorbans 620 nm referans aralığında değerlendirildi. Elde edilen veriler doğrultusunda her bir madde için IC_{50} değerleri belirlendi.

8. İzobologram Analizi

İzobologram analizi, kombinasyonel kanser kemoterapisinde ilaç etkileşimlerinin değerlendirilmesi için uygulanan popüler bir analizdir. Güncel kanser tedavilerinin çoğu, farklı terapötik ajanları kombine eden kombinasyonel stratejileri içermektedir. Çok yönlü ilaçlar çok yönlü hedefleri ve hücre alt popülasyonlarını etkilediğinden ilaç kombinasyonları geniş ölçüde kullanılmaktadır. Öncelikli amaç, ilaç direncini önleyen ve yan etkileri azaltan ortak bir terapötik etkinin artırılmasıdır. Kombinasyon uygulamalarının çoğu deneysel olarak

geliştirilmiştir. Ayrıca, preklinik modellerde olası metabolik ve biyolojik etkileşimlerin çalışılması, ilaç kombinasyonlarının çoğunun gelişimine katkı sağlamalıdır. Sinerjizm tanımı, diğerinden daha etkili olan bir ajanın ikinci bir ajanla onun etkilerini arttıracak şekilde kombine edilmesidir. Antagonizm tanımı ise, daha az etkili olan bir ajanın diğerinin etkilerini yok eden diğer bir ajanla kombine edilmesidir. Bir kombinasyon, eş zamanlı ya da sıralı kombinasyon bir plan doğrultusunda iki ajanın farklı şekillerde kombine edilmesi ile çalışılabilir. Klinikte değerlendirmeden önce antagonistik etkilerinin önlenebilmesi için, bir kombinasyonun potansiyelinin test edilmesi gereklidir.

İzobologram analizi için 96 kuyucuklu plakalara insan beyin kanseri kök hücreleri ve insan nöral kök hücreleri 1 ml'de 2×10^4 hücre olacak şekilde her kuyucuğa 100 µl ekildi. Maddelerin sitotoksosite analizlerinin ardından belirlenmiş olan IC₅₀ değerleri doğrultusunda uygun konsantrasyonlar kullanılarak elde edilen TMZ+VIS kombinasyonları hücrelere uygulandı. Madde uygulanmasının 24., 48. ve 72. saatlerinde kuyucuk başına 10 µl WST-1 solüsyonu eklenerek 0.5- 4 saat boyunca spektrofotometrik ölçümlerin gerçekleştirilmesi ile izobologram verileri elde edildi.

3.9. Apoptoz Analizleri

TMZ, VIS ve TMZ + VIS kombinasyonunun hücre hatları üzerindeki apoptotik etkilerinin belirlenmesi, sitotoksosite ve izobologram analizlerinde bulunan IC₅₀ dozunun hücrelere uygulanmasının ardından 24., 48. ve 72. saatlerde gerçekleştirildi. Doz uygulanmayan hücreler kontrol olarak alındı. Apoptoz analizleri 2 farklı yöntemin 3 tekrarlı çalışmasıyla yürütüldü.

3.9.1. Anneksin V Yöntemi

Hücrede apoptozun gerçekleştiğinin ilk kanıtı hücre sitoplazma membranının iç tarafından dış tarafına doğru fosfatidilserin (PS) moleküllerinin birikmesidir. Sağlam hücrelerin PS'e özel olarak bağlanan ve 35 kD bir protein olan Anneksin-V ile boyanması erken aşamadaki apoptotik hücreleri belirler. Membran bütünlüğünü ölçen canlı/ölü hücre diskriminatörü (PI ya da 7AAD gibi) ile birlikte kullanıldığında, erken apoptotik hücreler (sadece Anneksin-V pozitif olanlar) geç apoptotik/nekrotik hücrelerden (Anneksin-V ve PI/7AAD pozitif)

ayrıştırılabilecektir. Erken apoptotik faz oldukça hızlı gerçekleşebilir ve canlı ya da geç apoptotik/nekrotik hücreleri görünür hale getirerek ortadan kaybolabilir. Bu nedenle, geç apoptoz/nekroza girmeden önce erken apoptoza girdiklerini kanıtlamak için zamana bağımlı bir deney gerçekleştirmek gereklidir. Propidyum iyodür (PI) ve Anneksin V-FITC ile boyanan hücrelerin iki renkli nokta grafiği dört kuadranın üçündeki hücreleri belirtmektedir. Boyanmamış hücreler canlıdır ve her iki açıdan da negatiflerdir; yüzeylerinde PS eksprese ederler ve hasar görmüş membranlarından PI' ı içlerine alırlar. Sadece Anneksin V ile boyanmış hücreler apoptotik hücrelerdir; yüzeylerinde PS ekspresyonu başlamıştır ancak, sitoplazmik membranlarının geçirgenliğine neden olan sürece henüz girmemişlerdir. Anneksin V-EGFP Apoptosis Detection Kiti (BD Pharmingen), apoptoz başlangıcından sonraki gözlemlere dayanmaktadır: Çoğu hücre tipi plazma membranının iç yüzeyindeki PS'i hücre yüzeyine transloke eder. Hücre yüzeyine geldiği zaman PS, PS' ne yüksek affinite gösteren bir protein olan geliştirilmiş yeşil floresan proteini ile boyanarak belirlenebilir. Analiz akım sitometrisi ya da FITC filtresi kullanılarak floresan mikroskobu ile gerçekleştirilebilir. EGFP, diğer floresan ajanlara göre daha parlaktır ve ışığa karşı daha karardır.

TMZ, VIS, TMZ+ VIS kombinasyonunun kök hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin hücre membranındaki PS aracılığıyla değerlendirilmesi, etken maddelerin IC₅₀ dozu uygulanan hücrelere Anneksin V yöntem protokolü doğrultusunda gerçekleştirilen işlemlerin ardından BD Accuri C6 akım sitometrisinde (BD Biosciences Pharmingen) 20.000 hücrenin sayımı ile gerçekleştirildi.

Anneksin V Protokolü:

- 1) 10x Anneksin V çalışma tamponundan distile H₂O kullanılarak 1x Anneksin V çalışma tamponu hazırlandı.
- 2) Kök hücreler TMZ, VIS, TMZ+ VIS kombinasyonunun IC₅₀ dozuna 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakıldı.
- 3) İki hücre hattı için doz ve kontrol gruplarını içeren 5x10⁵ hücre/1 ml santrifüj tüplerine toplanarak 400g' de 5 dk santrifüjlendi, süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.

- 4) Her gruba 1 ml soğuk DPBS pipetlenmesinin ardından, tüpler 400g' de 5 dk santrifüjlendi.
- 6) Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak 2 tekrarlı olarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- 7) Her tüpe 100 µl 1x Anneksin V çalışma tamponu, 5 µl FITC Anneksin V ve 5 µl PI pipetlendi. İki boyanın da uygulanmadığı, yalnızca FITC Anneksin V ve yalnızca PI boyalarının uygulandığı gruplar kontrol olarak kullanıldı.
- 8) Karışımlar vortekslenerek karanlıkta 25°C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- 9) Her tüpe 400 µl 1x Anneksin V çalışma tamponu pipetlendi.
- 10) Örnekler akım sitometrisi ile analiz edildi.

3.9.2. Mitoprobe JC-1 Analizi

Apoptoz sırasında meydana gelen ilk olay mitokondri membranı üzerinde negatif bir elektro-kimyasal gradyan olarak saklanan enerjinin depolarizasyonu ve buna bağlı olarak mitokondriden sitokrom c salınmasıdır. JC-1 (The BD MitoScreen Kit) apoptozun mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\psi$) aracılığıyla belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir. JC-1, membran potansiyeline bağlı olarak ilk J-agregat oluşturan boya anlamına gelmektedir. JC-1 her biri farklı absorbans değerlerine sahip iki farklı formda (agregat veya monomer) bulunabilir. JC-1 düşük konsantrasyonlarda bulunduğunda monomerleri, yüksek konsantrasyonlarda ise agregatları oluşturur. Membran bütünlüğüne ve potansiyeline bağlı olarak canlı hücreler JC-1 ile inkübe edildiğinde, yeşil (FL-1) kanalında emisyon gösteren JC-1 monomerleri plazma zarına nüfuz eder, hızlı bir şekilde mitokondri tarafından alınarak agregatların oluşumuna yol açar. Agregatlar akım sitometrisinde kırmızı (FL-2) kanal içinde ölçülen kırmızı ışık emisyonunu artırır. Canlı hücrelerde FL-1 ve FL-2 kanallarının ikisi de floresan gösterir. FL-2 kanalındaki flüoresans azalması apoptotik değişimin göstergesidir.

TMZ, VIS ve TMZ+ VIS kombinasyonunun kök hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin mitokondri membran potansiyel değişimi aracılığıyla değerlendirilmesi, etken maddelerin ve kombinasyonun IC₅₀ dozu uygulanan hücrelerle JC-1 yöntem protokolü doğrultusunda gerçekleştirilen işlemlerin ardından

BD Accuri C6 akım sitometrisinde (BD Biosciences Pharmingen) 20.000 hücrenin sayımı ile gerçekleştirildi.

JC-1 Yöntem Protokolü:

- 1) 10x JC-1 çalışma tamponu 37°C'lik su banyosunda çözülerek, H₂O ile 1x JC-1 çalışma tamponu hazırlandı.
- 2) Liyofilize durumdaki JC-1 reaktifi tüpüne 125µl DMSO eklenerek JC-1 stok solüsyonu hazırlandı.
- 3) JC-1 stok solüsyonunun 1x JC-1 çalışma tamponu ile 1:100 oranında dilüe edilmesi ile JC-1 çalışma solüsyonu hazırlandı.
- 4) Hücre hatları TMZ, VIS, TMZ+ VIS kombinasyonunun IC₅₀ dozuna 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakıldı.
- 5) Her hücre hattının doz ve kontrol grupları için 5x10⁵ hücre/1ml olacak şekilde santrifüj tüplerine aktarılacak 400g' de 5 dk santrifüjlendi.
- 6) Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- 7) Her gruba 0.5ml JC-1 çalışma solüsyonu pipetlenerek, 37°C'de 15 dk inkübe edildi.
- 8) Her tüpe 2ml 1x çalışma solüsyonu pipetlenerek, 5 dk 400g' de santrifüjlendi, süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- 9) Her tüpe 1 ml 1x çalışma solüsyonu pipetlenerek, 5 dk 400g' de santrifüjlendi, süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- 10) Her tüpe 0,5 ml 1x çalışma solüsyonu pipetlenerek, 5 dk 400g' de santrifüjlendi.
- 11) Akım sitometrisi ile analiz gerçekleştirildi.

3.10. Gen Ekspresyonu Seviyesi Değişimlerinin Belirlenmesi

TMZ + VIS kombinasyonunun IC₅₀ dozunun 24., 48. ve 72. saatlerde insan beyin kanseri kök hücreleri ve insan nöronal kök hücrelerinin gen ekspresyon

seviyelerinde oluşturduğu değişiklikler, doz uygulanmayan kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak analiz edildi.

Etken maddelerin kombinasyonun IC_{50} dozu 24, 48 ve 72 saat boyunca hücrelere uygulandı. Etken madde uygulanmayan hücreler kontrol grupları olarak değerlendirilerek RNeasy Plus Mini Kit aracılığıyla tüm hücre gruplarından total RNA izolasyonları gerçekleştirildi.

Yöntemin çalışma prensibi, RNaz'ların inaktif hale getirilmesi için hücrenin yüksek guanidin-izotiyosiyanat içeren tampon içinde lizize ve homojenize edilmesi, lizatın DNA'yı spesifik olarak uzaklaştıran yüksek tuz içeren kolonundan geçirilmesi, etanol uygulanarak RNA'nın bağlandığı membrandan ayrılması basamaklarından oluşmaktadır.

RNeasy Plus Mini Kit Çalışma Protokolü ve RNA İzolasyonlarının Gerçekleştirilmesi

- 1) RLT Plus tamponuna 100: 1 oranında β -merkaptoetanol eklendi.
- 2) RPE tamponunun 1: 4 oranında absölü etanol ile dilüe edilmesiyle çalışma solüsyonu hazırlandı.
- 3) İnsan beyin kanseri kök hücreleri ve insan nöronal kök hücreleri 24, 48 ve 72 saat süreyle etken maddelerin kombinasyonun IC_{50} dozuna maruz bırakıldı. Uygun prosedürler kullanılarak hücrelerin süspanse edilmesi sağlandı.
- 4) Her hücre hattı ve doz grubu için kullanılacak olan 2×10^6 hücre / ml santrifüj tüplerine alınarak 300 g' de 5 dk santrifüjlendi, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5) Her tüpe 350 μ l RLT Plus tamponu eklendi, kısaca vortekslendi.
- 6) gDNA eleyici dönüş kolonu 2 ml tüp içine yerleştirildi, içerik kolona aktarılarak 8000 g' de 30 s santrifüjlendi.
- 7) gDNA eleyici dönüş kolonu uzaklaştırıldı, 2 ml tüpe 350 μ l %70' lik etanol pipetlendi.

8) RNeasy dönüş kolonu 2 ml tüp içine yerleştirildi, 700 µl içerik kolona aktarılarak 8000 g' de 15 s santrifüjlendi.

9) Alt bölüm uzaklaştırıldı, kolona 500 µl RPE tamponu eklendi, 8000 g' de 15 s santrifüjlendi.

10) Alt bölüm uzaklaştırıldı, kolona 500 µl RPE tamponu eklendi, 8000 g' de 2 dk santrifüjlendi.

11) Kolon yeni bir tüpe yerleştirildi, 8000 g' de 1 dk santrifüjlenerek kolonun kuruması sağlandı.

12) Kolon 1,5 ml ependorf tüpe yerleştirildi, 50 µl RNase içermeyen H₂O eklenerek 8000 g' de 1 dk santrifüjlendi.

İzole edilen RNA Örneklerinin Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

Elde edilen RNA örnekleri NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) cihazı ve programı kullanılarak $A_{260}:A_{280}$ ve $A_{260}:A_{230}$ nanometre dalga boylarındaki absorbanlarda saflık ve miktar özellikleri bakımından değerlendirildi. Ölçümler için her RNA örneğinden 1µl kullanıldı. Ekspresyon analizinde kullanılacak örneklerin $A_{260}:A_{280}$ nm absorban oranı 1.8- 2.0 aralığında, $A_{260}:A_{230}$ nm absorban oranı ise 1.7' den büyük, miktarı ise A_{260} ölçümünde 40 µg / ml' den yüksek olmalıdır.

RT² First Strand Kit Çalışma Protokolü ve Komplementer DNA'ların Sentezlenmesi

Uygun miktar ve saflıktaki RNA örneklerini gen ekspresyonu seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi amacıyla gerçek-zamanlı PCR analizlerinde kullanılabilmek için, her RNA örneğinden RT² First Strand Kit (Qiagen) kullanılarak komplementer DNA sentezlendi.

1) Konsantrasyon değeri 0.5µg RNA olacak şekilde Tablo 3' de gösterilen genomik DNA eliminasyon karışımı uygun koşullarda her bir RNA örneği için hazırlandı.

Tablo 3: Genomik DNA eliminasyon karışımı

Bileşen	Miktar (1 örnek için)
RNA	0.5 mikrogram
GE Tamponu	2 mikrolitre
RNase içermeyen H ₂ O	Değişken
<i>Toplam Hacim</i>	<i>10 mikrolitre</i>

2) Hazırlanan karışımlar 42°C’de 5dk inkübasyona bırakıldı, bu işlemin ardından 1 dk buz üzerinde tutuldu.

3) Ters transkripsiyon karışımı Tablo 4’ te belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 4: Ters transkripsiyon karışımı

Bileşen	Miktar (1 örnek için)
5x BC3 Tamponu	4 mikrolitre
Kontrol P2	1 mikrolitre
RE3 Miks	2 mikrolitre
RNase içermeyen H ₂ O	3 mikrolitre
<i>Toplam Hacim</i>	<i>10 mikrolitre</i>

4) Her örnek için 10µl genomik DNA eliminasyon karışımı içeren tüplere 10µl ters transkripsiyon karışımı pipetlendi.

5) Hazırlanan karışımlar 42°C’de 5dk inkübasyona bırakıldı, bu işlemin ardından 5dk 95°C’de tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

6) Her bir örneği içeren tüpe 91µl RNase içermeyen H₂O eklendi.

Gerçek-Zamanlı PCR Denevlerinin Gerçekleştirilmesi

Gerçek zamanlı PCR sistemleri, konvansiyonel PCR cihazlarının optimal sıcaklık değişim döngüleri sağlama özelliğinin özgün problara tutturulmuş floresan boyalar ile birleştirilmesi prensibine dayanan yüksek hassasiyette ve güvenilirlikte kantitatif gen ekspresyonu değişimi belirleme metodudur. Çok sayıda örneğin eş zamanlı olarak hızlı çalışılabilmesi, kontaminasyon riskini minimuma indirmesi, jel elektroforezine gereksinim duyulmaması gibi çok sayıda avantaj sağlamaktadır.

Gerçekleştirilen tez çalışmaları kapsamında gen ekspresyonları düzeylerinin ve değişimlerinin belirlenmesi amacıyla çift sarmallı yapıdaki DNA'nın küçük oluğuna bağlanarak 497 nm'de absorbans, 520 nm'de ışıma yapan SYBR Green boyası metodu uygulanarak, gerçek zamanlı LightCycler 480 Instrument II PCR cihazı (Roche) kullanılmıştır. Ekspresyon çalışmalarında kullanılan RT² SYBR Green qPCR Mastermiks (Qiagen) PCR tampon çözeltisi, HotStart DNA Taq polimeraz ve modifiye edilmiş SYBR Green içermektedir.

Tasarım PCR profilleri sinyalleşme yolları ya da pek çok hastalığı içeren çok sayıda biyolojik süreçle ilişkili bir dizi genin kombinasyonunu ve iç kontrol sistemlerine sahip kullanışlı ve pratik yöntemlerdir. Tez kapsamında 24, 48 ve 72 saat süreyle TMZ+VIS kombinasyonunun IC₅₀ dozu uygulanarak, RNA izolasyonu ve cDNA sentezleri gerçekleştirilen insan beyin kanseri kök hücreleri, insan nöral kök hücreleri ve doz uygulanmayan kontrol hücre örnekleri, nekroptoz (Qiagen,Cat.No: 330231 PAHS-0141ZA) ve Hedgehog sinyal yolağı (Qiagen,Cat.No: 330231 PAHS-078ZA) ile ilişkilendirilmiş genleri taşıyan 96 kuyucuklu hazır-tasarım iki PCR profili ile değerlendirildi. PCR profilleri 84 tanesi hastalık ya da yolak ile ilişkili genler olmak üzere iç kontrol olarak 5 adet housekeeping gen, 1 adet genomik DNA kontrolü, 3 adet ters transkripsiyon kontrolü ve 3 adet pozitif PCR kontrolü olarak toplam 96 kuyucuk taşımaktadır.

Kullanılan PCR Profillerinin Özellikleri ve Tasarımları

Nekroptoz profili özellikleri ve tasarımı

Profil, nekroptoz ile ilişkili 84 anahtar genin ekspresyonunun belirlenmesini sağlamaktadır. Önceleri nekroz hücre şişmesi ve liziz ile gerçekleşen kazara ve

kontROLSÜZ hücre ölümü olarak düşünülse de nekroptoz (programlı nekroz, onkozis, tip III hücre ölümü) olarak da adlandırılan nekrozun kontrollü hücre ölümü gibi davrandığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Aktive edilmiş ölüm reseptörleri (FAS, TNFRSF1A (TNFR1), TNFRSF10A (TRAIL-R)) ile RIPK1 (RIP1) serin/treonin kinazı sinyalleşme gerçekleştirir. RIPK1, RIPK3 ile etkileşime girer ve artmış reaktif oksijen türleri, artmış sitosolik kalsiyum, ATP tüketiminin artışı gibi mitokondriyal etkilere neden olan PARP1'i aktive eder. Profil, programlanmış nekroz, anahtar nekrotik aktivatörlerin aşağı-akımında bulunan potansiyel nekrotik genleri, ölüm reseptör sinyal yolağı ilişkili genleri, ROS üretimi veya mitokondriyal aktivite ile ilişkili genleri içermektedir ve nekrotik hücre ölüm mekanizmasını aydınlatmak üzere dizayn edilmiştir.

Tablo 5: Nekroptoz profili tasarımı

AIFM1 A01	ATP6V1G2 A02	BAX A03	BID A04	BIRC3 A05	BMF A06	BNIP3L A07	C1orf159 A08	CAPN1 A09	CAPN2 A10	CAPN3 A11	CAPN5 A12
CAPN6 B01	CAPN7 B02	CAPN51 B03	CASP8AP2 B04	CCDC103 B05	CD40 B06	COMMD4 B07	CYBB B08	CYLD B09	DEFB1 B10	DENND4A B11	DPYSL4 B12
EDA2R C01	EIF5B C02	FADD C03	FAF1 C04	FAS C05	FASLG C06	FEM1B C07	FOXI1 C08	FUS C09	GALNT5 C10	GLUD1 C11	GLUL C12
GRB2 D01	HSPBAP1 D02	IKBK D03	JPH3 D04	KCNIP1 D05	MADD D06	MAG D07	MGEA5 D08	MYD88 D09	NFKB1 D10	NGF D11	NGFR D12
NGFRAP1 E01	NOX1 E02	NOX4 E03	OR10J3 E04	PARP1 E05	PARP2 E06	PIDD E07	PPIA E08	PPID E09	PVR E10	PYGL E11	RAB25 E12
RIPK1 F01	RIPK2 F02	RIPK3 F03	S100A7A F04	SLC25A4 F05	SP1 F06	SPATA2 F07	SYCP2 F08	TMEM123 F09	TMEM57 F10	TNF F11	TNFRSF10A F12
TNFRSF14 G01	TNFRSF17 G02	TNFRSF1A G03	TNFRSF1B G04	TNFRSF25 G05	TNFRSF4 G06	TNFRSF8 G07	TNFRSF10 G08	TNFRSF15 G09	TRADD G10	TRAF2 G11	TXNL4B G12
ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT1 H04	RPLP0 H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Tablo 6: Nekroptoz profili genleri

Pozisyon	GeneBank	Sembol	Tanım
A01	NM_004208	AIFM1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion associated 1
A02	NM_130463	ATP6V1G2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G2
A03	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein
A04	NM_001196	BID	BH3 interacting domain death agonist
A05	NM_001165	BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
A06	NM_033503	BMF	Bcl2 modifying factor
A07	NM_004331	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like

A08	NM_017891	C1orf159	Chromosome 1 open reading frame 159
A09	NM_005186	CAPN1	Calpain 1, (mu/I) large subunit
A10	NM_001748	CAPN2	Calpain 2, (m/II) large subunit
A11	NM_173090	CAPN3	Calpain 3, (p94)
A12	NM_004055	CAPN5	Calpain 5
B01	NM_014289	CAPN6	Calpain 6
B02	NM_014296	CAPN7	Calpain 7
B03	NM_001749	CAPNS1	Calpain, small subunit 1
B04	NM_012115	CASP8AP2	Caspase 8 associated protein 2
B05	NM_213607	CCDC103	Coiled-coil domain containing 103
B06	NM_001250	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
B07	NM_017828	COMMD4	COMM domain containing 4
B08	NM_000397	CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide
B09	NM_015247	CYLD	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)
B10	NM_005218	DEFB1	Defensin, beta 1
B11	NM_005848	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A
B12	NM_006426	DPYSL4	Dihydropyrimidinase-like 4
C01	NM_021783	EDA2R	Ectodysplasin A2 receptor
C02	NM_015904	EIF5B	Eukaryotic translation initiation factor 5B
C03	NM_003824	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
C04	NM_007051	FAF1	Fas (TNFRSF6) associated factor 1
C05	NM_000043	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
C06	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
C07	NM_015322	FEM1B	Fem-1 homolog b (C. elegans)
C08	NM_012188	FOXI1	Forkhead box I1
C09	NM_004960	FUS	Fused in sarcoma
C10	NM_014568	GALNT5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5)
C11	NM_005271	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1

C12	NM_002065	GLUL	Glutamate-ammonia ligase
D01	NM_002086	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
D02	NM_024610	HSPBAP1	HSPB (heat shock 27kDa) associated protein 1
D03	NM_003639	IKBKG	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
D04	NM_020655	JPH3	Junctophilin 3
D05	NM_014592	KCNIP1	Kv channel interacting protein 1
D06	NM_003682	MADD	MAP-kinase activating death domain
D07	NM_002361	MAG	Myelin associated glycoprotein
D08	NM_012215	MGEA5	Meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)
D09	NM_002468	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
D10	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
D11	NM_002506	NGF	Nerve growth factor (beta polypeptide)
D12	NM_002507	NGFR	Nerve growth factor receptor
E01	NM_014380	NGFRAP1	Nerve growth factor receptor (TNFRSF16)associated protein1
E02	NM_007052	NOX1	NADPH oxidase 1
E03	NM_016931	NOX4	NADPH oxidase 4
E04	NM_0010044	OR10J3	Olfactory receptor, family 10, subfamily J, member 3
E05	NM_001618	PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
E06	NM_005484	PARP2	Poly (ADP-ribose) polymerase 2
E07	NM_145886	PIDD	P53-induced death domain protein
E08	NM_021130	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
E09	NM_005038	PPID	Peptidylprolyl isomerase D
E10	NM_006505	PVR	Poliovirus receptor
E11	NM_002863	PYGL	Phosphorylase, glycogen, liver
E12	NM_020387	RAB25	RAB25, member RAS oncogene family
F01	NM_003804	RIPK1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
F02	NM_003821	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
F03	NM_006871	RIPK3	Receptor-interacting serine-threonine kinase 3

F04	NM_176823	S100A7A	S100 calcium binding protein A7A
F05	NM_001151	SLC25A4	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4
F06	NM_138473	SP1	Sp1 transcription factor
F07	NM_006038	SPATA2	Spermatogenesis associated 2
F08	NM_014258	SYCP2	Synaptonemal complex protein 2
F09	NM_052932	TMEM123	Transmembrane protein 123
F10	NM_018202	TMEM57	Transmembrane protein 57
F11	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor
F12	NM_003844	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
G01	NM_003820	TNFRSF14	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14
G02	NM_001192	TNFRSF17	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
G03	NM_001065	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
G04	NM_001066	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
G05	NM_003790	TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
G06	NM_003327	TNFRSF4	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
G07	NM_001243	TNFRSF8	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
G08	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G09	NM_005118	TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15
G10	NM_003789	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
G11	NM_021138	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
G12	NM_017853	TXNL4B	Thioredoxin-like 4B
H01	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	SA_00105	HGDC	İnsan genomik DNA kontaminasyonu
H07	SA_00104	RTC	Ters transkripsiyon kontrolü

H08	SA_00104	RTC	Ters transkripsiyon kontrolü
H09	SA_00104	RTC	Ters transkripsiyon kontrolü
H10	SA_00103	PPC	Pozitif PCR kontrolü
H11	SA_00103	PPC	Pozitif PCR kontrolü
H12	SA_00103	PPC	Pozitif PCR kontrolü

Hedgehog sinyal yolağı profili özellikleri ve tasarımı

Profil, Hh sinyal yolağı ile ilişkili 84 anahtar genin ekspresyonunun belirlenmesini sağlamaktadır. Aile üyelerinden Shh kalp, akciğer, kas ve sinir sistemi gibi çeşitli organların oluşum ve gelişim paterninde görev alan ve en iyi bilinen morfojendir. Bununla birlikte Hh sinyal yolağı insanlarda birçok kanser türünün gelişmesinde de görev almaktadır. Profil Hh ailesi üyelerini, reseptörlerini ve diğer ilişkili proteinleri, ayrıca hücre farklılaşması ve çok hücreli organizma gelişiminde yer alan genleri içermektedir.

Tablo 7: Hedgehog sinyal yolağı profili tasarımı

BMP2 A01	BMP4 A02	BMP5 A03	BMP6 A04	BMP7 A05	BMP8A A06	BMP8B A07	BTRC A08	C18orf8 A09	CEP76 A10	PTCHD4 A11	CDON A12
CRIM1 B01	CSNK1A1 B02	CSNK1A1L B03	CSNK1D B04	CSNK1E B05	CSNK1G1 B06	CSNK1G2 B07	CTNNA1 B08	DHH B09	ERBB4 B10	FBXW11 B11	FGF9 B12
FGFR3 C01	FKBP8 C02	FOXE1 C03	GAS1 C04	GLI1 C05	GLI2 C06	GLI3 C07	GREM1 C08	GSK3B C09	HHAT C10	HHIP C11	IFT52 C12
IHH D01	KCTD11 D02	LRP2 D03	MAPK1 D04	MTSS1 D05	NPC1 D06	NPC1L1 D07	NUMB D08	OTX2 D09	PRKACA D10	PRKACB D11	PRKACG D12
PRKX E01	PRKY E02	PTCH1 E03	PTCH2 E04	PTCHD1 E05	PTCHD2 E06	PTCHD3 E07	RAB23 E08	SFRP1 E09	SHH E10	SHH E11	SMO E12
STK36 F01	SUFU F02	WIF1 F03	WNT1 F04	WNT10A F05	WNT10B F06	WNT11 F07	WNT16 F08	WNT2 F09	WNT2B F10	WNT3 F11	WNT3A F12
WNT4 G01	WNT5A G02	WNT5B G03	WNT6 G04	WNT7A G05	WNT7B G06	WNT8A G07	WNT8B G08	WNT9A G09	WNT9B G10	ZIC1 G11	ZIC2 G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13A H03	GAPDH H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Tablo 8: Hedgehog sinyal yolağı profili genleri

Pozisyon	GeneBank	Sembol	Tanım
A01	NM_001200	BMP2	Bone morphogenetic protein 2
A02	NM_130851	BMP4	Bone morphogenetic protein 4
A03	NM_021073	BMP5	Bone morphogenetic protein 5

A04	NM_001718	BMP6	Bone morphogenetic protein 6
A05	NM_001719	BMP7	Bone morphogenetic protein 7
A06	NM_181809	BMP8A	Bone morphogenetic protein 8a
A07	NM_001720	BMP8B	Bone morphogenetic protein 8b
A08	NM_033637	BTRC	Beta-transducin repeat containing
A09	NM_013326	C18orf8	Chromosome 18 open reading frame 8
A10	NM_024899	CEP76	Centrosomal protein 76kDa
A11	NM_001013732	PTCHD4	Chromosome 6 open reading frame 138
A12	NM_016952	CDON	Cdon homolog (mouse)
B01	NM_016441	CRIM1	Cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)
B02	NM_001892	CSNK1A1	Casein kinase 1, alpha 1
B03	NM_145203	CSNK1A1L	Casein kinase 1, alpha 1-like
B04	NM_001893	CSNK1D	Casein kinase 1, delta
B05	NM_001894	CSNK1E	Casein kinase 1, epsilon
B06	NM_022048	CSNK1G1	Casein kinase 1, gamma 1
B07	NM_001319	CSNK1G2	Casein kinase 1, gamma 2
B08	NM_001904	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
B09	NM_021044	DHH	Desert hedgehog
B10	NM_005235	ERBB4	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
B11	NM_012300	FBXW11	F-box and WD repeat domain containing 11
B12	NM_002010	FGF9	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)
C01	NM_000142	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
C02	NM_012181	FKBP8	FK506 binding protein 8, 38kDa
C03	NM_004473	FOXE1	Forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)
C04	NM_002048	GAS1	Growth arrest-specific 1
C05	NM_005269	GLI1	GLI family zinc finger 1
C06	NM_005270	GLI2	GLI family zinc finger 2
C07	NM_000168	GLI3	GLI family zinc finger 3

C08	NM_013372	GREM1	Gremlin 1
C09	NM_002093	GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
C10	NM_018194	HHAT	Hedgehog acyltransferase
C11	NM_022475	HHIP	Hedgehog interacting protein
C12	NM_016004	IFT52	Intraflagellar transport 52 homolog (Chlamydomonas)
D01	NM_002181	IHH	Indian hedgehog
D02	NM_001002914	KCTD11	Potassium channel tetramerisation domain containing 11
D03	NM_004525	LRP2	Low density lipoprotein receptor-related protein 2
D04	NM_002745	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
D05	NM_014751	MTSS1	Metastasis suppressor 1
D06	NM_000271	NPC1	Niemann-Pick disease, type C1
D07	NM_013389	NPC1L1	NPC1 (Niemann-Pick disease, type C1, gene)-like 1
D08	NM_003744	NUMB	Numb homolog (Drosophila)
D09	NM_021728	OTX2	Orthodenticle homeobox 2
D10	NM_002730	PRKACA	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha
D11	NM_182948	PRKACB	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta
D12	NM_002732	PRKACG	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma
E01	NM_005044	PRKX	Protein kinase, X-linked
E02	NR_028062	PRKY	Protein kinase, Y-linked
E03	NM_000264	PTCH1	Patched 1
E04	NM_003738	PTCH2	Patched 2
E05	NM_173495	PTCHD1	Patched domain containing 1
E06	NM_020780	PTCHD2	Patched domain containing 2
E07	NM_001034842	PTCHD3	Patched domain containing 3
E08	NM_183227	RAB23	RAB23, member RAS oncogene family
E09	NM_003012	SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
E10	NM_000193	SHH	Sonic hedgehog
E11	NM_003031	SIAH1	Seven in absentia homolog 1 (Drosophila)
E12	NM_005631	SMO	Smoothened, frizzled family receptor

F01	NM_015690	STK36	Serine/threonine kinase 36
F02	NM_016169	SUFU	Suppressor of fused homolog (Drosophila)
F03	NM_007191	WIF1	WNT inhibitory factor 1
F04	NM_005430	WNT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1
F05	NM_025216	WNT10A	Wingless-type MMTV integration site family, member 10A
F06	NM_003394	WNT10B	Wingless-type MMTV integration site family, member 10B
F07	NM_004626	WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11
F08	NM_057168	WNT16	Wingless-type MMTV integration site family, member 16
F09	NM_003391	WNT2	Wingless-type MMTV integration site family member 2
F10	NM_004185	WNT2B	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B
F11	NM_030753	WNT3	Wingless-type MMTV integration site family, member 3
F12	NM_033131	WNT3A	Wingless-type MMTV integration site family, member 3A
G01	NM_030761	WNT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 4
G02	NM_003392	WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
G03	NM_032642	WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
G04	NM_006522	WNT6	Wingless-type MMTV integration site family, member 6
G05	NM_004625	WNT7A	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A
G06	NM_058238	WNT7B	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B
G07	NM_058244	WNT8A	Wingless-type MMTV integration site family, member 8A
G08	NM_003393	WNT8B	Wingless-type MMTV integration site family, member 8B
G09	NM_003395	WNT9A	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A
G10	NM_003396	WNT9B	Wingless-type MMTV integration site family, member 9B
G11	NM_003412	ZIC1	Zic family member 1
G12	NM_007129	ZIC2	Zic family member 2
H01	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H02	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H03	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a
H04	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H05	NM_001101	ACTB	Actin, beta

H06	SA_00105	HGDC	İnsan genomik DNA kontaminasyonu
H07	SA_00104	RTC	Ters transkripsiyon kontrolü
H08	SA_00104	RTC	Ters transkripsiyon kontrolü
H09	SA_00104	RTC	Ters transkripsiyon kontrolü
H10	SA_00103	PPC	Pozitif PCR kontrolü
H11	SA_00103	PPC	Pozitif PCR kontrolü
H12	SA_00103	PPC	Pozitif PCR kontrolü

Gerçek zamanlı PCR Protokolü

- 1) RT² SYBR Green mastermiksini tamamen çözünmesi beklendi ve vortekslendi, 10-15 sn santrifüjlendi.
- 2) PCR için karışım Tablo 9’ da gösterilen şekilde hazırlandı.

Tablo 9: PCR karışımı

Bileşen	Miktar (1 örnek için)
RT² SYBR Green Mastermiks	1350 mikrolitre
cDNA sentez reaksiyonu	102 mikrolitre
RNase içermeyen H₂O	1248 mikrolitre
<i>Toplam Hacim</i>	<i>2700 mikrolitre</i>

- 3) Karışım santrifüjlendi, 8 kanallı çoklu pipet kullanılarak yükleme rezervuarından her kuyucuğa 25µl olacak şekilde pipetlendi.
- 4) Profiller ince, optik, filmle sıkıca yapıştırıldı, oda sıcaklığında 1 dk 1000 g’ de santrifüjlendi.
- 5) Profiller LightCycler 480 cihazında Tablo 10’ da verilen programla değişim oranı 1.5°C/ s ayarlanarak çalıştırıldı.

Tablo 10: PCR programı alıştırma protokolü

Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık	Yorum
1	10 dakika	95°C	Hot Start DNA Taq polimeaz aktivasyonu
45	15 saniye	95°C	Floresan verilerinin elde edilmesi
	1 dakika	60°C	

6) Verilerin kantitasyonu LightCycler 480 Quantification programı (kantifikasyon yazılımı) kullanılarak her bir kuyucuk için eşik döngüsü (CT) değeri “second derivate max” seçeneği ile hesaplandı.

7) Analiz $\Delta\Delta CT$ yöntemi ile “SABiosciences PCR Array Data Analysis” sistemi üzerinden gerçekleştirildi.

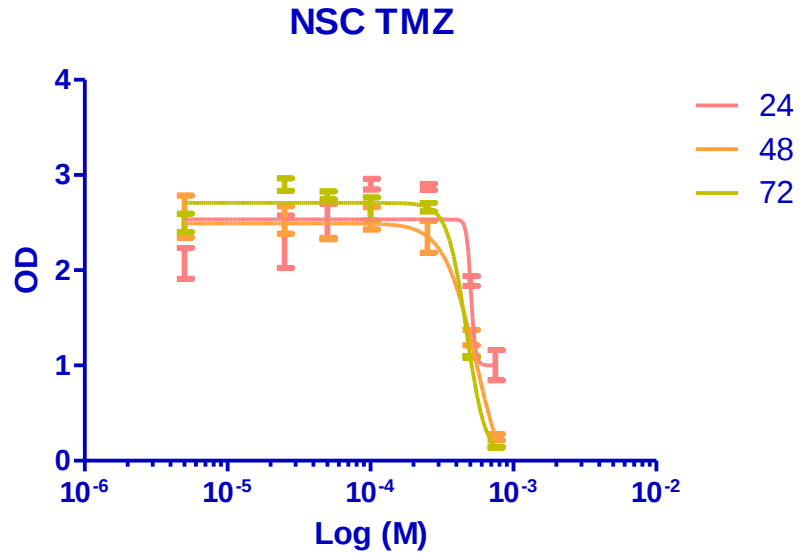
4. BULGULAR

4.1. Etken Maddelerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

WST-1 ile sitotoksosite analizi, insan nöronal kök hücre hattı ve insan beyin kanseri kök hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir. Farklı dilüsyon oranlarında TMZ, VIS, TMZ + VIS kombinasyonu hücrelere verilerek sitotoksisiteleri değerlendirilmiştir. Etken madde içermeyen hücreler kontrol grubu olarak alınmıştır. Tüm sitotoksosite deneylerine insan nöronal kök hücre hattı ve insan beyin kanseri kök hücre hattı için 20×10^3 hücre / ml olacak şekilde başlanılmış ve 3 replikalı olarak çalışılmıştır. Etken maddelerin hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonları olarak tanımlanan IC_{50} dozları belirlenmiştir.

Temozolomidin İnsan Nöronal Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

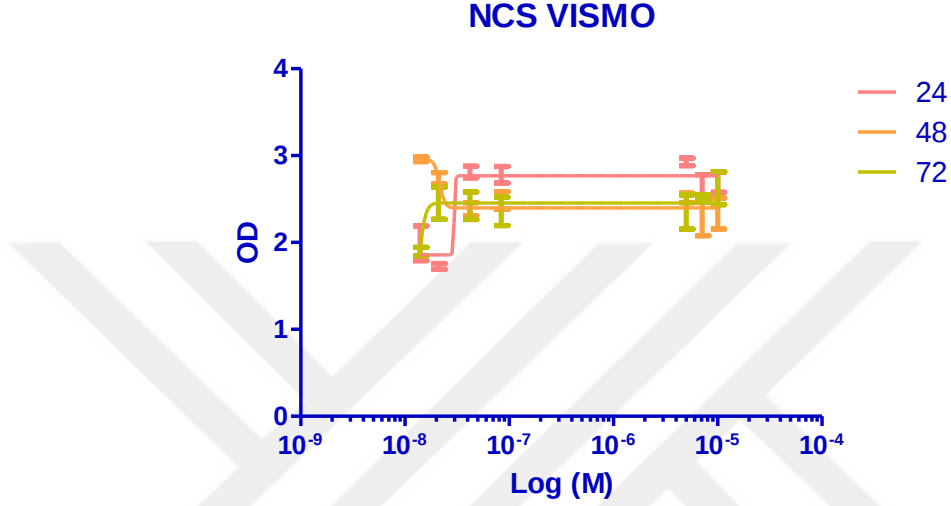
TMZ' in IC_{50} değerinin belirlenmesi için 2,5 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M'lık dilüsyonları uygulanan hücreler 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. TMZ' in IC_{50} değeri nöronal kök hücre için 72. saatte 500 μ M olarak bulundu.



Grafik 1: İnsan Nöronal Kök Hücrelerinde Temozolomidin IC_{50} dozu

Vismodegibin İnsan Nöronal Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

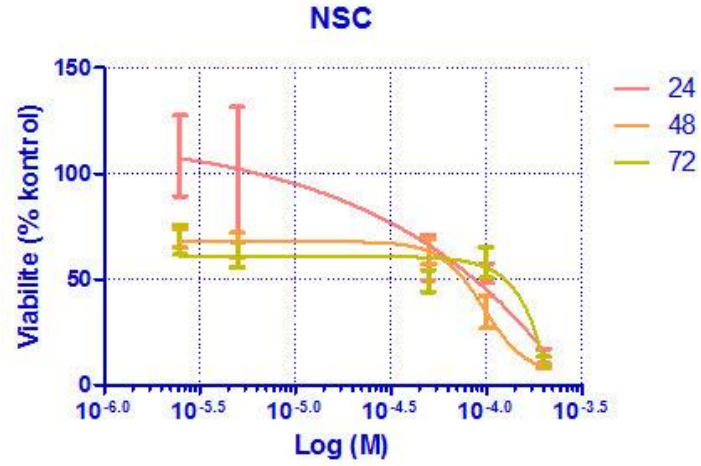
VIS' in IC₅₀ değerinin belirlenmesi için 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50µM, 100 µM, 200 µM'lık dilüsyonları uygulanan hücreler 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. VIS' in IC₅₀ değeri nöronal kök hücre için 72.saatte 42 µM olarak bulundu.



Grafik 2: İnsan Nöronal Kök Hücrelerinde Vismodegibin IC₅₀ dozu

Temozolomid + Vismodegibin Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

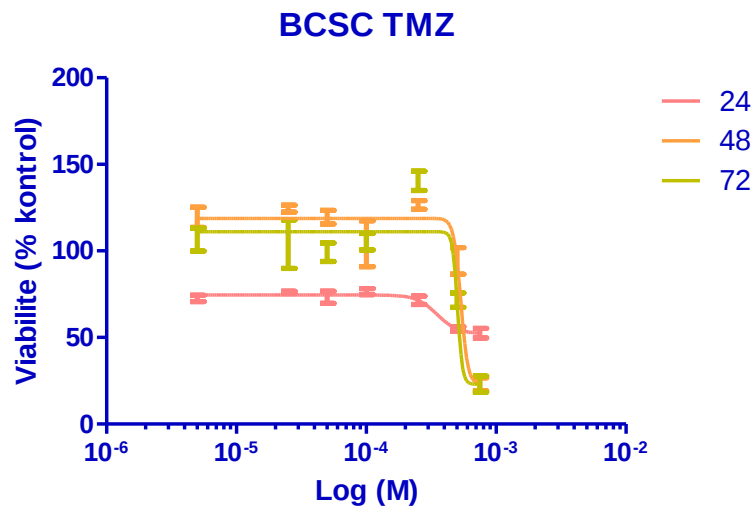
TMZ + VIS kombinasyonunun sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde, VIS ve TMZ' in çeşitli oranlarda kombinasyonlarını içeren karışımlar hazırlandı, bu dilüsyonların insan nöronal kök hücreleri üzerindeki etkileri 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi.



Grafik 3: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücrelerin Canlılığı Üzerine Etkisi

Temozolomidin İnsan Beyin Kanseri Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

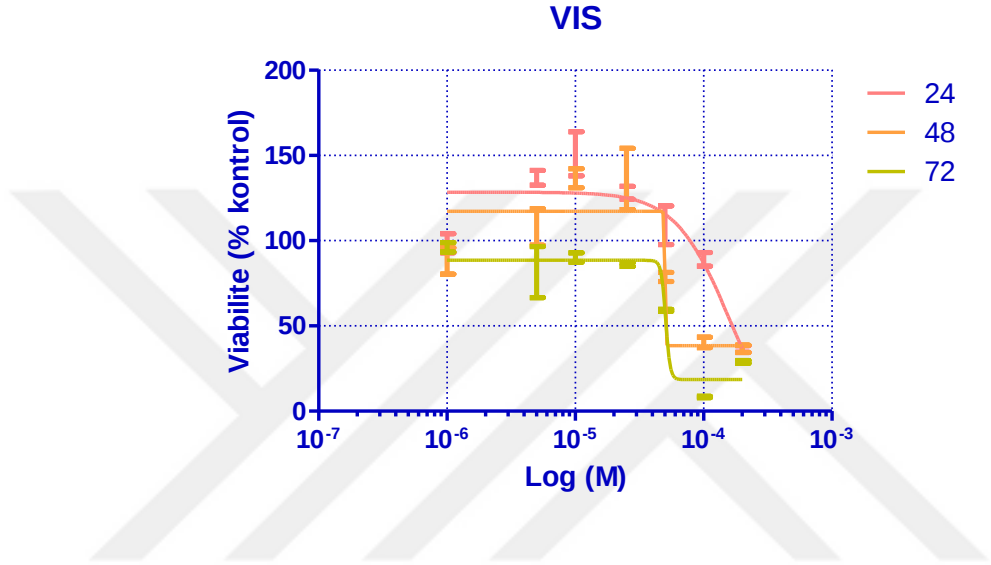
TMZ' in IC₅₀ değerinin belirlenmesi için 2,5 µM, 5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM'lık dilüsyonları uygulanan hücreler 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. TMZ' in IC₅₀ değeri beyin kanseri kök hücreleri için 72. saatte 163 µM olarak bulundu.



Grafik 4: Beyin Kanseri Kök Hücrelerinde Temozolomidin IC₅₀ dozu

Vismodegibin İnsan Beyin Kanseri Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

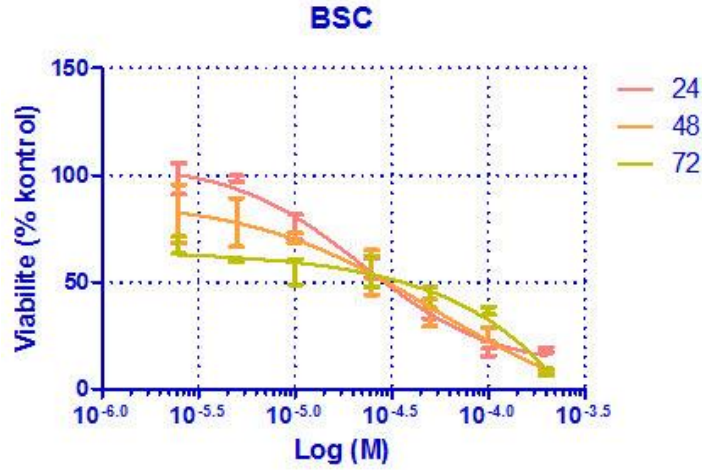
VIS' in IC₅₀ değerinin belirlenmesi için 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50µM, 100 µM, 200 µM'lık dilüsyonları uygulanan hücreler 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. VIS' in IC₅₀ değeri beyin kanseri kök hücre hattı için 72.saatte 39 µM olarak bulundu.



Grafik 5: Beyin Kanseri Kök Hücrelerinde Vismodegibin IC₅₀ dozu

Temozolomid + Vismodegibin Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

TMZ + VIS kombinasyonunun sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde, VIS ve TMZ' in çeşitli oranlarda kombinasyonlarını içeren karışımlar hazırlandı, bu dilüsyonların insan nöronal kök hücreleri üzerindeki etkileri 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi.



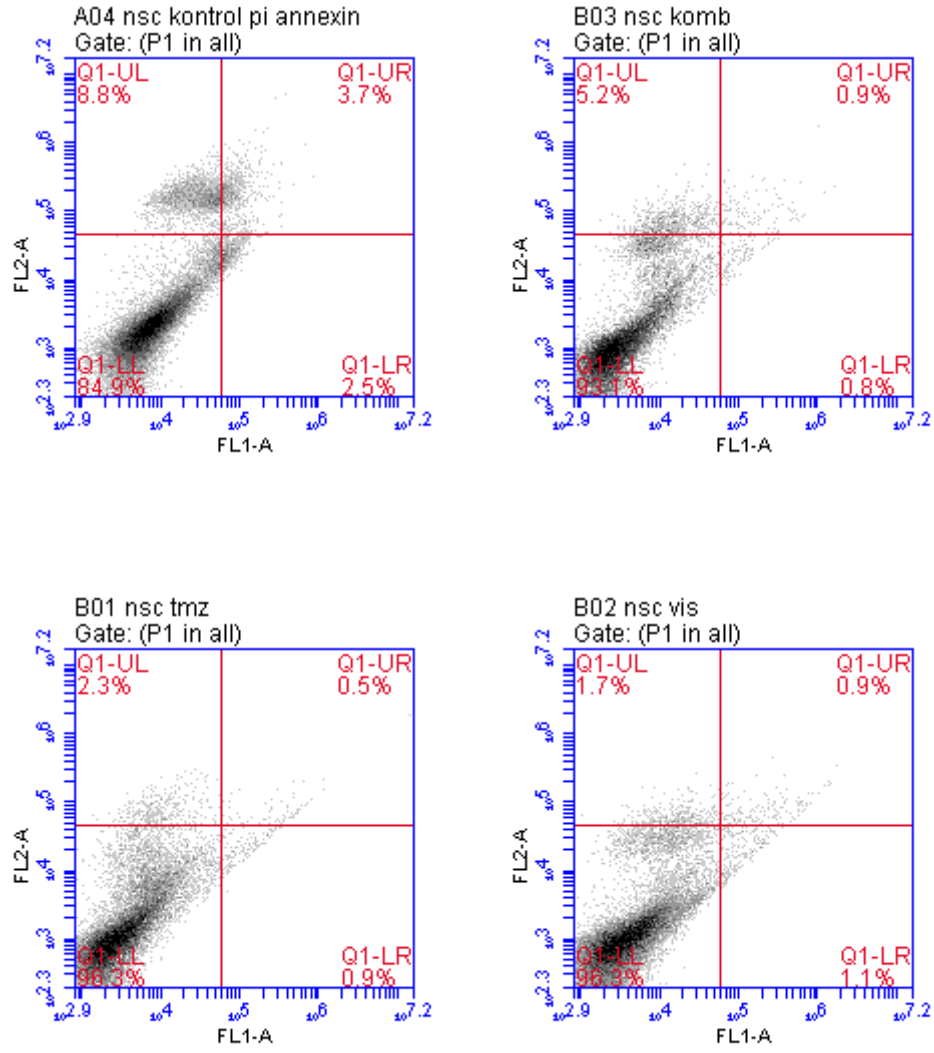
Grafik 6: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

4.2. Etken Maddelerin Belirtilen Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Etken maddelerin IC₅₀ dozlarının belirtilen hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri 72. saatte değerlendirildi. Tüm apoptoz deneylerine hücre sayısı 1 ml'de 1x10⁶ hücre olacak şekilde başlandı. Etken madde ile muamele edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak kabul edilerek kontrol grubuna göre etken maddelerin oluşturduğu apoptoz artışı belirlendi. Apoptoz analizleri Anneksin V ve JC-1 Mitoprobe ile 2 replikalı olarak gerçekleştirildi.

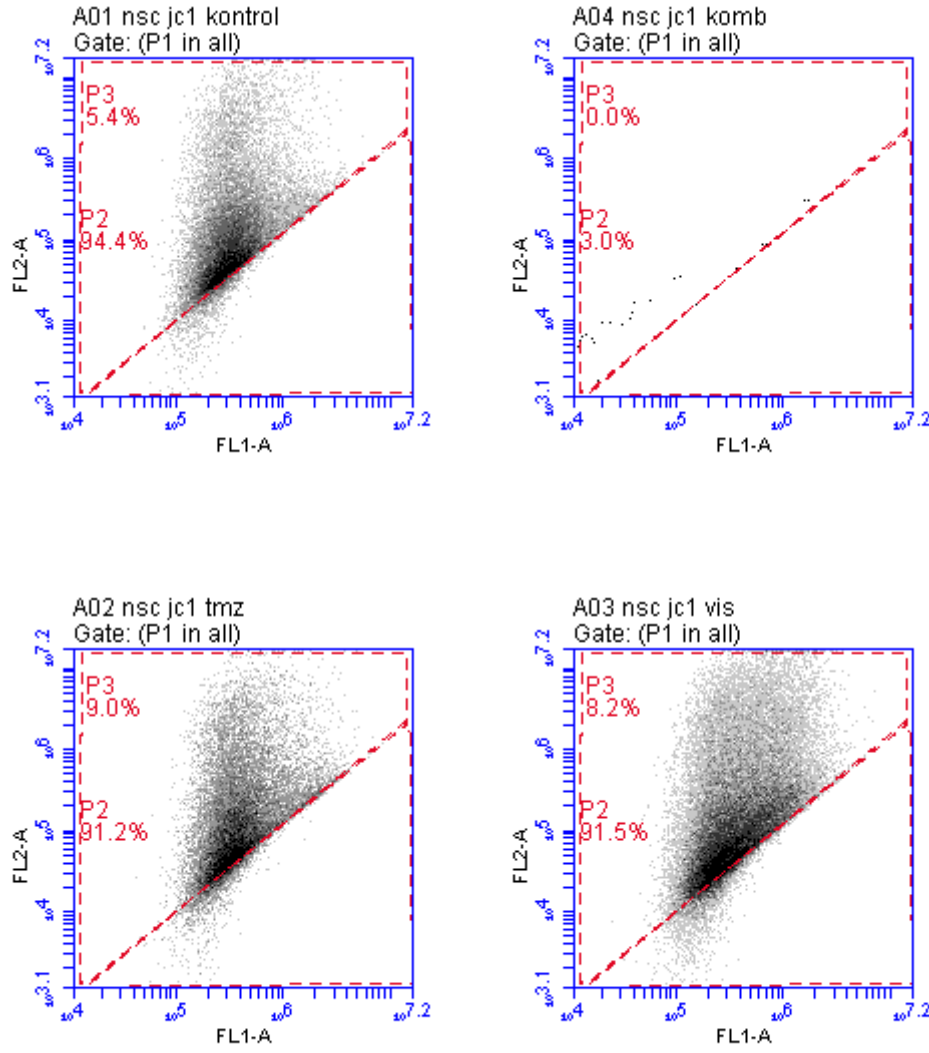
Temozolomid, Vismodegib ve Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri

Anneksin V analizi kullanılarak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TMZ, VIS ve TMZ+VIS kombinasyonunun 72 saat boyunca uygulanmasının insan nöronal kök hücrelerinde apoptozun indüklenmesine neden olmadığı belirlendi (Grafik 7).



Grafik 7: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Anneksin V Yöntemi İle Değerlendirilmesi

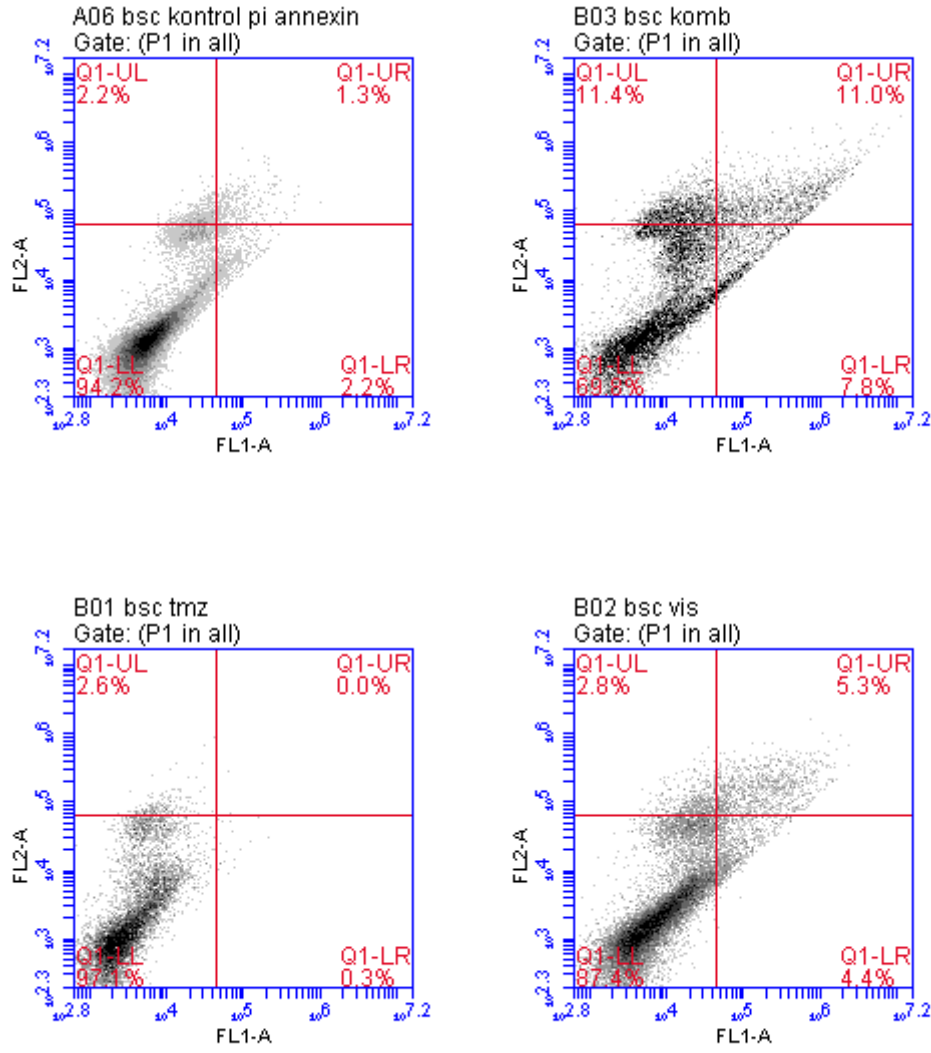
JC-1 analizi kullanılarak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TMZ, VIS ve TMZ+VIS kombinasyonunun 72 saat boyunca uygulanmasının, Anneksin V testinin sonuçlarıyla korele şekilde, insan nöronal kök hücrelerinde apoptozun indüklenmesine neden olmadığı belirlendi (Grafik 8).



Grafik 8: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin JC-1 Yöntemi İle Değerlendirilmesi

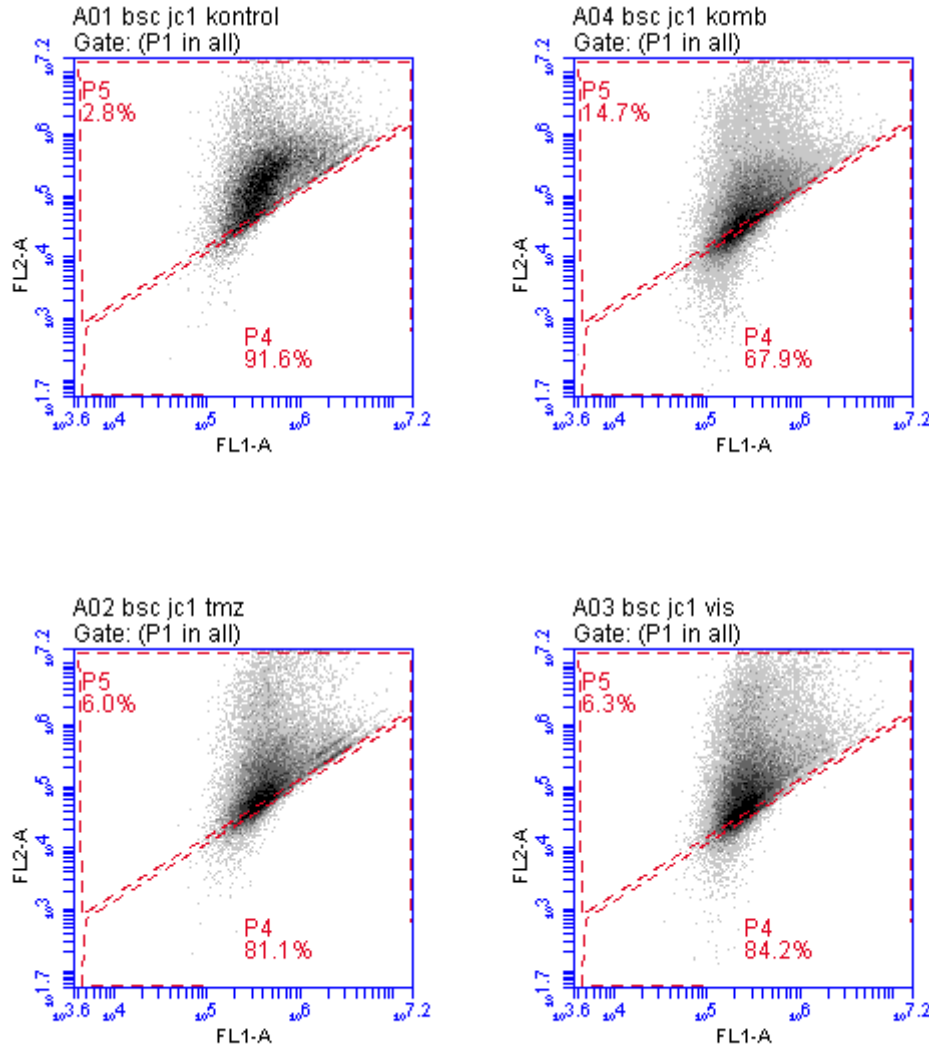
Temozolomid, Vismodegib ve Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri

Anneksin V analizi kullanılarak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 72 saat boyunca insan beyin kanseri kök hücrelerine uygulanan TMZ apoptozu indüklememekle birlikte; VIS ve TMZ+VIS kombinasyonunun kontrole göre sırasıyla 1.94 ve 7.52 kat apoptozu indüklediği bulundu (Grafik 9).



Grafik 9: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun Beyin Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Anneksin V Yöntemi İle Değerlendirilmesi

JC-1 analizi kullanılarak, 72 saat boyunca TMZ, VIS ve TMZ+VIS kombinasyonu uygulanması, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, Anneksin V yöntemi ile elde edilen sonuçlarla aynı doğrultuda, sırasıyla 2.14, 2.25, 5.25 kat apoptoz indüklenmesine neden olduğu belirlendi (Grafik 10).



Grafik 10: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun Beyin Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin JC-1 Yöntemi İle Değerlendirilmesi

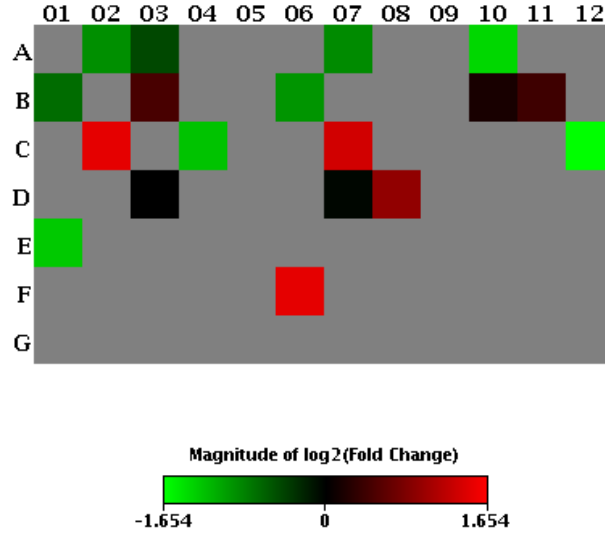
4.3. Etken Maddelerin Kombinasyonunun Hücre Hatları Üzerinde Oluşturduğu Gen Ekspresyon Değişimleri

TMZ + VIS kombinasyonunun 72. saatte, insan beyin kanseri kök hücreleri ve insan nöronal kök hücrelerinin gen ekspresyon seviyelerinde oluşturduğu değişiklikler, doz uygulanmayan kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak analiz edildi.

Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücre Hattı Üzerinde Oluşturduğu Gen Ekspresyon Değişimleri

Nekrotoz Gen Değişimleri

72 saat boyunca TMZ+VIS kombinasyonu uygulanan insan nöronal kök hücrelerinde, doz uygulanmayan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında nekrotoz ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmediği belirlendi.



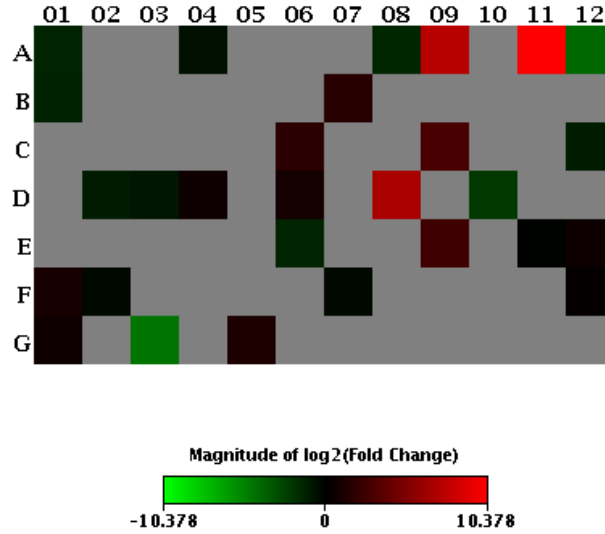
Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	AIFM1 -1.96	ATP6V1G2 -1.91	BAX -1.38	BID -1.96	BIRC3 -1.96	BMF -1.96	BNIP3L -1.88	C1orf159 -1.96	CAPN1 -1.96	CAPN2 -2.65	CAPN3 -1.96	CAPN5 -1.96
B	CAPN6 -1.62	CAPN7 -1.96	CAPNS1 1.38	CASP8AP2 -1.96	CCDC103 -1.96	CD40 -1.96	COMMD4 -1.96	CYBB -1.96	CYLD -1.96	DEFB1 1.12	DENND4A 1.32	DPYSL4 -1.96
C	EDA2R -1.96	EIF5B 2.81	FADD -1.96	FAF1 -2.42	FAS -1.96	FASLG -1.96	FEM1B 2.57	FOXI1 -1.96	FUS -1.96	GALNT5 -1.96	GLUD1 -1.96	GLUL -3.15
D	GRB2 -1.96	HSPBAP1 -1.96	IKBKG -1.00	JPH3 -1.96	KCNIP1 -1.96	MADD -1.96	MAG -1.02	MGEA5 1.92	MYD88 -1.96	NFKB1 -1.96	NGF -1.96	NGFR -1.96
E	NGFRAP1 -2.48	NOX1 -1.96	NOX4 -1.96	OR10J3 -1.96	PARP1 -1.96	PARP2 -1.96	PIDD -1.96	PPIA -1.96	PPID -1.96	PVR -1.96	PYGL -1.96	RAB25 -1.96
F	RIPK1 -1.96	RIPK2 -1.96	RIPK3 -1.96	S100A7A -1.96	SLC25A4 -1.96	SP1 2.82	SPATA2 -1.96	SYCP2 -1.96	TMEM123 -1.96	TMEM57 -1.96	TNF -1.96	TNFRSF10A -1.96
G	TNFRSF1 -1.96	TNFRSF1 -1.96	TNFRSF1 -1.96	TNFRSF1 -1.96	TNFRSF2 -1.96	TNFRSF -1.96	TNFRSF -1.96	TNFSF1 -1.96	TNFSF15 -1.96	TRADD -1.96	TRAF2 -1.96	TXNL4B -1.96

	4	7	A	B	5	4	8	0	-1.96	-1.96	-1.96	-1.96
	-1.96	-1.96	-1.96	-1.96	-1.96	-1.96	-1.96	-1.96				

Grafik 11: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücrelerinin Nekroptoz İle İlişkili Genleri Üzerindeki Etkisini Gösteren Isı Haritası

Hedgehog Gen Değişimleri

72 saat boyunca TMZ+VIS kombinasyonu uygulanan insan nöronal kök hücrelerinde, doz uygulanmayan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Hh sinyal yolağı ile ilişkili BTRC, CSNK1A1, IFT52, NUMB, SMO genlerinin ekspresyon düzeylerinde sırasıyla 7,45, 10,37, 2,96, 6,95, 2,49 kat artış; CSNK1E, WNT5B genlerinin ekspresyon düzeylerinde ise sırasıyla 4,68, 4,19 kat azalma meydana geldiği belirlendi.



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	BCL2	BMP2	BMP4	BMP5	BMP6	BMP7	BMP8B	BOC	BTRC	CDON	CSNK1A1	CSNK1E
	-2.80	-2.71	-2.71	-1.56	-2.71	-2.71	-2.71	-2.92	175.17	-2.71	1330.59	-18.36
B	CTNNB1	DHH	DISP1	DISP2	ERBB4	FAT4	FBXW11	FGF9	FGFR3	FKBP8	FOXE1	FRMD6
	-2.56	-2.71	-2.71	-2.71	-2.71	-2.71	2.95	-2.71	-2.71	-2.71	-2.71	-2.71
C	GAS1	GLI1	GLI2	GLI3	GREM1	GSK3B	HHAT	HHIP	IFT52	IHH	KCTD11	LATS1
	-2.71	-2.71	-2.71	-2.71	-2.71	3.31	-2.71	-2.71	7.79	-2.71	-2.71	-2.19

D	LATS2 -2.71	LRP2 -2.18	MAPK1 -1.87	MOB1B 1.48	MTSS1 -2.71	NF2 1.71	NPC1 -2.71	NUMB 124.35	OTX2 -2.71	PRKACA -4.94	PRKACB -2.71	PTCH1 -2.71
E	PTCH2 -2.71	PTCHD1 -2.71	PTCHD2 -2.71	PTCHD3 -2.71	RAB23 -2.71	RUNX2 -2.75	SFRP1 -2.71	SHH -2.71	SMO 5.65	STK3 -2.71	STK36 -1.04	SUFU 1.38
F	TP53 2.01	VEGFA -1.29	WIF1 -2.71	WNT1 -2.71	WNT10A -2.71	WNT10B -2.71	WNT11 -1.29	WNT16 -2.71	WNT2 -2.71	WNT2B -2.71	WNT3 -2.71	WNT3A 1.13
G	WNT4 1.51	WNT5A -2.71	WNT5B -25.67	WNT6 -2.71	WNT7A 2.23	WNT7B -2.71	WNT8A -2.71	WNT8B -2.71	WNT9A -2.71	WNT9B -2.71	ZIC1 -2.71	ZIC2 -2.71

Grafik 12: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücrelerinin Hedgehog Yolağı İle İlişkili Genleri Üzerindeki Etkisini Gösteren Isı Haritası

Tablo 11: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Nöronal Kök Hücrelerinin Hedgehog Gen Ekspresyonlarına Etkisi

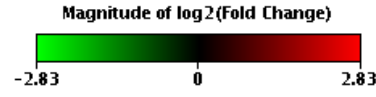
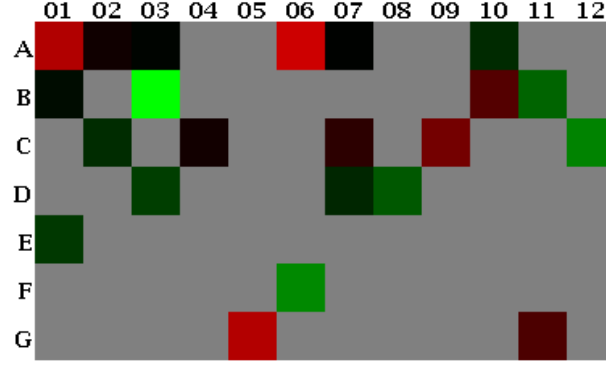
Gen	Kat Değişimi (log 2)	p değeri
BTRC	7,45265	0,000001
CSNK1A1	10,37785	0,000409
CSNK1E	-4,1976	0,000296
IFT52	2,961253	0,000002
NUMB	6,95825	0
SMO	2,49774	0,000003
WNT5B	-4,68038	0,000398

Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücre Hattı Üzerinde Oluşturduğu Gen Ekspresyon Değişimleri

Nekroptoz Gen Değişimleri

72 saat boyunca TMZ+VIS kombinasyonu uygulanan insan beyin kanseri kök hücrelerinde, doz uygulanmayan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında nekroptoz ile

ilişkili BMF geninin ekspresyon düzeylerinde 2,27 kat artış; CAPNS1 geninin ekspresyon düzeyinde ise 2,82 kat azalış meydana geldiği belirlendi.



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	AIFM1 3.92	ATP6V1G2 1.13	BAX -1.03	BID 2.97	BIRC3 2.97	BMF 4.84	BNIP3L -1.01	C1orf159 2.97	CAPN1 2.97	CAPN2 -1.38	CAPN3 2.97	CAPN5 2.97
B	CAPN6 -1.10	CAPN7 2.97	CAPNS1 -7.11	CASP8AP2 2.97	CCDC103 2.97	CD40 2.97	COMMD4 2.97	CYBB 2.97	CYLD 2.97	DEFB1 1.90	DENND4A -2.14	DPYSL4 2.97
C	EDA2R 2.97	EIF5B -1.40	FADD 2.97	FAF1 1.16	FAS 2.97	FASLG 2.97	FEM1B 1.41	FOXI1 2.97	FUS 2.42	GALNT5 2.97	GLUD1 2.97	GLUL -2.75
D	GRB2 2.97	HSPBAP1 2.97	IKBKKG -1.60	JPH3 2.97	KCNIP1 2.97	MADD 2.97	MAG -1.34	MGEA5 -1.96	MYD88 2.97	NFKB1 2.97	NGF 2.97	NGFR 2.97
E	NGFRAP1 -1.53	NOX1 2.97	NOX4 2.97	OR10J3 2.97	PARP1 2.97	PARP2 2.97	PIDD 2.97	PPIA 2.97	PPID 2.97	PVR 2.97	PYGL 2.97	RAB25 2.97
F	RIPK1 2.97	RIPK2 2.97	RIPK3 2.97	S100A7A 2.97	SLC25A4 2.97	SP1 -2.89	SPATA2 2.97	SYCP2 2.97	TMEM123 2.97	TMEM57 2.97	TNF 2.97	TNFRSF10A 2.97
G	TNFRSF14 2.97	TNFRSF17 2.97	TNFRSF1A 2.97	TNFRSF1B 2.97	TNFRSF25 3.99	TNFRSF4 2.97	TNFRSF8 2.97	TNFSF10 2.97	TNFSF15 2.97	TRADD 2.97	TRAF2 1.78	TXNL4B 2.97

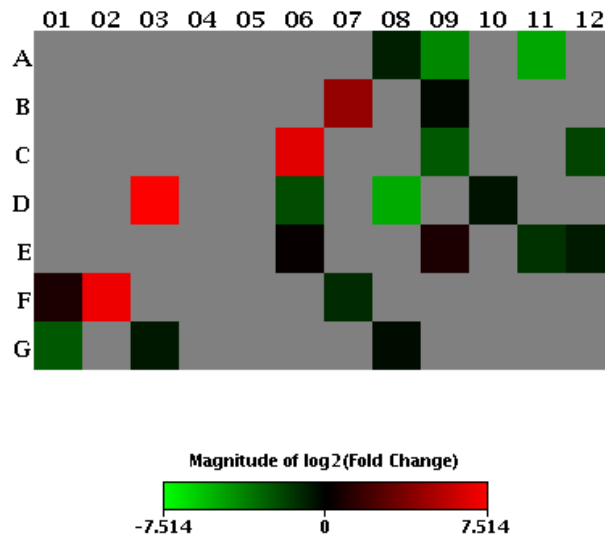
Grafik 13: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Nekroptoz İle İlişkili Genleri Üzerindeki Etkisini Gösteren Isı Haritası

Tablo 12: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Nekroptoz Gen Ekspresyonlarına Etkisi

Gen	Kat Değişimi (log 2)	p değeri
BMF	2,275365	0,004593
CAPNS1	-2,82931	0,009084

Hedgehog Gen Değişimleri

72 saat boyunca TMZ+VIS kombinasyonu uygulanan insan beyin kanseri kök hücrelerinde, doz uygulanmayan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Hh sinyal yolağı ile ilişkili FBXW11, GSK3B, MAPK1, VEGFA genlerinin ekspresyon düzeylerinde sırasıyla 4,43, 6,64, 7,51, 7,08 kat artış; BTRC, CSNK1A1, IFT52, LATS1, NF2, NUMB, WNT4 genlerinin ekspresyon düzeylerinde ise sırasıyla 4,05, 4,97, 2,58, 2,03, 2,22, 5,06, 2,59 kat azalma meydana geldiği belirlendi.



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	BCL2 -2.24	BMP2 -2.24	BMP4 -2.24	BMP5 -2.24	BMP6 -2.24	BMP7 -2.24	BMP8B -2.24	BOC -1.86	BTRC -16.63	CDON -2.24	CSNK1A1 -31.39	CSNK1E -2.24
B	CTNNB1 -2.24	DHH -2.24	DISP1 -2.24	DISP2 -2.24	ERBB4 -2.24	FAT4 -2.24	FBXW11 21.62	FGF9 -2.24	FGFR3 -1.16	FKBP8 -2.24	FOXO1 -2.24	FRMD6 -2.24
C	GAS1 -2.24	GLI1 -2.24	GLI2 -2.24	GLI3 -2.24	GREM1 -2.24	GSK3B 100.27	HHAT -2.24	HHIP -2.24	IFT52 -6.00	IHH -2.24	KCTD11 -2.24	LATS1 -4.09
D	LATS2 -2.24	LRP2 -2.24	MAPK1 182.84	MOB1B -2.24	MTSS1 -2.24	NF2 -4.67	NPC1 -2.24	NUMB -33.49	OTX2 -2.24	PRKACA -1.46	PRKACB -2.24	PTCH1 -2.24
E	PTCH2 -2.24	PTCHD1 -2.24	PTCHD2 -2.24	PTCHD3 -2.24	RAB23 -2.24	RUNX2 1.14	SFRP1 -2.24	SHH -2.24	SMO 1.69	STK3 -2.24	STK36 -2.72	SUFU -1.73
F	TP53 1.67	VEGFA 135.72	WIF1 -2.24	WNT1 -2.24	WNT10A -2.24	WNT10B -2.24	WNT11 -2.38	WNT16 -2.24	WNT2 -2.24	WNT2B -2.24	WNT3 -2.24	WNT3A -2.24
G	WNT4 -6.04 OKAY	WNT5A -2.24 C	WNT5B -1.65 B	WNT6 -2.24 C	WNT7A -2.24 C	WNT7B -2.24 C	WNT8A -2.24 C	WNT8B -1.26 B	WNT9A -2.24 C	WNT9B -2.24 C	ZIC1 -2.24 C	ZIC2 -2.24 C

Grafik 14: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Hedgehog Yolağı İle İlişkili Genleri Üzerindeki Etkisini Gösteren Isı Haritası

Tablo 13: Temozolomid + Vismodegib Kombinasyonunun İnsan Beyin Kanseri Kök Hücrelerinin Hedgehog Gen Ekspresyonlarına Etkisi

Gen	Kat Değişimi (log 2)	p değeri
BTRC	-4,05649	0,002093
CSNK1A1	-4,9703	0,000165
FBXW11	4,43444	0,016957
GSK3B	6,647778	0,008716
IFT52	-2,58554	0,011056
LATS1	-2,03209	0,00339
MAPK1	7,514444	0,00676
NF2	-2,2223	0,00264

NUMB	-5,06371	0,001621
VEGFA	7,08444	0,007226
WNT4	-2,59597	0,017581



5. TARTIŞMA

Glioblastom multiforme (GBM) en yaygın ve agresif tipteki primer beyin tümörüdür. GBM’de temozolomid (TMZ) direnci ile Sonic Hedgehog (Shh) yolağı arasında bir bağlantı gösterilmiştir. Shh sinyalleşmesi, SMO’nun aşağı akımında yer alan gliom ilişkili onkogen 1 (Gli1) tarafından gerçekleşir. Bu sinyalleşmesinin aşırı aktive olması, GBM de dahil olmak üzere birçok tümör tipi ile ilişkilendirilmiştir (30).

Malign gliomlar, tedavide dirence neden olan kök hücreleri de barındıran tümör hücre alt popülasyonları nedeniyle, hücresel düzeyde heterojenite gösterirler (31).

Glioblastom kanser kök hücresinin radyoterapi ve kemoterapiye direnci oldukça yüksektir. Bu nedenle hastalığın tedavisinde kanser kök hücrelerinin hedeflenmesi önem kazanmıştır (32).

Alkilleyici bir ajan olan TMZ, küçük bir lipofilik molekül olması ve kan-beyin bariyerini aşabilmesi nedeniyle, malign gliom tedavisinde diğer alkilleyici ajanlara göre avantaj kazanmıştır. TMZ’nin sitotoksitesinin DNA replikasyonu esnasında timin ile yanlış eşleşerek DNA’da O6-metilguanin oluşumuna neden olması ile oluştuğu düşünülmektedir (33).

Beier D. ve ark. TMZ’nin CD133+ ve CD133- GBM kanser kök hücre hatları üzerinde etkisini araştırdıkları çalışmada, doza ve zamana bağlı olarak etken madde uygulandığında kök hücre altpopülasyonun azaldığını göstermişlerdir (34).

Gliomda özellikle mitoz esnasında bir çok defekt mevcuttur ve bu durum proliferatif etkiye neden olmaktadır. Regülasyonunda değişim gözlenen iki önemli sinyalizasyon yolağı vardır: PI3K/Akt/mTOR ve Ras/MEK/MAPK. Gliom kök hücrelerinde ise Shh ve Notch sinyalizasyonu kilit yolaklardır (35).

Transkripsiyon faktörü olan NF-KB geninin aktivasyonu glioblastom gelişimi ile yakından ilişkilidir ve ilaç direncine neden olduğu düşünülmektedir (36).

Hh sinyal yolağı, embriyonik dönemde hücresel büyüme ve farklılaşmada anahtar rol oynar, ayrıca hücresel devamlılıkta önem taşıyan kök hücreler hariç birçok yetişkin dokuda aktif değildir (37, 38).

Hh yolağının karsinogenezdeki rolü ilk kez Gorlin sendromunda görülen PTCH1 (Patched) mutasyonlarının saptanmasıyla ortaya konmuştur. Bu mutasyon, Hh yolağının düzenlenmesindeki hatalardan sorumlu olmakla beraber, bazal hücreli karsinom gelişiminde de rol almaktadır. Yolaktaki bu hatalı düzenlenme aynı zamanda, sporadik bazal hücreli karsinom, medulloblastom ve beyin, akciğer, meme ve prostat da dahil olmak üzere birçok kanser tipinde de raporlanmıştır (37).

Hh ligandı yokluğunda, PTCH reseptörü Smo olarak bilinen proteini inhibe ederek tümör baskılayıcı gibi işlev görür. Hh ligandı PTCH'ye bağlandığında, Smo üzerindeki engelleyici etkiler sinyalin artmasına izin vererek serbest kalırlar (38).

Vismodegib (VIS) belirli bir etki mekanizması, benzersiz farmakokinetik profili, iyi tolere edilebilir olması ve Hh yolağında önemli role sahip olması nedeniyle, FDA tarafından onay alarak bazal hücreli karsinom tedavisinde standart terapötik uygulama haline gelmiştir (8, 9).

Nörogenez, yetişkinlerde nöronların ve glial yenilenmesinden sorumludur. Nöronal kök hücreler ve soyları, yetişkin beyinde nörogenezin aydınlatılmasıyla beraber gliom başlangıcı için aday hale gelmişlerdir. Bu açıdan, gliom kökeninin tartışılmasında beyindeki hücre tiplerinin çeşitliliğinin saptanması, ne zaman bulundukları ve nereden kaynaklandıkları önem teşkil etmektedir (39).

Nöronal kök hücreler nöronları, astrositleri ve oligodendrositleri meydana getirebilecek özelliktedir (40).

Nöronal kök hücreler gibi, birçok glioblastom kök hücre benzeri hücreler de kendini yenileyebilme özelliğine sahip olmakla beraber, CD133 ifadesi artmış tümör progresyonu ve azalmış GBM sağkalımı ile ilişkilidir (41).

Aboody ve ark. implante edilmiş nöronal kök hücrelerin tümör büyümesini azaltacak bir sitotoksik maddeyi iletecek şekilde, intrakranial tümörlerin içine göç edebilme kapasitesine sahip olduklarını açıklamışlardır (42).

Gliomda kanser kök hücrelerinin keşfi, birçok klinik zorluk ve tedavide direnç için bir açıklama önermektedir (43).

Kanser kök hücresi modeline göre, tümör içindeki kanser kök hücrelerinin kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahip oldukları düşünülmektedir. Bu nedenle, kanser kök hücrelerinin diğer bir organizmaya verildiğinde, izole edildikleri tümörün oluşumuna ve hücrel hiyerarşiye neden olabilecekleri varsayılmaktadır (39).

TMZ'ye yanıt vermeyen nörosferin Hh yolağı inhibitörü VIS uygulanarak, TMZ'ye karşı duyarlı hale getirilmesi sağlanmıştır. Bu açıdan, Hh yolağının GBM'de TMZ yanıtını sekteye uğrattığı ve bu malignite için TMZ yanıtını arttırarak terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir (44).

Biswas NK. ve ark. in vitro nörosferdeki hücelere yalnızca TMZ uyguladıklarında apoptozda belirgin artış saptamazken, aynı hücelere TMZ + VIS kombinasyonu uygulandığında 3.2 kat apoptoz artışı gözlemişlerdir. Bu nedenle, Hh yolağı TMZ'e olan yanıtı arttırmada potansiyel bir terapötik hedef olarak göz önünde bulundurulabilir (44).

Apoptotik aktivatör olarak fonksiyon gösteren BMF genin ürünü olan protein BCL2 homoloji domaini içermektedir ve BCL2 proteinlerine bağlandığı gösterilmiştir. Tianhu Z. ve ark. bcl-2'nin ifadesinin azalışının glioblastom hücrelerinde apoptozu indükleyebileceğini göstermişlerdir. Diğer yandan gliom hücrelerinde Bmf'nin ifadesinin arttığı gözlenmiştir, bu nedenle Bmf stres ile indüklenmiş hücre ölümü ve apoptozda gerekli bir başlatıcı olarak önem taşımaktadır (45).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Bmf protein ifadesinin melanoma, kolorektal adenokarsinoma ve oral ve özofagal skuamoz hücre karsinoma hücre hatlarında azaldığı belirtilmiştir (46).

Xia HF ve ark. BMF geninin miR-125b etkileşimli hücre apoptozu sürecinde önemli role sahip olabileceğini öne sürmüştür (47).

Çalışmamızda, TMZ + VIS kombinasyonunun uygulandığı beyin kanseri kök hücrelerinde BMF geninin ifadesi 2,275365 kat artmıştır. Bunun sonucu olarak, BMF

gen ifadesinin artışı ile DNA hasarı oluşturularak hücreler apoptoza yönlendirilmiş olabilir ve bu sayede kanser kök hücrelerinin tümörigenez sürecinden kurtulması sağlanabilir.

Bununla birlikte, beyin kanser kök hücresinde hücrelerin gelişimini ve farklılaşmasını sağlayan artmış hedgehog sinyalizasyon yolağında kilit molekül olan transkripsiyon faktörü WNT4 geninin ifadesi, TMZ + VIS kombinasyonu uygulamasından sonra kontrol hücrelerine oranla önemli ölçüde azalmıştır.

Shen F. ve ark.'nın çalışmalarındaki analizlerin sonuçlarına göre WNT4 gliom patogenezinde dahil olabilecek yeni odak protein olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, kanser kök hücrelerini hedefleyebilmek ve Hh sinyalizasyonunu baskılayarak hücrelerin tümörigenezden kaçışını sağlayabilmek için, WNT4 transkripsiyon faktörünün baskılanması oldukça önem taşımaktadır (48).

CAPNS1 calpain küçük alt ünite ailesinin bir üyesidir. Bu genin kodladığı protein, proteolitik aktiviteleri apoptoz ve proliferasyon da dahil olmak üzere çeşitli hücresel fonksiyonları etkileyen calpain heterodimerlerinin işlevi ve stabilitesi için esansiyeldir. Çalışmamızda, etken maddelerin kombinasyonunun uygulandığı insan beyin kanseri kök hücrelerinde CAPNS1 geni ifadesi 2,82931 kat azalmıştır (49).

Cai JJ. ve ark. çalışmalarında, Capn4 (CAPNS1) geninin ifadesinin gliom dokularında kontrol beyin dokularına göre önemli derecede yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu genin gliom hücrelerindeki ifade azalışının invazyon ve migrasyonda azalmaya neden olduğu belirtilmiştir.

Bu açıdan, terapötik gliom stratejilerinde Capn4 geninin aşırı ifade olması, tanısal bir belirteç ve yeni bir hedef olarak olarak önem kazanmaktadır (50).

Xiuli Jiang ve ark. glioblastom kök hücresinin kaderini ve gelişimini epidermal büyüme faktörü reseptörü aracılığı ile NUMB geninin belirlediğini ortaya koymuştur. Yüksek NUMB ifadesi klasik ve mezenkimal glioblastom hücrelerinde bulunmakla beraber, düşük sağkalım ile ilişkilidir. Ayrıca, glioblastom kök hücrelerinin hiyerarşik olarak ayrımlaşmasına neden olarak tümör agresifleşmesine ve ilaç direncine yol açmaktadır. Bu amaçla, insan beyin kanser kök hücresinde TMZ ve VIS kombinasyonu uygulamasından sonra, Hh sinyalizasyon yolağı ile ilişkili

olarak NUMB geninin ifadesinin azalması hücrelerin kök hücre olarak kalmasını engelleyebilir. Bu bağlamda, ilaç direncinin ortadan kaldırılmasında, NUMB geni yeni hedef molekül olarak potansiyel taşımaktadır (41).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Güncel olarak, nekrotik hücre ölümünün apoptoz gibi düzenlenebilir ve kontrol edilebilir bir proses olduğu düşünülmektedir. Nekroptoz olarak adlandırılan bu mekanizma insan beyin kanseri kök hücrelerinin tedaviden kaçışında kullandığı bir mekanizma olarak görülmektedir. Apoptozun beyin kanseri tedavisinde indüklenmesi, kanser kök hücrelerinin varlığından dolayı belirgin bir kazanım sağlamadığından, nekroptozun modüle edilerek daha iyi terapötik yanıt sağlanması hedeflenmelidir.

Yapmış olduğumuz çalışmada, TMZ ve VIS kombinasyonunun normal hücrelere oranla, insan beyin kanseri kök hücrelerinde apoptoz ve nekroptoz gibi başlıca hücre ölüm mekanizmaları ve Hh yolağı genlerinin ifade değişimleri araştırılmıştır.

Son yıllarda, kanserde önemli rol oynadığı tespit edilen Hedgehog yolağı genlerindeki anlamlı değişimlerin konvansiyonel tedavi modalitelerine alternatif sağlayabileceğini öngörmekteyiz.

Hh genlerinin ifadelerindeki gözlenen değişimlerin protein ekspresyonlarına olan etkilerinin de incelenip, ileri in vivo çalışmalar ile desteklenerek tedavi yaklaşımlarına katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1 Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, et. al. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10):2524-33.
- 2 Woodworth GF, Dunn GP, Nance EA, Hanes J, Brem H. Emerging insights into barriers to effective brain tumor therapeutics. *Front Oncol*. 2014 Jul 21;4:126.
- 3 Jovčevska I, Kočevár N, Komel R. Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? *Mol Clin Oncol*. 2013 Nov;1(6):935-941.
- 4 Frosina G. DNA repair and resistance of gliomas to chemotherapy and radiotherapy. *Mol Cancer Res*. 2009 Jul;7(7):989-99.
- 5 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et. al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2):97-109.
- 6 Wang J, Ma Y, Cooper MK. Cancer stem cells in glioma: challenges and opportunities. *Transl Cancer Res*. 2013 Oct 1;2(5):429-441.
- 7 Lowell S. Stem cells show their potential. *Trends Cell Biol*. 2000 May;10(5):210-1
- 8 Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*. 2014 Nov 27;8:396.
- 9 Lin R, Iacovitti L. Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Res*. 2015 Apr 28.
- 10 Hong IS, Lee HY, Nam JS. Cancer stem cells: the 'Achilles heel' of chemo-resistant tumors. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2015;10(1):2-22.
- 11 Würth R, Barbieri F, Florio T. New molecules and old drugs as emerging approaches to selectively target human glioblastoma cancer stem cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:126586.
- 12 Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T. Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol Res Int*. 2012;2012:878425.

- 13 NIH U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information web site. [cited 2015 November 6]
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/temozolomide#section=Top>
- 14 Chen W, Wang D, Du X, He Y, Chen S, Shao Q, et. al. Glioma cells escaped from cytotoxicity of temozolomide and vincristine by communicating with human astrocytes. *Med Oncol*. 2015 Mar;32(3):43.
- 15 Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ*. 2004 Apr;11(4):448-57.
- 16 Nakada M, Furuta T, Hayashi Y, Minamoto T, Hamada J. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Front Oncol*. 2012 Aug 14;2:98.
- 17 Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Murata H, Hatae R, Amano T, et. al. Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Front Oncol*. 2012 Dec 5;2:186.
- 18 Berrada N, Lkhoyali S, Mrabti H, Errihani H. Vismodegib: the proof of concept in Basal cell carcinoma. *Clin Med Insights Oncol*. 2014 Jun 2;8:77-80.
- 19 Dlugosz A, Agrawal S, Kirkpatrick P. Vismodegib. *Nature Reviews Drug Discovery* 11, 437-438 (June 2012)
- 20 Rudin CM. Vismodegib. *Clin Cancer Res*. 2012 Jun 15;18(12):3218-22.
- 21 Allen BK, Stathias V, Maloof ME, Vidovic D, Winterbottom EF, Capobianco AJ, et. al. Epigenetic pathways and glioblastoma treatment: insights from signaling cascades. *J Cell Biochem*. 2015 Mar;116(3):351-63.
- 22 An SM, Ding QP, Li LS. Stem cell signaling as a target for novel drug discovery: recent progress in the WNT and Hedgehog pathways. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 Jun;34(6):777-83.
- 23 Jiang YG, Peng Y, Koussougbo KS. Necroptosis: a novel therapeutic target for glioblastoma. *Med Hypotheses*. 2011 Mar;76(3):350-2.

- 24 Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et. al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Volume 45, Issue 6 December 2012 Pages 487–498.
- 25 Negroni A, Cucchiara S, Stronati L. Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:250762.
- 26 Hongmei Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway (Review). ISBN 978-953-51-0701-9, Published: August 16, 2012.
- 27 Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
- 28 Nunes T, Bernardazzi T, Souza HS. Cell Death and Inflammatory Bowel Diseases: Apoptosis, Necrosis, and Autophagy in the Intestinal Epithelium. Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation*. 2014
- 29 Strozyk E, Kulms D. The Role of AKT/mTOR Pathway in Stress Response to UV-Irradiation: Implication in Skin Carcinogenesis by Regulation of Apoptosis, Autophagy and Senescence. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 15260-15285
- 30 Munoz JL, Rodriguez-Cruz V, Ramkissoon SH, Ligon KL, Greco SJ, Rameshwar P. Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9- targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level. *Oncotarget.* 2015; 6(31):1190-201.
- 31 Jason T. Huse & Eric C. Holland. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews Cancer.* 2010; 319-331.
- 32 Cho DY, Lin SZ, Yang WK, Lee HC, Hsu DM, Lin HL, Chen CC, Liu CL, Lee WY, Ho LH. Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell Transplant.* 2013; 22(33):731-9.
- 33 Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 2004; 11(33):448-57.
- 34 Beier D, Röhr S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, Giebel B,

Wischhusen J, Reifenberger G, Hau P, Beier CP. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res.* 2008; 68(43):5706-15.

35 Mitsutoshi Nakada, Daisuke Kita, Takuya Watanabe, Yutaka Hayashi, Lei Teng, Ilya V. Pyko, Jun-Ichiro Hamada. Aberrant Signaling Pathways in Glioma. *Cancers.* 2011; 3, 3242-3278.

36 Vineshkumar Thidil Puliappadamba, Kimmo J Hatanpaa, Sharmistha Chakraborty & Aryn A Habib. The role of NF- κ B in the pathogenesis of glioma. *Molecular & Cellular Oncology.* 2014; 1:3, e963478.

37 Berrada N, Lkhoyali S, Mrabti H, Errihani H. Vismodegib: the Proof of Concept in Basal Cell Carcinoma. *Clin Med Insights Oncol.* 2014; 8:77-80.

38 Cowey CL. Targeted Therapy for Advanced Basal-Cell Carcinoma: Vismodegib and Beyond. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2013; 3(30):17-31.

39 Modrek AS, Bayin NS, Placantonakis DG. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J Stem Cells.* 2014; 6(30):43-52.

40 Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287:1433–8.

41 Jiang X, Xing H, Kim TM, Jung Y, Huang W, Yang HW, Song S, Park PJ, Carroll RS, Johnson MD. Numb Regulates Glioma Stem Cell Fate and Growth by Altering Epidermal Growth Factor Receptor and Skp1-Cullin-F-Box Ubiquitin Ligase Activity. *Stem Cells.* 2012; 30(36):1313-26.

42 Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:12846–51.

43 Cruceru ML, Neagu M, Demoulin JB, Constantinescu SN. Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms. *J Cell Mol Med.* 2013; 17(39):1218-35.

44 Biswas NK, Chandra V, Sarkar-Roy N, Das T, Bhattacharya RN, et al. Variant allele frequency enrichment analysis in vitro reveals sonic hedgehog pathway to impede sustained temozolomide response in GBM. *Sci Rep.* 2015; 5:7915.

- 45 Tianhu Z, Shiguang Z, Xinghan L. Bmf is upregulated by PS-341-mediated cell death of glioma cells through JNK phosphorylation. *Mol Biol Rep.* 2010; 37(32):1211-9.
- 46 Piñon JD, Labi V, Egle A, Villunger A. Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene.* 2008; 27 Suppl 1:S41-52.
- 47 Xia HF1, He TZ, Liu CM, et al. MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf. *Cell Physiol Biochem.* 2009; 23(4-6):347-58.
- 48 Shen F, Zhang Y, Yao Y, Hua W, Zhang HS, Wu JS, Zhong P, Zhou LF. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid: toward the identification of biomarkers for gliomas. *Neurosurg Rev.* 2014; 37(32):367-80; discussion 380.
- 49 Cataldo F, Peche LY, Klaric E, Brancolini C, Myers MP, Demarchi F, Schneider C. CAPNS1 regulates USP1 stability and maintenance of genome integrity. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(41):2485-96.
- 50 Cai JJ1, Qi ZX, Hua W, Zhu JJ, Zhang X, Yao Y, Mao Y. Increased expression of Capn4 is associated with the malignancy of human glioma. *CNS Neurosci Ther.* 2014; 20(3):521-7.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İzmir’ de doğdum. İlköğrenimimi Ali Suavi İlköğretim Okulu, orta öğrenimimi ise İzmir Atatürk Lisesi’nde tamamladım. Lisans eğitimimi 2008-2013 yıllarında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde, Moleküler Biyoloji ve Genetik opsiyonunda gerçekleştirdim. 2014-2015 eğitim döneminden itibaren Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimi yapmaktayım.

e- posta: ozgunozalp@gmail.com

