

**T.C
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**hMOB2'NİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ PREDİKTİF ROLÜNÜN
DEŞİFRE EDİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Yusuf TOY

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU

BİNGÖL-2024

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi ve doktora tezim boyunca beni tüm imkânları ile her konuda destekleyen, tecrübelerini, bilgilerini sabır ile benimle paylaşan ve önerileri ile beni yönlendiren danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübeleriyle beni destekleyen, yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN hocama teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecim boyunca laboratuvar çalışmalarına katkı sunan, yardımlarını ve desteklerini gördüğüm sayın Öğr. Gör. Aydın SEVER hocama teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca kanser araştırma laboratuvar çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde maddi manevi desteklerini esirgemeyen aldığım kararlarda her zaman yanımda olan sevgili eşim Uzm. Bio. Merve TOY ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK) Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (SBAG) tarafından 119S007 no'lu proje numarasıyla desteklenmiştir. Ayrıca, proje kapsamında elde edilen bulgular neticesinde oluşan yeni araştırma soruları TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı ve TÜBİTAK 1002-B Acil Destek Programı (222S786) kapsamında desteklenmiştir. Bu değerli destekler için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Yusuf TOY

Bingöl 2024

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	xv
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1. Kanser	2
2.2. DNA Hasar Yanıt Mekanizması	4
2.2.1. DNA Onarım Sistemleri	5
2.3. PARP ve PARP inhibitörleri	9
2.4. Hücre Döngüsü ve Regülasyonu	12
2.5. Apoptozis Mekanizması	14
2.6. Hippo Sinyal Yolağı	17
2.6.1. MOB2 Proteinini	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzeme ve Kimyasallar	22
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Memeli Hücre Kültürü Teknikleri	28
3.2.1.1. Hücre Hattı Seçimi ve Hücre Kültürü Ekipmanları	28
3.2.1.2. siRNA Transfeksiyonu ile hMOB2 Gen İfadesinin Susturulması	28
3.2.2. Protein Analiz Yöntemleri	29
3.2.2.1. Total Protein İzolasyonu ve Bradford Yöntemi	29
3.2.2.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Tekniği	30
3.2.2.3. İmmünoFloresans Yöntemi	30

3.2.3. Nükleik Asit Analiz Yöntemleri	31
3.2.3.1. RNA – RT2 qPCR Analizi.....	31
3.2.3.2. Total RNA'nın İzolasyonu ve RNA Agaroz Jel Elektroforezi	32
3.2.3.3. cDNA Sentezi ve Kantitatif Real-Time PCR.....	32
3.2.3.4. cDNA Kalıcı (Stable) Transfeksiyonu.....	33
3.2.4. Fonksiyonel Analizler	34
3.2.4.1. Kristal Viyole Hücre Canlılığı Testi	34
3.2.4.2. 2D Koloni Sağkalım Deneyi	34
3.2.4.3. Yara İyileşme Deneyi	35
3.2.4.4. Nötral Kırmızısı Yöntemi	36
3.2.4.5. DNA Fragmentasyon Analizi	36
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	38
4.1. RNA İnterferans Yöntemi ile hMOB2 Gen İfadesinin Susturulması.....	38
4.2. hMOB2 Proteinini ile Çeşitli Hücresel Yolaklarda Görevli Proteinler	
Arasındaki Sentetik Letalitenin Belirlenmesi.....	40
4.2.1. Azalan hMOB2 İfadesi Sonucunda Ekspresyonu Artan Genler.....	45
4.2.2. Azalan hMOB2 İfadesi Sonucunda Ekspresyonu Azalan Genler.....	47
4.2.3. Azalan hMOB2 İfadesi Sonucunda Ekspresyonu Değişmeyen Genler	48
4.3. Hücrelerin Eksojen DNA Hasarına Yanıtında hMOB2 Proteininin	
Subsellüler Lokalizasyonunun Belirlenmesi	54
4.3.1. Hücrelerin Eksojen DNA Hasarına Maruziyeti ile 53BP1-hMOB2	
Ko-lokalizasyonunun Belirlenmesi.....	56
4.3.2. Hücrelerin Eksojen DNA Hasarına Maruziyeti ile γ H2AX-hMOB2	
Ko-lokalizasyonunun Belirlenmesi.....	58
4.3.3. Hücrelerin Eksojen DNA Hasarına Maruziyeti ile RAD51-hMOB2	
Ko-lokalizasyonunun Belirlenmesi.....	60
4.4. hMOB2 Proteininin Protein-Protein Etkileşim ve Post-Translasyonel	
Modifikasyon Statüsünün Saptanması	62
4.5. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinin MCF-7	
Hücre Canlılığına Olan Etkisinin Belirlenmesi	68
4.5.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre Canlılığına	
Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	68

4.5.2. siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre	
Canlılığına Olan Etkisinin Belirlenmesi	71
4.5.2. siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre	
Canlılığına Olan Etkisinin Belirlenmesi	73
4.6. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinin MCF-7 Koloni	
Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi	75
4.6.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Koloni	
Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	75
4.6.2. siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Koloni	
Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	77
4.6.3. siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Koloni	
Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	79
4.7. MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon	
Tedavilerinin Apoptotik/Otofajik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	81
4.7.1. MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon	
Tedavisinin Apoptotik/Otofajik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	81
4.7.2. MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon	
Tedavisinin Apoptotik/Otofajik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	87
4.7.3. MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon	
Tedavisinin Apoptotik/Otofajik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	92
4.8. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinin MCF-7	
Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunun Saptanması	98
4.8.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde	
DNA Fragmentasyonunun Saptanması.....	98
4.8.2. siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde	
DNA Fragmentasyonunun Saptanması.....	99
4.8.3. siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde	
DNA Fragmentasyonunun Saptanması.....	101
4.9. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinde Nötral	
Kırmızısı Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	102
4.9.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavilerinde Nötral Kırmızısı	
Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	102
4.9.2. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavilerinde Nötral Kırmızısı	

Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	103
4.9.3. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavilerinde Nötral Kırmızısı	
Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	104
4.10. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinin MCF-7	
Hücre Migrasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	105
4.10.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre	
Migrasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	105
4.10.2. siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7	
Hücre Migrasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi	107
4.10.3. siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre	
Migrasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	109
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	127
KAYNAKLAR	129

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

hMOB2	: İnsan tek kutuplu iğ bağlayıcı 2 (human Monopolar spindle-one binder 2)
DDR	: DNA hasar yanıt sistemi
DNA	: DeoksiriboNükleik Asit
HR	: Homolog Rekombinasyon
NHEJ	: Homolog Olmayan Uçların Birleştirilmesi
PARP	: Poli (ADP-riboz) Polimeraz
°C	: Santigrad derece
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
ml	: Mili litre
nM	: Nano molar
µg	: Mikrogram
CO ₂	: Karbondioksit
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
µM	: Mikro molar
kDa	: Kilo Dalton
MCF-7	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (Michigan Cancer Foundation-7)
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
DMEM	: Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri
DPBS	: Dulbecco's fosfatlı tuz solüsyonu
TEMED	: N,N,N,N-tetrametietilendiamin
HCL	: Hidroklorik asit
KCL	: Potasyum Klorür
NaCl	: Sodyum Klorür
BCL-2	: B Hücreli Lenfoma 2
P53	: Tümör Baskılayıcı Protein 53
cPARP	: Cleaved Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florür

DTT	: Dithiothreitol
Tris	: Trihidroksimetil Aminometan
NP-40	: Nonidet P40
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EGTA	: Etilenglisoltetraasetik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PET ALF	: Poliviniliden Diflorid
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florür
DTT	: Ditiyotreititol
NaOH	: Sodyum Hidroksit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Kanserin Ayırt Edici Özellikleri	3
Şekil 2.2.	Baz Eksizyon Onarımı ve Nükleotit Eksizyon Onarım Sistemleri	6
Şekil 2.3.	DNA Çift Zincir Kırığı Onarım Sistemleri	8
Şekil 2.4.	Sentetik Letalite Mekanizması	10
Şekil 2.5.	PARP Mekanizması	11
Şekil 2.6.	Hücre Döngüsü Safhaları	13
Şekil 2.7.	Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	14
Şekil 2.8.	İçsel ve Dışsal Apoptozis Mekanizması	17
Şekil 2.9.	Hippo Sinyal Yolağı	18
Şekil 2.10.	İnsan MOB Proteinin Hücrel Regülasyonu	19
Şekil 4.1.	U2OS Kanseri Hücrelerinde Anti-MOB2 Antikoru ve siRNA Konstraktlarının Aktivitelerinin Teyit Edilmesi	40
Şekil 4.2.	RT2-qPCR Analizleri İçin Gerçekleştirilen hMOB2 mRNA'sının Susturulması Aplikasyonlarının Teyit Edilmesi	46
Şekil 4.3.	hMOB2 İfadesi Baskılanan U2OS Kanseri Hücrelerinde Ekspresyonu Artan Genler	48
Şekil 4.4.	hMOB2 İfadesi Baskılanan U2OS Kanseri Hücrelerinde Ekspresyonu Azalan Genler	50
Şekil 4.5.	hMOB2 İfadesi Baskılanan U2OS Kanseri Hücrelerinde Ekspresyonu Değişmeyen Genler	51
Şekil 4.6.	Anti-hMOB2 Antikoru İmmüno Floresans Etkinliğinin Teyit Edilmesi	57
Şekil 4.7.	Eksojen DNA Hasarına Maruz Kalan Hücrelerde 53BP1-hMOB2 Ko-Lokalizasyonunun Belirlenmesi	59
Şekil 4.8.	Eksojen DNA Hasarına Maruz Kalan Hücrelerde γ H2AX-hMOB2 Ko-Lokalizasyonunun Belirlenmesi	61
Şekil 4.9.	Eksojen DNA hasarına Maruz Kalan Hücrelerde RAD51-hMOB2 Ko-Lokalizasyonunun Belirlenmesi	64

Şekil 4.10.	hMOB2 Proteinini İçin Scansite Taramasında Tespit Edilen Muhtemel ATM Fosforilasyon Bölgesi	65
Şekil 4.11.	U2OS Kanseri Hücrelerinde Ektopik hMOB2 Wild-Type ve Mutant Formlarının Kalıcı Olarak İfade Edilmesi	65
Şekil 4.12.	Boş vektör, hMOB2 Wild-Type veya hMOB2 S139A Mutant Formlarını İfade Eden U2OS Kanseri Hücrelerindeki Endojen hMOB2 İfadesinin Susturulması	66
Şekil 4.13.	hMOB2'nin ATM Tarafından Potansiyel Fosforilasyon Bölgesinin Olaparib Fenotipi Üzerine Olan Katkısının Belirlenmesi	67
Şekil 4.14.	Boş Vektör, hMOB2 wild-type veya hMOB2 H157A Mutant Formlarını İfade Eden U2OS Kanseri Hücrelerindeki Endojen hMOB2 İfadesinin Susturulması	68
Şekil 4.15.	hMOB2-NDR1 Protein-Protein Bölgesinin Olaparib Fenotipi Üzerine Olan Katkısının Belirlenmesi	69
Şekil 4.16.	Olaparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerin Kristal Viyole Hücre Canlılık Analizi	71
Şekil 4.17.	Rucaparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerin Kristal Viyole Hücre Canlılık Analizi	73
Şekil 4.18.	Veliparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerin Kristal Viyole Hücre Canlılık Analizi	74
Şekil 4.19.	Olaparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerin Koloni Sağ-Kalım Analizi	76
Şekil 4.20.	Rucaparib tedavisi ile MCF-7 Hücrelerin Koloni Sağ-Kalım Analizi	78
Şekil 4.21.	Veliparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerin Koloni Sağ-Kalım Analizi ...	80
Şekil 4.22.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin hMOB2 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	82
Şekil 4.23.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin p53 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	82
Şekil 4.24.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin p21 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	83
Şekil 4.25.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin Bax Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	84
Şekil 4.26.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin Bcl-2 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	84

Şekil 4.27.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin Cas-3 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	85
Şekil 4.28.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin Cas-9 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	85
Şekil 4.29.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin cPARP Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	86
Şekil 4.30.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin Beclin-1 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	86
Şekil 4.31.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin hMOB2 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	88
Şekil 4.32.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin p53 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	88
Şekil 4.33.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin p21 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	89
Şekil 4.34.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin Bax Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	89
Şekil 4.35.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin Bcl-2 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	90
Şekil 4.36.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin Cas-3 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	90
Şekil 4.37.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin Cas-9 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	91
Şekil 4.38.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin cPARP Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	91
Şekil 4.39.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin Beclin-1 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	92
Şekil 4.40.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin hMOB2 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	93
Şekil 4.41.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin p53 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	94
Şekil 4.42.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin p21 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	94

Şekil 4.43.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin Bax Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	95
Şekil 4.44.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin Bcl-2 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	95
Şekil 4.45.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin Cas-3 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	96
Şekil 4.46.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin Cas-9 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	96
Şekil 4.47.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin cPARP Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	97
Şekil 4.48.	MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin Beclin-1 Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	97
Şekil 4.49.	MCF-7 Olaparib Tedavisi DNA Fragmentasyon Analizi	99
Şekil 4.50.	MCF-7 Rucaparib Tedavisi DNA Fragmentasyon Analizi	100
Şekil 4.51.	MCF-7 Veliparib Tedavisi DNA Fragmentasyon Analizi	102
Şekil 4.52.	Olaparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerin Nötral Kırmızısı Analizi	103
Şekil 4.53.	Rucaparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerin Nötral Kırmızısı Analizi	104
Şekil 4.54.	Veliparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerin Nötral Kırmızısı Analizi	105
Şekil 4.55.	Olaparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerinde Migrasyon Wound Healing Analizi	107
Şekil 4.56.	Rucaparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerinde Migrasyon Wound Healing Analizi	108
Şekil 4.57.	Veliparib Tedavisi ile MCF-7 Hücrelerinde Migrasyon Wound Healing Analizi	110

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 3.1. Bakteriyel Çalışmalarda Kullanılan Besiyerleri	22
Tablo 3.2. DNA İzolasyonu ve Agaroza Jel Elektrophorezi İçin Kullanılan Materyaller	22
Tablo 3.3. Moleküler Biyoloji Çalışmalarında Kullanılan Ticari Kitler	22
Tablo 3.4. İmmunofloresans Analizinde Kullanılan Materyaller	23
Tablo 3.5. İmmunofloresans Analizinde Kullanılan Antikorlar	23
Tablo 3.6. Western Blot Analizinde Kullanılan Çözeltiler	23
Tablo 3.7. Western Blot Analizinde Kullanılan Antikorlar	25
Tablo 3.8. RNA İnterferans Analizinde Kullanılan siRNA Kompleksleri	26
Tablo 3.9. Koloni Sağ-Kalım Analizinde Kullanılan Solüsyonlar	26
Tablo 3.10. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar	26
Tablo 3.11. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Temel Gereçler	27
Tablo 3.12. Genel Laboratuvar Çalışmalarında Kullanılan Tampon Çözeltiler	27
Tablo 4.1. RT ² Profiler™ PCR Array Human p53 Signaling Pathway Panelinde Yer Alan Gen Listesi	41

hMOB2'NİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ PREDİKTİF ROLÜNÜN DEŞİFRE EDİLMESİ

ÖZET

Kanser, hücrelerin büyüme, bölünme, farklılaşma ve programlı ölümünde rol oynayan genlerin mutasyona uğraması neticesinde proteinlerin işlevsizleşmesiyle hücrelerin sürekli olarak çoğalması olarak tanımlanmaktadır. Her yıl artan kanser vakaları ve kansere bağlı ölüm oranlarının artması nedeniyle kanser tedavilerinin önemi ortaya çıkmaktadır. Bireyselleştirilmiş kanser tedavisine yönelik çalışmalarda DNA hasar yanıt sistemindeki proteinlerin işlevlerinin tanımlanması, hücre döngüsü ve metabolizmasının işlevlerinin anlaşılması önem arz etmektedir.

Bu tez çalışması ile osteosarkoma U2OS hücreleri kullanılarak hMOB2'nin moleküler mekanizması ve MCF-7 hücre hattı kullanılarak hMOB2'nin bireyselleştirilmiş kanser tedavilerindeki prediktif rolü araştırılmıştır. hMOB2 proteininin çeşitli hücresel yollarda rol oynayan bileşenler arasındaki sentetik letal etkileşimleri RT-PCR ile belirlenmiştir. DNA hasarına yanıt olarak hMOB2 proteininin subsellüler lokalizasyonu ile post translasyonel modifikasyon statüsünü RAD51, ATM, 53BP1 ve H2AX ko-lokalizasyonları immüno floresans yöntemle belirlenmiştir. PARP inhibitörlerinden olaparib, rucaparib ve veliparib tedavileri ile MCF-7 hücrelerinin kristal viyole yöntemi ile canlılığı, koloni sağ-kalım analizleri, western blot analizleri, yara iyileşme analizleri, DNA fragmentasyon ve nötral kırmızısı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, hMOB2 proteininin çeşitli proteinler ile sentetik letal etkileşim içerisinde olduğu ve 53BP1 ve H2AX proteinleriyle hasar durumunda ko-lokalize olduğu tespit edilmiştir. hMOB2 defektif MCF-7 meme kanseri hücrelerinde PARP inhibitör tedavilerinin hücre canlılığını azalttığı, koloni sağ-kalımlarını baskıladığı, hücre migrasyon yeteneğini engellediği, apoptozis ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerini regüle ederek DNA hasarına ve apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: hMOB2, Bireyselleştirilmiş Kanser Tedavileri, Olaparib, Rucaparib, Veliparib.

DISCOVERING THE PREDICTIVE ROLE OF hMOB2 IN CANCER TREATMENT

ABSTRACT

Cancer is defined as the continuous proliferation of cells due to the dysfunction of proteins resulting from mutations in genes involved in cell growth, division, differentiation and programmed cell death. The increasing number of cancer cases and cancer-related death rates each year highlight the importance of cancer treatments. In studies focused on personalised cancer treatment, it is crucial to identify the functions of proteins in the DNA damage response system and to understand the functions of cell cycle and metabolism.

In this thesis, the molecular mechanism of hMOB2 using osteosarcoma U2OS cells and the predictive role of hMOB2 in individualised cancer therapies using MCF-7 cell line were investigated. The synthetic lethal interactions of the hMOB2 protein with components involved in various cellular pathways were identified using RT-PCR. The subcellular localisation and post-translational modification status of hMOB2 protein in response to DNA damage were determined through co-localizations with RAD51, ATM, 53BP1, and H2AX proteins using immunofluorescence techniques. The crystal violet cell viability, colony survival, Western blot, wound healing, DNA fragmentation and neutral red analyses of MCF-7 cells treated with PARP inhibitors olaparib, rucaparib and veliparib were performed.

The findings of our study showed that the hMOB2 protein is likely to have potential synthetic lethal interactions with various cellular components and co-localises with 53BP1 and H2AX proteins in response to DNA damage. In hMOB2 defective MCF-7 breast cancer cells, PARP inhibitor treatments were found to reduce cell viability, suppress colony survival, inhibit cell migration, and regulate the expression levels of apoptosis-related proteins, leading to DNA damage and apoptosis.

Keywords: hMOB2, Personalised Cancer Therapies, Olaparib, Rucaparib, Veliparib.

1. GİRİŞ

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tahminlerine göre, 2022 yılında yaklaşık 10 milyon kişinin kanser kaynaklı ölümünün gerçekleştiği, yaklaşık 20 milyon kişiye de yeni kanser tanısının konulduğu tahmin edilmektedir (Bray et al., 2024). Yine aynı ajansın verilerine göre her 5 kişiden 1'ine yaşamının herhangi bir döneminde kanser tanısı konulduğu rapor edilmiştir. Dünya çapında akciğer kanserinden kaynaklı meydana gelen ölümlerden sonra meme kanserinden kaynaklı ölümlerin geldiği bilinmektedir (Bray et al., 2024). Günümüzde kanser vakalarının artışı alternatif tedavi stratejilerini oluşturmayı zorunlu hale getirmektedir. Kanser tedavisinde genel yaklaşım olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler kanserli hücreyle beraber sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Tedavi noktasında karşılaşılan bu sorunun çözümüne yönelik bireyselleştirilmiş kanser tedavileri önem kazanmaktadır. Gelişen teknoloji ile birlikte kanser hücrelerinin genomik ve proteomik profillerinin çıkartılması tedavi noktasında yeni moleküler biyohedeflerin ve/veya prediktif biyobelirteçlerin tanımlanmasına imkan sağlamaktadır. Bu nedenle, bireyselleştirilmiş kanser tedavisine yönelik çalışmalarda DNA hasar yanıt sistemindeki proteinlerin işlevlerinin tanımlanması, hücre döngüsü ve metabolizmasının işlevlerinin anlaşılması önem arz etmektedir (Chambliss and Chan, 2016; Nandal et al., 2017).

TÜBİTAK tarafından desteklenen 119S007 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilen bu tez çalışması ile osteosarkoma U2OS hücreleri kullanılarak hMOB2'nin moleküler mekanizması ve MCF-7 hücre hattı kullanılarak hMOB2'nin bireyselleştirilmiş kanser tedavilerindeki prediktif rolü araştırılmıştır. hMOB2'nin söz konusu prediktif rolünün deşifre edilmesi kanser hücrelerinin spesifik olarak elimine edilmesini sağlayarak tedavi yaklaşımlarına katkı sunacağı düşünülmektedir. Yapılan tez çalışmasının amacı, hMOB2 proteininin çeşitli hücresel yollarda rol oynayan bileşenler arasındaki sentetik letal etkileşimlerinin ortaya çıkarılması, DNA hasarına yanıt olarak hMOB2 proteininin subsellüler lokalizasyonu ile post translasyonel modifikasyon statüsünün belirlenmesi ve son olarak hMOB2'nin meme kanseri hücrelerinin konvansiyonel ve bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına olan yanıtındaki rolünün saptanmasıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kanser

Hücrelerin kalıtım materyali olan DNA, replikasyona uğrayarak genetik bilgiyi nesilden nesile aktarmakla yükümlüdür. Bu bağlamda hücrelerin yüzey/hacim oranları artarak trilyonlarca hücrelerin oluşumu tetiklenmektedir. Hücrelerin metabolik süreçlerinde (büyüme, bölünme, ölüm vd.) rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin eksojen ve/veya endojen hasarlara maruziyeti sonrasında sağlıklı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması kanser olarak tanımlanmaktadır (Hanahan et al., 2000). Kontrolsüz hücre çoğalmasının temelinde, DNA tamir mekanizmalarının işlevsizliği sonucu biriken mutasyonların protoonkogenik genlerin aktivasyonunu sağlayarak malign tümörlerin oluşturulması yer almaktadır (Medicine, 2009).

2022 yılına ait Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı verilerine göre 20 milyondan fazla yeni kanser vakası ve bu kanserlerden kaynaklanan ölümlerin ise 9.7 milyondan fazla olduğu bildirilmiştir. Akciğer kanseri en sık teşhis edilen kanser türü olup tüm kanser vakalarının %12,4'ünü oluşturmaktadır. Kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseri olup tüm kanser vakalarının %11,6'sını oluşturmaktadır. Yapılan istatistik analiz ile meme kanserinin kadınlarda en yaygın kanser türü olduğu yinelenmiştir (Bray et al., 2024). Elde edilen verilere bakıldığında, klinikte meme kanseri tedavisinin daha başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için yeni yaklaşım ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Son yıllarda meme kanseri tedavisine yönelik yapılan çalışmalarla meme kanserinin genetik nedenlerinin anlaşılması noktasında başarılı adımlar atılmıştır. Özellikle *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin genetik olarak klonlanması sonucunda *BRCA1* ve *BRCA2* gen ürünlerinin DNA çift zincir kırığı tamir mekanizmalarından biri olan homolog rekombinasyon tamir mekanizmasındaki işlevleri üzerinde detaylı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde *BRCA1/2* proteinlerinin işlevsizliği genomik kararsızlığa neden olduğu ve bununla beraber neoplastik transformasyona sebebiyet verdiği saptanmıştır (Tung et al., 2018; Jonsson et al., 2019).

Kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmesi zamanla normal hücrelerinde neoplastik transformasyona uğramasına neden olmaktadır. Neoplastik transformasyon dışında kanser hücreleri, metastaz gelişimi, büyüme sinyalleri etkisizleştirme, replikasyon sinyallerinin sürekliliği gibi birçok ayırt edici özellik içermektedir (Hanahan and Weinberg, 2011). Kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayıran kontrollü hücre ölümünden kaçış, invazyon yeteneği, yeni damar oluşturma ve immün sistemlerden kaçış gibi diğer özellikler kanser hücrelerinin hayatta kalmasını desteklemektedir. Yapılan son çalışmada kanserin ayırt edici özelliklerine ek olarak genomik kararsızlık, metabolizma değişiklikleri ve artan inflamasyon farklılıkları da eklenmiştir (Hanahan, 2022) (Şekil 1.1).



Şekil 2.1. Kanserın Ayırt Edici Özellikleri ((Hanahan, 2022)'den modifiye edilmiştir)

Kanser hücrelerinin karmaşık yapıları ve sağlıklı hücrelerden ayırt edici özellikleri göz önüne alındığında, kanser tedavi stratejilerinin hayati önemi ortaya çıkmaktadır. Kanser tedavisine yönelik yapılan yeni yaklaşımlar bireyselleştirilmiş kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Söz konusu tedavi yaklaşımları neticesinde kanser hücreleri yüksek derecede hedeflenmekte olup konvansiyonel tedavilere göre daha az yan etkiye neden olarak başarı oranını arttırmaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerinin cevap vermediği hasta profillerinde, kişiye özel olarak geliştirilen küçük molekül inhibitörler veya antikorların klinikteki başarıları dikkat çekmektedir (Savas et al., 2016). Sonuç olarak

meme kanserine yönelik geliştirilen genetik, epigenetik ve proteomik tedavi stratejilerinin standart kanser tedavilerine kıyasla önemli bir başarı elde ettiği aynı zamanda hastaların bireyselleştirilmiş kanser tedavilerine vereceği yanıtın takip edilebilir olması klinik başarının artmasına neden olacaktır (Tung et al., 2018).

2.2. DNA Hasar Yanıt Mekanizması

DNA, endojen ve eksojen kaynaklı birçok hasara maruz kalmaktadır. Replikasyon stresi, yanlış baz eşleşmesi, telomerlerin kısalması, baz kayıpları, oksidatif stres, iyonize radyasyon ve anti-kanser ilaçları DNA hasarına sebep olmaktadır (Lindahl and Barnes, 2000). Memeli hücrelerinde, genomik stabiliteyi tekrar düzenlemek için DNA hasarı meydana geldiğinde hasarın tespiti, iletimi ve tamirini sağlayan oldukça karmaşık bir DNA hasar yanıt (DDR: DNA damage response) mekanizması bulunmaktadır (Ciccia et al., 2010; Gundogdu et al., 2021; Jackson and Bartek, 2009). Metabolizma sırasında oluşan genomik hasarın onarılması amacıyla ilk olarak, G1/S, intra-S ve G2/M hücre döngüsü kontrol noktaları aktifleştirilerek hücre döngüsü anında durdurulmaktadır. DNA'da meydana gelen endojen ve eksojen hasarların tek baz değişimlerine, DNA tek zincir kırıkları ve DNA çift zincir kırıklarına neden olduğu bilinmektedir (Bartek et al., 2007; Deckbar et al., 2011; Wahl et al., 1997). Aynı zamanda sağlıklı bir hücrenin gün içerisinde binlerce DNA tek zincir kırığına ve yaklaşık 50 adet DNA çift zincir kırığına maruz kaldığı bilinmektedir (Vilenchik and Knudson, 2003). DNA'da meydana gelen çift zincir kırıkları, DNA hasarı neticesinde biriken tek zincir kırığı, eksojen kaynaklı hasarlar ve DNA hücresel metabolizma sürecinde meydana gelen mutasyonlar nedenleriyle oluştuğu saptanmıştır (Khanna and Jackson, 2001; Lindahl and Barnes, 2000). Oluşan DNA çift zincir kırıkları genel olarak homolog rekombinasyon tamir (HRR: homologous recombination repair) ve homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ: non-homologous end joining) mekanizmalarıyla onarıldığı bilinmektedir (Goldstein and Kastan, 2015). Söz konusu mekanizmalarla DNA hasarının tamirinin gerçekleşmediği durumlarda hücreler yaşlanma evresine alınmakta veya programlı ölüm mekanizmalarıyla elimine edilmektedir. Hücresel metabolizmanın regülasyonunun bozulması durumunda DNA tamir ve ölüm mekanizmaları tam olarak işlevlerini yerine getirememektedir. Bu durumda genomda biriken mutasyonlar neticesinde metabolizmada genomik kararsızlık oluşmakta olup

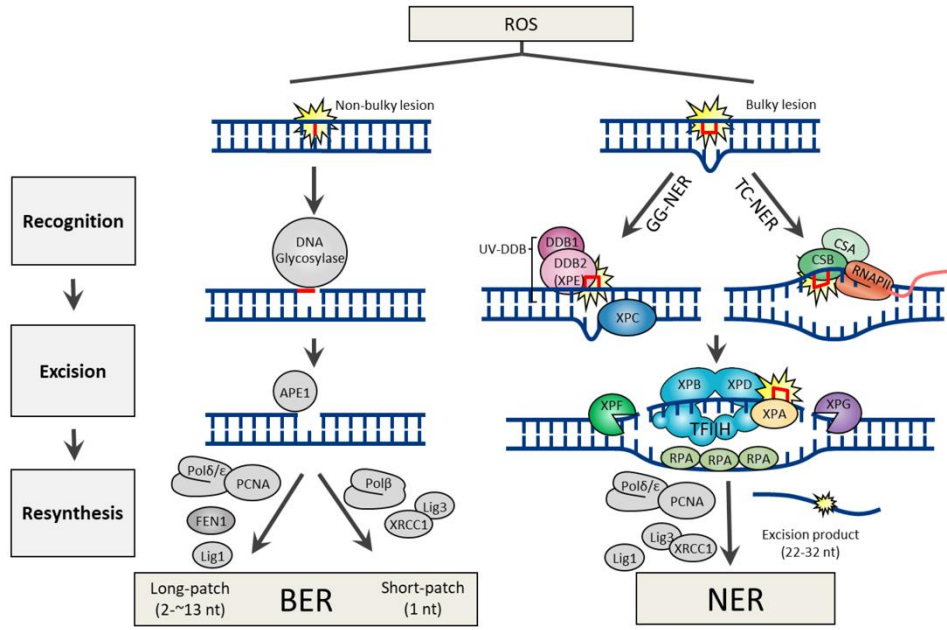
tümörojenitenin artmasına neden olmaktadır (Ciccia et al., 2010; Goldstein and Kastan, 2015; Jackson and Bartek, 2009).

2.2.1. DNA Onarım Sistemleri

Genetik materyal, yanlış baz eşleşmesi, oksidatif stres, telomer kısalması gibi endojen ve iyonize radyasyon, ultraviyole ışığı, ağır metaller gibi eksojen kaynaklı tehditlere maruz kalmaktadır. DNA maruz kaldığı hasarları ortadan kaldırmak için DDR onarım sistemine sahiptir (Toy vd., 2022).

DNA, endojen veya eksojen hasara maruz kaldığında yapısındaki bağların değişimi ve/veya dönüşümü sebebiyle mutasyonlar meydana gelmektedir. Mutasyonların birikmesi, tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonuna ve protoonkogenlerin aktivasyonu neticesinde hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olmaktadır (Hoeijmakers, 2009; Morita et al., 2010). Ortaya çıkan genomik kararsızlığın onarımı için hasar, UV kaynaklı veya pirimidin dimerleri şeklinde meydana gelmişse fotoreaktivasyon yada MGMT (O6-Metilguanin-DNA-Metiltransferaz) ile onarımı gerçekleştirilir. Fotoreaktivasyon ile onarım bakteri ve bitkilerde görülmekle birlikte ökaryotik hücrelerde bulunmamaktadır (Sancar et al., 2004). MGMT onarımı ise, sistein amino asidi varlığında DNA bulunan alkil gruplarının çıkarılması sağlanarak olası alkilleyici ajanlardan korunma sağlanmaktadır (Hansen et al., 2007; Slupphaug et al., 2003).

Baz eksizyon onarımı (BER), alkilenmiş ve oksitlenmiş bazların tamiri bu sistem ile gerçekleşmektedir. Glikozilaz enzimi varlığında DNA'da bulunan hasarlı bazlarla etkileşim sonucu ilgili bölgedeki glikozidik bağ kesilmektedir. Hasarlı bazın çıkarıldığı bölgeye yeni bazların eklenmesi ile onarım tamamlanmaktadır (Kumar et al., 2020; Lee and Kang, 2019). Nükleotit eksizyon onarımı (NER), DNA' da meydana gelen büyük çaplı hasarların onarılması sistemidir (Şekil 2.2). NER mekanizması genel olarak; DNA hasarının tanınması, hasarlı oligonükleotit fragmentinin kesilmesi, ilgili bölgenin DNA polimerazlar tarafından doldurulması ve ligasyon basamaklarından oluşmaktadır (Jeppesen et al., 2011).



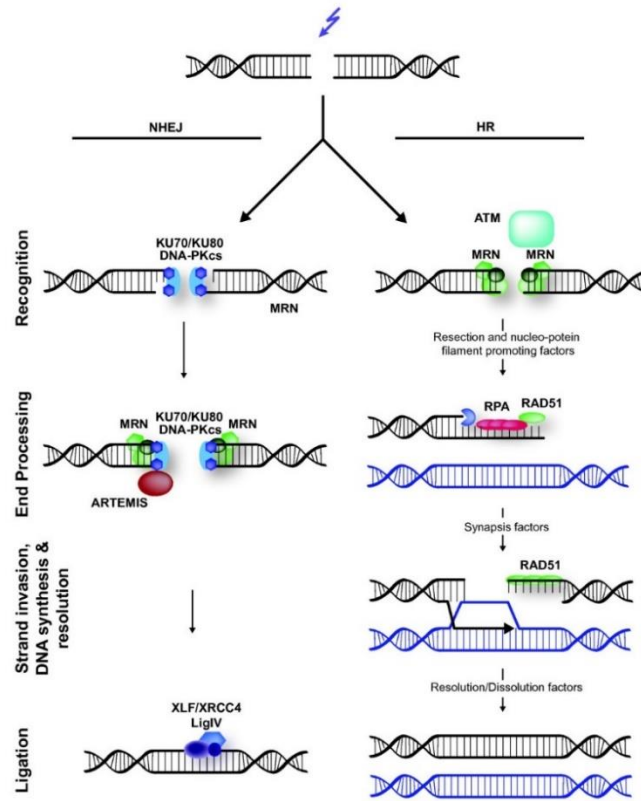
Şekil 2.2. Baz eksizyon onarımı ve Nükleotit eksizyon onarım sistemleri (T.-H. Lee and Kang, 2019)

DNA'nın endojen veya eksojen kaynaklı hasara uğraması sonucu oluşan DNA çift zincir kırıkları, homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi mekanizmalarıyla tamir edilmektedir. HR tamir sistemi, hücre döngüsünün S evresinin sonlarında ve G2/M evrelerinde aktif olarak DNA hasar onarımını gerçekleştirirken, NHEJ tamir sistemi ise hücre döngüsünün tüm evrelerinde aktif olarak DNA hasar onarımını gerçekleştirmektedir (Chapman et al., 2012; Ciccio et al., 2010; Goodarzi and Jeggo, 2013; Jasin and Rothstein, 2013; Krejci et al., 2012).

Homolog rekombinasyon çift zincir kırığı tamirinden sorumludur. DNA'da bulunan iki zincirden birinin kalıp olarak kullanılması ile onarım gerçekleşmektedir. HR esnasında kardeş kromatitteki bilginin doğrudan kopyalanması sonucunda bilgi kaybı gerçekleşmeyerek onarım sağlanmaktadır. DNA'da meydana gelen eksojen kaynaklı veya biriken tek zincir kırığının çift zincir kırığına dönüşmesi sonucunda meydana gelen hasarın ilk tespiti DNA histon proteini H2AX'in aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktive olmuş DNA histon proteini γ -H2AX olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra γ -H2AX, DNA hasar sensörü olan MRN heterotrimerik kompleksinin aktivasyonu ile hasarın anında tespit edilmesi sağlanmaktadır (Syed and Tainer, 2018; Tisi et al., 2020). MRN kompleksi, MRE11, NBS1 ve RAD50 proteinlerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Hasar tespitinin ardından MRE11 proteininin ile CtIP endonükleaz enzimi etkileşim sağlayarak

hasara uğrayan uçlara çentik açmaktadır. Kırık uçlar RAD50 tarafından stabil hale gelmektedir. NBS1 proteinin vasıtasıyla da ATM kinazın aktivasyonu sağlanmaktadır. Aynı zamanda NBS1 proteini ATM kinazın hasarlı kromatin bölgesine taşınmasında görev aldığı bilinmektedir (Ciccio et al., 2010; Goodarzi and Jeggo, 2013; Jasin and Rothstein, 2013). MRE11 tarafından atılan çentikten sonra EXO1 proteininin bölgeye gelmesiyle tek zincir stabilizasyonu sağlanmaktadır. EXO1 ve DNA2 tarafından tek zincirin kesilmesinin ardından, RPA (RPA70-RPA32-RPA14) protein kompleksi ilgili bölgeye gelerek zinciri nükleaz aktivitesine karşı korumaktadır. Daha sonra BRCA1-PALB2-BRCA2 kompleksleri tarafından RAD51 rekombinazın hasarlı bölgeye yüklenmesi gerçekleştirilir. RAD51 proteini hasarlı bölgeye yüklenince RPA kompleksi ortamdan uzaklaştırılır. RAD51 rekombinaz, nükleoprotein filamenti oluşturarak kardeş kromatidi istila ederek gerekli bilgiler kopyalanmaktadır. Ardından DNA polimeraz tarafından zincir uzatılarak DNA çift zincir kırığı tamiri gerçekleştirilmektedir (Chapman et al., 2012; Jasin and Rothstein, 2013; Krejci et al., 2012; Meyer et al., 2020).

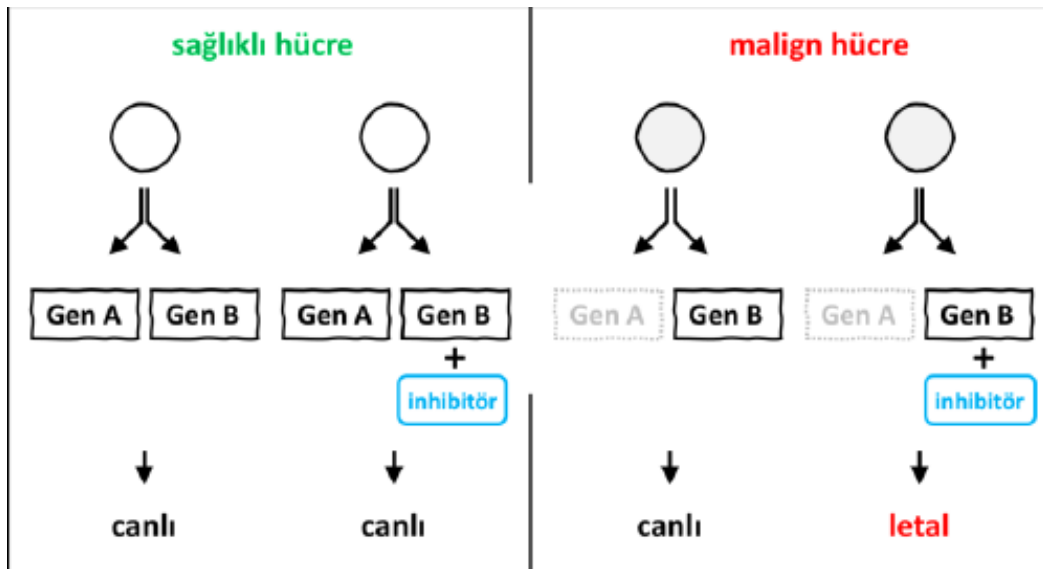
Homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ), hücre döngüsünün tüm aşamalarında aktif olarak çalışmaktadır. NHEJ onarım sisteminde meydana gelen hasarın bölgeden kesilip çıkartılması söz konusu olduğundan bilgi kaybı olmaktadır. DNA çift zincir kırığı esnasında hasar tespit proteinleri Ku70 ve Ku80 aktive olmaktadır. Ardından DNAPK fosforile olmaktadır (Şekil 2.3). Fosforillenmiş DNAPK tarafından artemis proteini fosforile edilmektedir. Artemis proteini hasarlı bölgedeki zincirin uçlarını kesmektedir. Kesim işleminin ardından ilgili bölgeye gelen XRCC4, Lig4 ve XLF protein kompleksleri kesilen uçları birleştirerek hasarı onarmaktadır (Chaplin et al., 2021; Patterson-Fortin et al., 2022).



Şekil 2.3. DNA çift zincir kırığı onarım sistemleri (Lans et al., 2012)

Kanser hücrelerinin tedavisinde yeni faktörlerin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarla, DNA hasar yanıt mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda terapötik hedefler ile başarının artacağı düşüncesi son yıllarda ilgi çekici bir hal almaktadır (Cleary et al., 2020; Huang et al., 2020; Jackson and Helleday, 2016; Nickoloff et al., 2017; O'Connor, 2015). DNA hasar yanıt ve HR tedavileri bağlamında sentetik letalite kavramı, DNA hasarı durumunda farklı yollalarda işlev gören iki faktörün eksikliğinin kombine edilerek hücre toksisitesinin artmasıyla birlikte hücre ölümüne neden olması, hücrelerin söz konusu metabolizmada sadece bir tane eksikliğin oluşması ise hücre sağ-kalımını desteklemesi şeklinde tanımlanmaktadır (Giovannini et al., 2019; Lord et al., 2015) (Şekil 2.4). DNA tek zincir kırığı tamirinde rol oynayan PARP enzimleri DNA hasarı durumunda kendi PAR zincirlerinin aktivasyonunu sağlayarak hasarın anında tespit edilmesi ve ilgili proteinlerin hasarlı bölgeye intikalini regüle etmektedir (Dréan et al., 2016; Lord et al., 2015). Bununla beraber DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarının tamirinde görev alan HR mekanizmasının (Goodarzi and Jeggo, 2013) yetersiz veya işlevsiz kaldığı durumlarda ilgili hücrelerin PARP inhibisyonuna karşı yüksek hassasiyet sergilediği rapor edilmiştir

(Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). BRCA1/2 proteinlerinin özellikle HR mekanizmasında önemli roller icra ettikleri bilinmektedir (Buisson et al., 2010; Deans and West, 2011; Densham et al., 2016). HR mekanizması tam olarak işlev görmeyen homozigot *BRCA1/2* mutasyonlu kanser hücreleri, heterozigot veya normal *BRCA1/2* allellerine sahip hücreler kıyaslandığında ilgili mutasyona sahip kanser hücrelerinin PARP inhibisyonlarına karşı yüksek hassasiyet gösterdikleri tespit edilmiştir (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Klinikte başarılı bir şekilde kullanılmakta olan ve kullanımı yaygınlaşan PARP inhibitörlerine karşı hastaların *de novo* veya zamanla direnç kazandığı tespit edilmiştir (Pettitt et al., 2018).

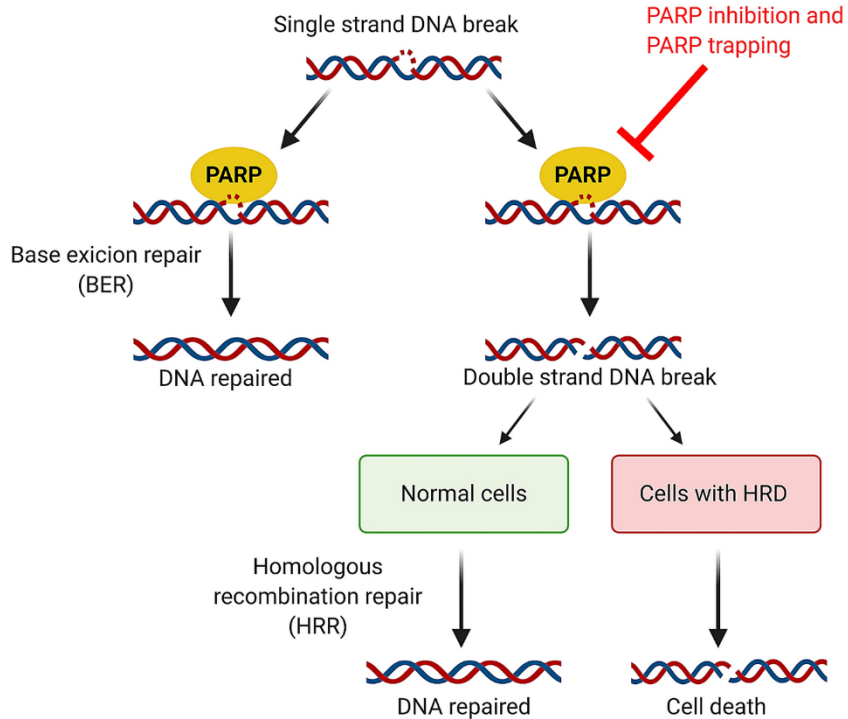


Şekil 2.4. Sentetik letalite mekanizması (Toy vd., 2022)

2.3. PARP ve PARP inhibitörleri

Hücresel mekanizmada DNA tek zincir kırık tamirinde rol oynayan PARP (poli [ADP-riboz] polimeraz) protein ailesi, 17 adet enzimden oluşmaktadır (Ashworth et al., 2018; Sonnenblick et al., 2015). PARP proteini çoğunlukla PARP ailesine ait olan 113 kDa ağırlığından oluşan PARP1 adı verilen polipeptid ile katalizör görevi görmektedir. PARP1, DNA'da meydana gelen tek veya çift zincir kırıklarında aşırı bir şekilde afiniteyle bağlanmaya yardımcı olan DNA-bağlanma domaini (DBD) barındırarak iki çinko parmak ismi verilen modeli oluşturmaktadır. Reaksiyonda substrat olarak NAD⁺ görev alarak parçalanan nikotinamid ADP-ribozil kısmı hedef proteinin glutamat veya yan zincirlerine

aktarılmaktadır (Bürkle et al., 2005). DNA’da meydana gelen tek zincir kırığı sonucunda, DNA’yı tamir etmek için proteinler, PARP enzimleri tarafından hasarın etrafına toplanmaktadırlar (Lord et al., 2015). Metabolizmada meydana gelen DNA çift zincir kırıklarının onarılmasında görev alan HR mekanizmasının defektif olduğu hücrelerde PARP inhibisyonuna karşı hassasiyet gösterdikleri saptanmıştır (Ciccia et al., 2010; Goodarzi and Jeggo, 2013). PARP’ın inhibisyonu sonucunda, DNA’da meydana gelen tek zincir kırıkları birikmekte ve özellikle hücre döngüsünün S safhasında yüksek oranda HR mekanizması ile tamir edilen DNA çift zincir kırıklarına dönüşmektedir. DNA çift zincir kırığı tamir mekanizmasının tam olarak işlev görmediği hücrelerde apoptoz yani programlı hücre ölümü meydana gelebilmektedir (Ciccia et al., 2010). Ayrıca, kimyasal inhibisyon neticesinde PARP enzimleri kromatin üstünde asılı bir şekilde kalmaktadır. PARP tuzaklanması (*Ing. PARP trapping*) olarak isimlendirilen bu durum, DNA metabolizmasının işleyişi (transkripsiyon, replikasyon, DNA tamiri vd.) açısından engel teşkil etmekte ve sonuç olarak DNA hasarına neden olmaktadır (Şekil 2.4). Yapılan çalışmalarda, PARP’ın küçük molekül inhibitörler vasıtasıyla kimyasal inhibisyonunun siRNA vasıtasıyla genetik inhibisyonundan daha sitotoksik etki göstermesi söz konusu hipotezi güçlendirmektedir (Murai et al., 2012).



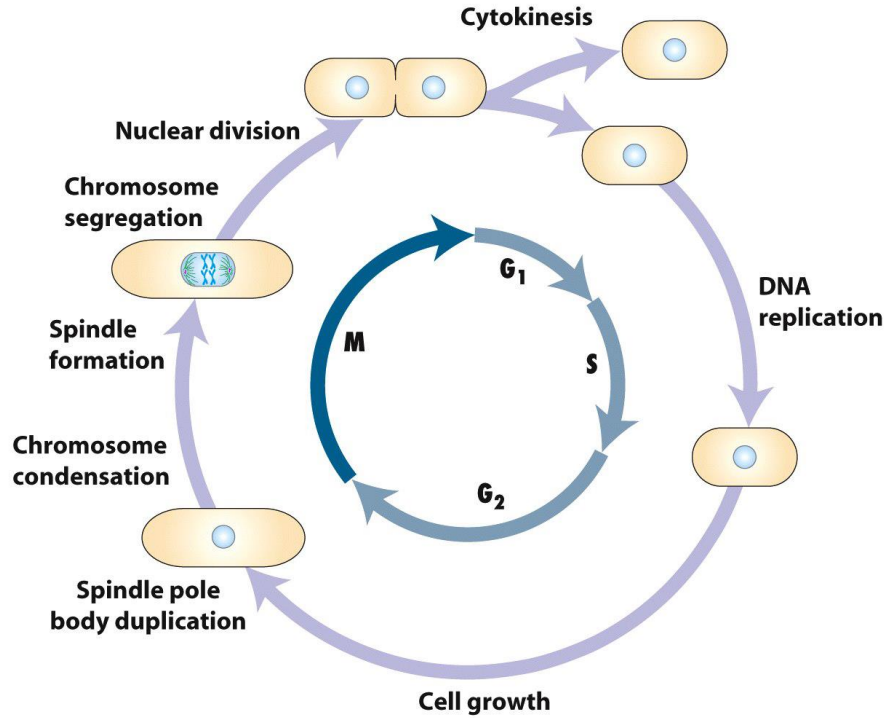
Şekil 2.4. PARP mekanizması (Bruin et al., 2022)

Bireyselleştirilmiş kanser tedavileri noktasında PARP enzim inhibisyonu ile klinikte önemli başarılar elde edilmiştir. Çok sayıda küçük molekül PARP inhibitörleri (örn. olaparib, rucaparib, veliparib vd.) kullanılarak PARP enzim inhibisyonu ile monoterapi, radyoterapi ve/veya kemoterapi ile kombinasyonu şeklinde klinik öncesi ve klinik açıdan sonuçlar değerlendirilmektedir. PARP inhibitörlerinin, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda sıkça kullanıldığı bilinmektedir. Şuana kadar çalışılan PARP inhibitörleri, olaparib, rucaparib, veliparib, pamiparib, fluzoparib ve talozoparib olarak sıralanabilmektedir. PARP inhibitörlerinden olaparib (Lynparza), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Dairesi (EMA) tarafından onay verilen ilk PARP inhibitörü olma özelliğini taşımaktadır. Söz konusu onaylar, 2014 yılında ileri evre kalıtsal BRCA-mutant yumurtalık kanseri hastalarının tedavisine yönelik yapılan çalışma ile verilmiştir (Kaufman et al., 2015). Olaparib, 2018 yılında BRCA-mutant HER2-negatif meme kanseri hastaları, 2019 yılında BRCA-mutant metastatik pankreas kanseri hastaları ve 2020 yılında HR-defektif, metastatik ve kastrasyon-dirençli prostat kanseri hastalarının tedavileri için onay aldığı bilinmektedir (de Bono et al., 2020; Golan et al., 2019; K. Moore et al., 2018; Robson et al., 2019). Bir diğer PARP inhibitörlerinden Rucaparib (Rubraca) ise 2016 yılında ileri evre kalıtsal veya somatik BRCA-mutant yumurtalık kanseri hastalarının tedavisi için onay aldığı bilinmektedir (Oza et al., 2017). Bununla birlikte, 2020 yılında BRCA-mutant metastatik kastrasyon-dirençli prostat kanseri hastalarının tedavileri için onay aldığı bilinmektedir (Abida et al., 2019). Talazoparib (Talzenna) ve Niraparib (Zejula) kanser tedavileri için onay alan bir diğer PARP inhibitörleridir (Ettl et al., 2018; González-Martín et al., 2019; Mirza et al., 2016; Moore et al., 2019). Pamiparib, 2021 yılında beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onay aldığı bilinmektedir (Markham, 2021). Fluzoparib ise 2021 yılında yumurtalık kanseri hastalarının tedavisi için onay almıştır (L. Li et al., 2021). Veliparib (Baxter et al., 2020) molekülü için ise klinik araştırmaların devam ettiği bilinmektedir. Şu ana kadar geliştirilen PARP inhibitörleri arasında talazoparibin PARP-tuzaklama kapasitesinin en yüksek olduğu, veliparibin ise diğer PARP inhibitörlerine kıyasla çok daha sınırlı tuzaklama yapabildiği saptanmıştır (Pilié et al., 2019). PARP inhibitörlerinin kullanımı klinik öncesi ve klinik sonrası tedavilerde iyi sonuçlar sağlamış olsa da ilaca karşı oluşturulan direnç neticesinde klinikte tedavi başarısını olumsuz etkilemektedir (Bitler et al., 2017.; D'Andrea, 2018).

2.4. Hücre Döngüsü ve Regülasyonu

Hücrenin büyümesi, gelişmesi ve bölünme safhalarının gerçekleştiği kompleks süreç hücre döngüsü adı verilmektedir. Hücre döngüsünün temelinde, DNA replikasyonu ile genetik materyalin iki katına çıkartılması ve aynı özelliklere sahip iki yeni yavru hücre oluşumu yer almaktadır. Bir hücrenin bölünme yeteneği kazanabilmesi için yeterli büyüklüğe ulaşması ve dışarıdan bölünme sinyallerini alması gerekmektedir (Matthew et al., 2024; H. Yin et al., 2019).

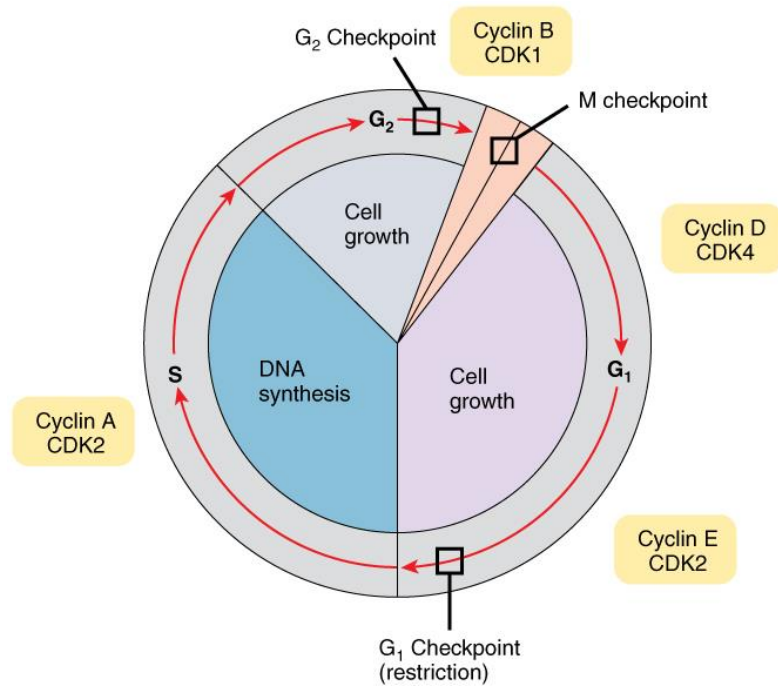
Hücre bölünmesi iki ana safhadan oluşmakta olup memeli hücrelerde yaklaşık 16 saat sürmektedir. Hücre bölünmesinin ilk aşaması interfazın G1 evresinde gerçekleşmektedir. G1 evresi, hücrenin bölünüp bölünmeyeceğine karar vermektedir. Hücre bölünmesi için hazırlık safhası olan G1 evresinde eğer hücre bölünmek için yeterli büyüklüğe sahip değilse hücreyi G0 denilen dinlenme evresine göndermektedir. Hücreye bölünme sinyali geldiğinde ise G0 evresinden çıkarak hücre döngüsüne girebilmektedir (Chen, 2016; Sun et al., 2018). G1 evresi, DNA sentezi için gerekli proteinlerin ve RNA'nın sentezlendiği safhadır. S evresinde ise DNA miktarı iki katına çıkartılır. RNA sentezi ve protein sentezleri devam etmektedir. DNA replikasyonu gerçekleştikten sonra G2 safhasında mitoz bölünme için hazırlık yapılmaktadır. Mitoz bölünme 4 ana safhadan oluşmakta olup bunların; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olduğu bilinmektedir (Şekil 2.6). Bu safhalarda sentrozomlar oluşturulur, kromozomlar kısalıp kalınlaşmakta, kardeş kromatitlerin kutuplara çekilerek sitokinez sonucunda iki aynı özellikte olan yavru hücre meydana gelmektedir (Carlton et al., 2020; H. Li et al., 2016; Sun et al., 2018).



Şekil 2.6. Hücre döngüsü safhaları (Alberts et al., 2008)

Hücre döngüsü kompleks aşamalardan oluşmakta olup birçok kontrol noktası barındırmaktadır. Evrimsel olarak tüm canlılarda korunduğu bilinen kontrol noktaları, interfaz evresinin G₁, S ve G₂ fazlarında bulunmaktadır. İnterfaz evresindeki kontrol noktalarında DNA sentezinin düzgün gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmektedir. Mitoz safhasındaki kontrol noktasında ise kromozomların doğru dizilimi, eksiksiz bölünmenin kontrolü sağlanmaktadır (Chen, 2016; Gupta et al., 2018). Hücre döngüsü kontrol noktaları siklinler ve siklin bağımlı kinazlar tarafından regüle edilmektedir. Siklinler ve siklin bağımlı kinazların (CDK) bir araya gelerek oluşturdukları kompleksler temel kontrol sistemlerini oluşturmaktadır. Hücre döngüsü safhası boyunca siklinlerden A, B, D ve E aktif rol oynamakta, CDK'lerden ise CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6 aktif olarak rol oynamaktadır (Ullah et al., 2019; Wenzel and Singh, 2018). Hücre döngüsünün kontrolü için ilk üretilen siklin çeşidinin siklin D olduğu bilinmektedir. Siklin D, CDK4 ile bir araya gelerek oluşturdukları kompleks vasıtasıyla retinoblastoma proteini fosforile edilmektedir. Retinoblastomanın fosforilasyonu ile E2F aktive edilerek siklin E CDK2 kompleksi oluşturulur. Oluşturulan bu kompleks hücrenin G₁ evresinden S evresine geçişini düzenlemektedir. Siklin D CDK4/6 kompleksi ve siklin E CDK2 kompleksi hücre döngüsünün tamamlanmasında rol oynamaktadır (Weinberg, 1995; Weinstein et al., 2015).

Siklin A CDK2 kompleksi S evresinin regülasyonunu sağlamaktadır. Siklin B CDK1 kompleksi ise mitoz safhasına geçiş noktasının kontrolünü üstlenmektedir. Hücre döngüsünün kontrol noktalarında herhangi bir sorun tespit edilmesi durumunda ilk olarak hücre döngüsü durdurulur. Hasar tespit proteinlerinin aktivasyonu sağlanarak hasarın onarımı gerçekleştirilir. Oluşan hasar onarılamazsa apoptotik yolların aktivasyonu ile hücre elimine edilmektedir (Sherr and Bartek, 2017) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Hücre döngüsü kontrol noktaları (Dalton, 2015)

2.5. Apoptozis Mekanizması

Apoptozis terimi ilk kez hücre ölümünün morfolojik olarak farklılığını anlatmak için kullanılmıştır (Kerr et al., 1972). Programlı hücre ölüm mekanizması olan apoptozis, hasara uğramış, bölünme yeteneğini kaybetmiş veya sürekli bölünme eğiliminde olan hücrelerin eliminasyonunu sağlamaktadır. Apoptozis mekanizması ile elimine olacak hücrelerde ilk olarak su kaybıyla birlikte büzüşme meydana gelmektedir. Akabinde, çekirdeğin parçalanması ile birlikte hücresel komponentlerin yoğunlaşması görülmektedir. Yoğunlaşmanın ardından apoptotik cisimciklere parçalanarak eliminasyonları gerçekleştirilmektedir (Chaabane et al., 2013; Marino et al., 2014). Hücrede meydana gelen endojen ve/veya eksojen kaynaklı DNA hasarları, oksidatif stres ve büyüme

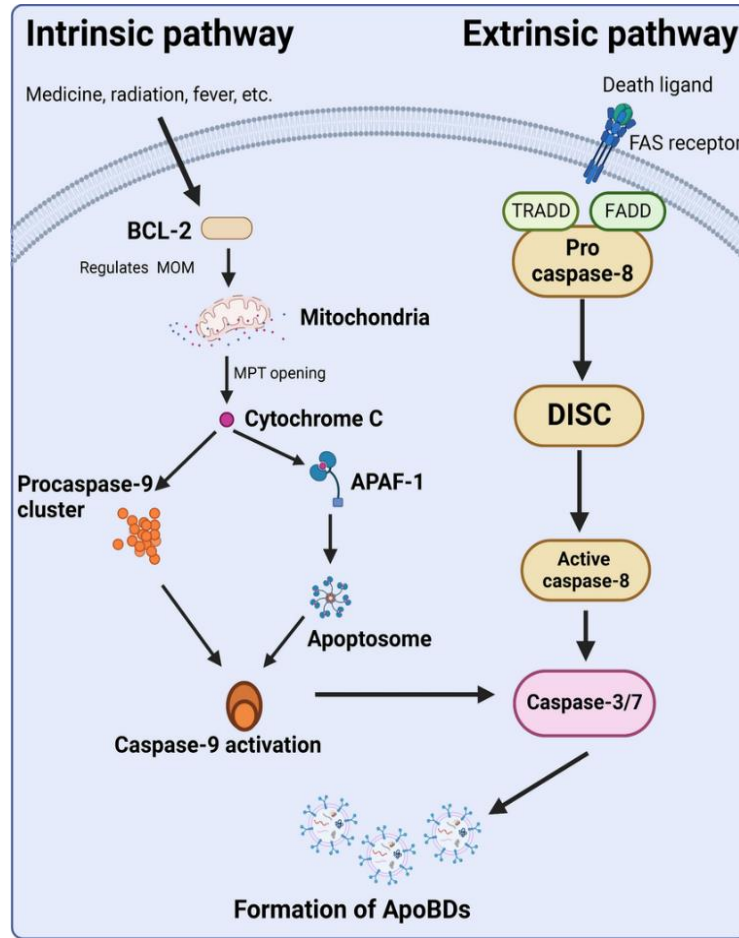
hormonlarındaki azalmaya bağlı olarak apoptozis mekanizması tetiklenebilmektedir. Hücrelerde meydana gelen bu süreç iki farklı biyokimyasal apoptozis yoluyla ile regüle edilmektedir. Bu programlı ölüm yolları dışsal ve içsel yolak olarak sınıflandırılmaktadır (Adams and Cory, 2001; Danial et al., 2004).

Ekstrinsik (Dışsal) apoptozis, hücre zarının dış kısmında var olan reseptörlere dışardan gelen ölüm sinyallerinin bağlanması aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ölüm reseptörleri kaspaz kaskadını aktifleştirerek hücrelerin programlı bir şekilde eliminasyonunu sağlamaktadır. Hücre zarı yüzeyinde bulunan reseptörler TNF (Tumor necrosis factor) gen ailesine mensup olup yapılarında ölüm domaini bulunmaktadır. Ölüm domainlerinin görevi ise hücre dışından gelen ölüm sinyallerini hücre içine iletmektir. Gelen ölüm sinyalleri kaspazların aktivasyonunu sağlayarak DNaz enzimi aracılığıyla hücrelerin programlı ölümü gerçekleşmektedir (Elmore, 2007).

Mitokondriyal yolak olarak da bilinen intrinsik (içsel) apoptozis, hücre içi sinyaller aracılığıyla regüle edilmektedir. İçsel yolak, hücre içerisinde meydana gelen viral enfeksiyonlar, DNA hasarı ve birçok hücrel stres sonucunda aktive olmaktadır. Apoptozise uğrayacak olan hücrenin mitokondri dış zarında meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda zar geçirgenliği artarak por oluşumu gözlenmektedir. Bir takım protein grupları oluşan bu porlardan sitozole salınarak içsel apoptozis mekanizmasının aktivasyonunu sağlamaktadır. Mitokondri porlarından salınan sitokrom c, sitozolde Apaf-1 proteinine bağlanarak apoptozom kompleksini meydana getirmektedir. Apoptozom kompleksi, pro kaspaz 9'un aktivasyonunu sağlamaktadır. Aktif kaspaz 9 ise kaspaz 3 ü aktifleştirmektedir. Aktif kaspaz 3, kaspaz aktive edici DNazı (CAD) aktifleştirerek kromatin yoğunlaşmasıyla birlikte DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde fragmentasyonu gerçekleştirilir (Şekil 2.8). Özetle, mitokondri dış zarının geçirgenliğinin artması ve bunu takip eden kaspaz akışı sayesinde hücre içerisinde intrinsik yolak tamamlanmış olmaktadır (Elmore, 2007; Fan et al., 2005; Susin et al., 1997).

Bcl-2 ailesi içsel apoptoz yolacağının önemli bir düzenleyicisi olarak görev almaktadır. Bcl-2 ailesi üyeleri homoloji domainleri (BH) içererek apoptotik sürecin düzenleyici olarak pro-apoptotik proteinler (BAX, BAK et al.), anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl2A1, Bcl-2xL vd.) ve sadece BH3 domaini içeren (NOXA, PUMA, BAD vd.) proteinler olarak

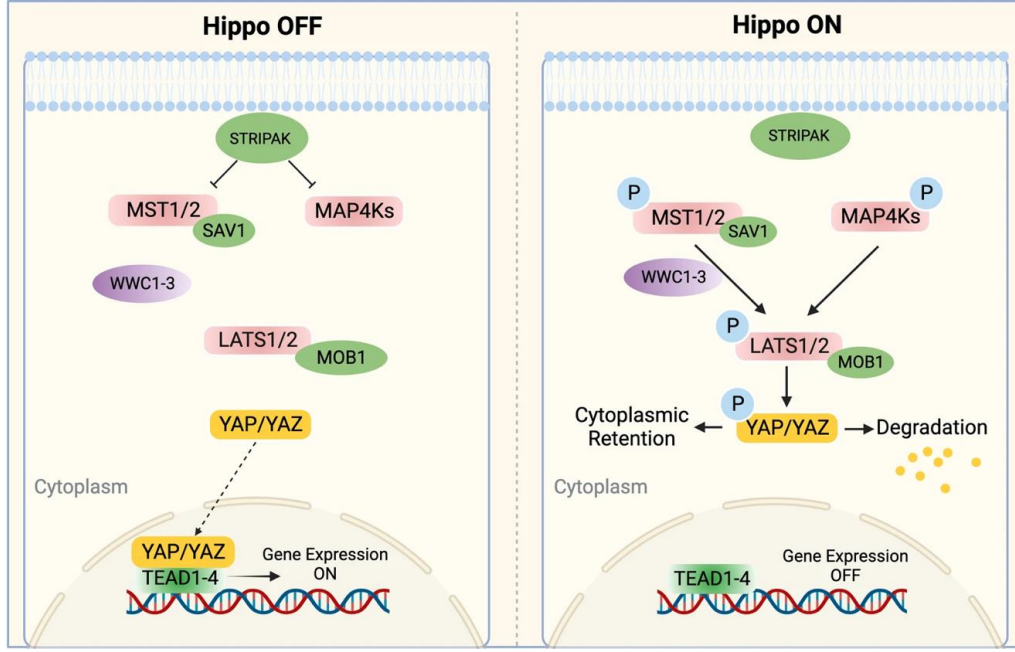
sınıflandırılır (Adams and Cory, 2018; Czabotar et al., 2014). İçsel yolakta oluşan oksidatif stres, yetersiz sitokin aktivitesi ve sitotoksik ilaç maruziyeti gibi durumlarda Bcl-2 pro-apoptotik markerlerin ekspresyonu artarak programlı hücre ölümü gerçekleşmektedir. Özellikle BAX ve BAK proteinlerinin aşırı ekspresyonu ile mitokondri por yapısı bozularak sitokrom c gibi apoptoz aktivatör proteinlerin salınımı gerçekleştirilir. Ardından apoptotik süreç tamamlanmaktadır. Bcl-2 proteinlerinin özellikle içsel apoptozis de kilit rol oynadığı bilinmektedir. Pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aksine anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri apoptozisi baskılamaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aşırı aktivasyonu hücre sağ-kalımını desteklediği gibi ilaç direncide oluşturmaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesinin üyelerinden biri olan BCL2A1 proteininin, kanser hücrelerinde gelişen anti-proliferatif etkinin ortadan kaldırılmasında rol oynayarak kanser hücre sağ-kalımını desteklediği bilinmektedir (Al-Bedeary et al., 2020; García-Aranda et al., 2018; Tzifi et al., 2012).



Şekil 2.8. İçsel ve Dışsal apoptozis mekanizması (Yu et al., 2023)

2.6. Hippo Sinyal Yolağı

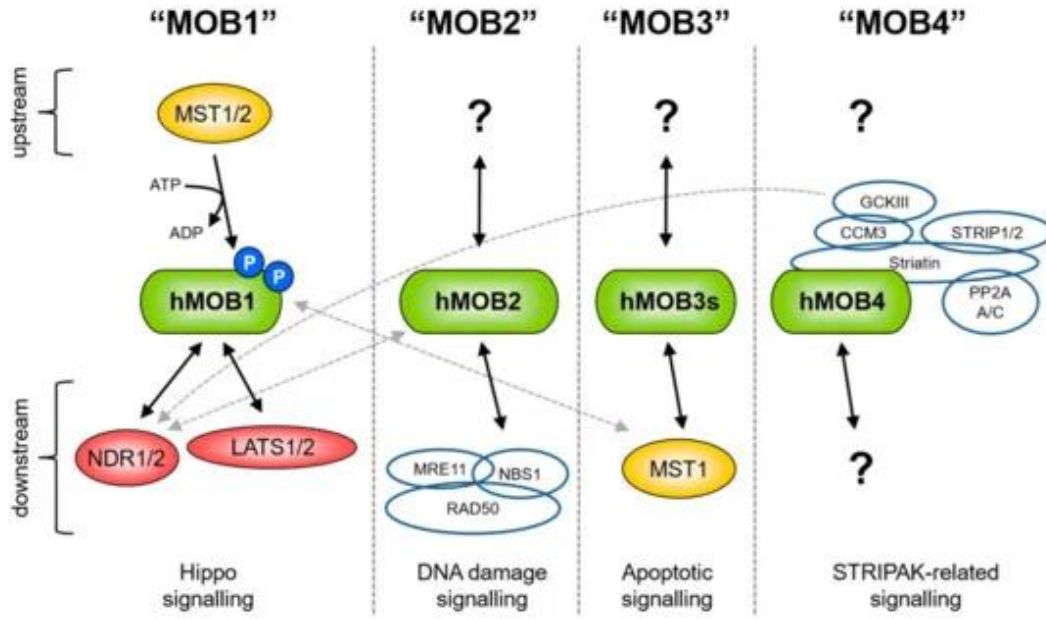
Hippo sinyal yolağı, merkezi bir düzenleyici olarak doku homeostazi ve organ büyüklüğünün kontrolünü sağlamaktadır. Hippo sinyal yolağının keşfi *Drosophila Melanogaster* model organizmasının *Warts* gen kaybı üzerine yapılan çalışmalarla bulunmuştur (Justice et al., 1995; Xu et al., 1995). *Salvador* (Sav), *Hippo* ve *Mob* genlerinde oluşan mutasyonlar neticesinde, apoptosis mekanizması engellenerek aşırı doku büyümesiyle tümör oluşumu tetiklenmektedir (Huang et al., 2005; Kango-Singh et al., 2002). Hücre içi ve dışı sinyallerin alınması, doku yeniden düzenlenmesi, doku-organ bütünlüğünün korunması gibi birçok temel faktörlerin regülasyonu hippo sinyal yolağı üzerinden gerçekleşmektedir. Transkripsiyon ko-aktivatörlerinden YAP ve TAZ hippo sinyal yolağı fosforilasyonunu ve inaktivasyonunu düzenlemektedir. YAP-TAZ aktivasyonu ile çok sayıda hastalık ilişkilendirilmiştir (Meng et al., 2016; Mo, 2017). Hippo sinyal yolağının memelilerdeki temel bileşenlerinden memeli Ste20 benzeri kinazlar (MST1/2), tümör baskılayıcı kinazlar (LATS1/2), adaptör proteinlerden SAV1, MOB kinaz aktivatörü (MOB1A/B) ve mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAP4K1-7) gibi birçok faktör bu yolağın düzenlenmesinde görev almaktadır (Meng et al., 2016). Genel olarak hippo sinyal yolağı, fosforilasyona dayalı bir düzenleme yaparak hücre regülasyonu, hormonal sinyaller ve YAP-TAZ aktivitelerinin kontrolünü sağlamaktadır (Yu et al., 2015) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Hippo sinyal yolağı (Fu et al., 2022)

2.6.1. MOB2 Proteinini

MOB (*Ing.* monopolar spindle-one-binder proteins) protein ailesi insan hücrelerinde hMOB1/A (human MOB1A), hMOB1B, hMOB2, hMOB3A, hMOB3B, hMOB3C ve hMOB4 MOB proteinleri keşfedilmiştir (Gundogdu and Hergovich, 2019) (Şekil 2.10). Ökaryot hücrelerde yüksek oranda korunduğu bilinen MOB proteinlerinden hMOB2 nükleusta lokalize olurken hMOB1A/B ve hMOB3 proteinleri sitoplazmada lokalize olmaktadır (Hergovich et al., 2005). Yapılan çalışmalarla hMOB1A/B proteinlerinin LATS1/2 ile etkileşim içinde olduğu ve NDR1/2 kinaz aktivitesini destekleyici profil sergilediği belirlenmiştir. hMOB2 proteini ise sadece NDR1/2 ile etkileşim içinde olduğu ve bu etkileşimin NDR1/2 kinaz aktivitesinin inhibisyonuyla gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu nedenle hMOB1A/B proteinleri NDR1/2 ko-aktivatörü, hMOB2 proteinleri ise NDR1/2 kinaz inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Bothos et al., 2005; Hergovich et al., 2006; Kohler et al., 2010). Onkogenik hücrelerin tümörleşme safhalarında artan hMOB2 mRNA seviyelerinin özellikle karaciğer kanseri hücreleri ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Höpfner et al., 2001). Ayrıca hMOB2 geninin yumurtalık, mesane, testis ve servikal gibi karsinomlarda yüksek oranda heterozigozite kaybı görüldüğü saptanmıştır (Brines and Cerami, 2012; Cotta-Ramusino et al., 2011; Höpfner et al., 2001).



Şekil 2.10. İnsan MOB proteinin hücresel regülasyonu (Gundogdu and Hergovich, 2019)

Kohler ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada, MOB protein ailesinden biri olan hMOB1A/B proteininin sitoplazmada lokalize olduğu ve NDR1/2 kinaz aktivitesini desteklediği saptanmıştır. Özellikle nukleusta lokalize olduğu bilinen hMOB2 (Hergovich et al., 2005) proteininin ise NDR domainine bağlanarak NDR1/2 kinaz aktivitesini engellediği gösterilmiştir (Kohler et al., 2010). Bu bilgiler ışığında hMOB2'nin sadece fosforillenmemiş NDR1/2 ile etkileşim içinde olduğu ve NDR1/2 kinaz inhibitörü olarak işlev gördüğü belirlenmiştir (Kohler et al., 2010). Daha önceki çalışmalarda NDR1/2 ve hMOB1A/B'nın etkileşiminin sentrozom duplikasyonu ve apoptotik yollar için önemli olduğu vurgulanırken (Hergovich et al., 2009), hMOB2 proteininin NDR1/2 inhibisyonunu sağlaması NDR1/2 üzerinden gerçekleştirilen biyolojik fonksiyonların engellendiği tespit edilmiştir (Kohler et al., 2010). Kohler ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada sadece hMOB2 biyokimyası üzerinde durulmuş olması hMOB2'nin biyolojik fonksiyonlarının anlaşılması gerektiğini göstermiştir. hMOB2 proteininin, NDR1/2 protein kinazları ile olan ilişkisi Kohler ve ark. (2010) tarafından tespit edilmesinin ardından hMOB2'nin muhtemel bir DDR regülatörü olabilme potansiyeli Gomez ve ark. (2015) yaptığı çalışmada açıklığa kavuşmuştur (Gomez et al., 2015). Gomez ve ark. (2015) yapmış oldukları çalışmada, hMOB2 proteininin hücre döngüsü ve DDR regülasyonunda görev aldığı saptanmıştır (Gomez et al., 2015). hMOB2 biyolojisini anlamak üzere RNA interferans yöntemi ile sağlıklı insan hücrelerinde hMOB2 mRNA'sı baskılanmıştır. hMOB2 baskılanmasının

DNA hasar birikimine yol açtığı ve artan ATM-CHK2-p53-p21 protein aktivitesiyle hücre döngüsünün G1/S fazında durdurulduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, hMOB2 baskılanmasının DNA hasarı tamirinde rol oynayan ATM-NBS1-SMC1 proteinlerinin aktivasyonunu etkilediği gösterilerek, hMOB2'nin DDR sisteminde önemli bir faktör olabileceği vurgulanmıştır. hMOB2 defektif hücrelerde MRN-ATM komplekslerinin hasarlı kromatin bölgesine yüklenmediği ve hMOB2'nin MRN kompleks üyelerinden RAD50 ile etkileşim içinde olduğu tespit edilmiştir (Gomez et al., 2015). Çalışmanın devamında, hMOB2 defektif U2OS hücrelerine uygulanan IR (iyonize radyasyon) ve doksorobisin ilaç tedavilerine karşı kanser hücre sağ-kalımını desteklediği bildirilmiştir (Gomez et al., 2015). Gomez ve ark. (2015) yaptığı çalışmanın yanı sıra hMOB2 moleküler mekanizmasının anlaşılması noktasında, DDR sisteminde rol oynadığı bilinen MRN kompleksinin hMOB2 ile etkileşiminin tam olarak aydınlatılması, kemoterapi ilaçlarıyla birlikte kombine ilaçlar/moleküller kullanılarak hMOB2'nin sentetik letal etkileşimleri üzerine yoğunlaşılması gerekmektedir.

Gündoğdu ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada ise kemoterapik ilaç ve PARP inhibitörleri (olaparib, rucaparib, veliparib) kullanılarak hMOB2 statüsünün belirlenmesi, DDR tamir mekanizmasında hMOB2 proteininin öneminin saptanması üzerine durulmuştur (Gundogdu et al., 2021). Yapılan çalışmada, DNA çift zincir kırık tamir mekanizmalarından biri olan homolog rekombinasyon yolağının, hMOB2 defektif hücrelerde tam olarak işlev görmediği saptanmıştır. DNA hasarı tamiri esnasında RPA ve RAD51 proteinlerinin hasarlı kromatine yüklenmeleri immunofloresans yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve RPA kompleksinin yüklenmesinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği ancak RAD51 yüklenmesinin gerçekleşmediği tespit edilmiştir (Gundogdu et al., 2021). U2OS hücreleri kullanılarak yapılan söz konusu çalışmada, PLK1 kaynaklı RAD51 Ser14 fosforilasyonunun azaldığı ve dolayısıyla hasarlı kromatinde RAD51 yüklenmesinin yeterli olmadığı saptanmıştır. Yapılan koloni sağ-kalım analizleriyle de ise hMOB2 baskılanmış hücrelerde DNA çift zincir kırığına neden olan bleomisin, MMC, sisplatin ve PARP inhibitörlerine karşı hassasiyet geliştiği belirlenmiştir (Gundogdu et al., 2021). Özetle elde edilen sonuçlar, azalan hMOB2 ifadesinin; (i) RAD51 Ser14 fosforilasyonunun, RAD51 nükleoprotein filament oluşumunun ve dolayısıyla HR aktivitesinin azalmasına, (ii) hücresel metabolizmaların neticesinde oluşan endojen DNA çift zincir kırıklarının onarılamamasına ve (iii) biriken hasarın ATM-CHK2-p53-p21

protein yolağını aktive ederek hücre döngüsünün durdurulmasına neden olduğunu göstermiştir (Gomez et al., 2015). hMOB2'nin biyokimyasal mekanizmasının biyolojik neticelerini araştırmak üzere gerçekleştirilen koloni sağ-kalım testleri ise, hMOB2 proteininin çeşitli kemoterapi, radyoterapi ve küçük-moleküler inhibitör tedavilerine karşı kanser hücrelerinin koloni sağ-kalımını desteklediğini göstermiştir (Gomez et al., 2015; Gundogdu et al., 2021), Azalan hMOB2 ifadesinin, kanser hücrelerini topoizomerez inhibitörü doxorubicin, IR (Gomez et al., 2015), DNA ICL ajanları MMC ve sisplatin, PARP inhibitörleri olaparib, rucaparib ve veliparib tedavilerine karşı daha duyarlı hale getirdiği tespit edilmiştir (Gundogdu et al., 2021).

Yapılan çalışmalar dikkate alındığında, hMOB2 moleküler mekanizmasının ve çeşitli hücresel yollarda rol oynayan bileşenlerle olan sentetik letal etkileşimlerinin ortaya çıkarılması bireyselleştirilmiş kanser tedavi stratejilerine katkı sağlayacağı ön görülmüştür. Bu nedenle yapılan tez çalışması ile hMOB2 proteininin subsellüler lokalizasyonu belirlenerek DNA hasar yanıt mekanizmasında görevli olduğu bilinen proteinlerle muhtemel etkileşimleri incelenmiştir. Aynı zamanda meme kanseri hücre hattı kullanılarak hMOB2 mRNA'sı geçici olarak baskılanmış olup bu baskılanmanın biyolojik düzeyde öneminin olup olmadığı araştırılmıştır. Söz konusu yapılan tüm tez çalışmasıyla hMOB2'nin önemli bir DDR regülatörü olabileceği yinelenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzeme ve Kimyasallar

Tablo 3.1. Bakteriyel çalışmalarda kullanılan besiyerleri

MALZEMELER	MARKA	KATALOG NUMARASI
%2,5 w/v LB base	Sigma	L3022
%1,5 w/v Agar	Sigma	L2897
10 mM MgSO ₄	Sigma	M7506
%0,5 w/v Yeast extract	Sigma	70161
%1 w/v NaCl	Sigma	S9888
%1 w/v Tryptone	Sigma	70172

Tablo 3.2. DNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi için kullanılan materyaller

DNA yükleme tamponu (6X)		
%40 w/v	Sükroz	Sigma, 84097
%10 w/v	Bromofenol mavisi	Sigma, B0126
TBE tampon (Tris-Borate-EDTA)		
1 M	Tris base	Sigma, T1503
1 M	Borik asit	Sigma, B6768
0,02 M	0,5 M EDTA, pH 8.0	Sigma, E5134

Tablo 3.3. Moleküler Biyoloji çalışmalarında kullanılan ticari kitler

MALZEMELER	MARKA	KATALOG NUMARASI
Bakteriyel Plazmid DNA izolasyon	Hibrigen	#MG-BPDNA-01-50
Total RNA izolasyon RNeasy Mini	Qiagen	#74104
cDNA RT2 First Strand Kit	Qiagen	#330401
RT2 SYBR Green qPCR Mastermix	Qiagen	#330501

Tablo 3.3. (Devamı) Moleküler Biyoloji çalışmalarında kullanılan ticari kitler

RT2 Profiller PCR Array p53 Signaling Pathway	Qiagen	#330231
Genomik DNA izolasyon	Hibrigen	#MG-GDNA-01-250

Tablo 3.4. İmmunofloresans analizinde kullanılan materyaller

MALZEMELER	MARKA	KATALOG NUMARASI
%3 PFA (paraformaldehit)	Sigma	P6148
%2 süktroz	Sigma	84097
%10 PBS	Gibco	14190094
%0,5 Triton X-100	Sigma	T9284
%10 Serum	Sigma	G6767

Tablo 3.5. İmmunofloresans analizinde kullanılan antikorlar

Primer antikorlar		
anti-H2AX	Cell Signaling Technology, #80312	1:100
anti-53BP1	Santa Cruz, #sc517281	1:200
anti-RAD51	Santa Cruz, #sc53428	1:100
anti-hMOB2	hibrodoma, epitomics (Gundogdu et al., 2021)	1:50
Sekonder antikorlar		
IgG-FITC	Rabbit, Santa Cruz, #sc-2359	1:200
IgG-TR	Mouse, Stratech, # 715-075-151	1:200

Tablo 3.6. Western blot analizinde kullanılan çözeltiler

Standart lizis tampon (150 mM)		
20 mM	1 M Tris-HCl, pH 8.0	Sigma, T1503
150 mM	NaCl	Merck, 106404.1000
%10	Gliserol	Sigma, G5516
%1	NP-40	Sigma, 74385
5 mM	0.5 EDTA, pH 8.0	Sigma, 31064
0,5 mM	0.5 EGTA, pH 8.0	Sigma, E3889

Tablo 3.6. (Devamı) Western blot analizinde kullanılan çözeltiler

20 mM	Beta-gliserofosfat	Sigma, G9422
50 mM	0.5 NaF	Sigma, S7920
1 mM	Na ₃ VO ₄	Sigma, S6508
Proteaz inhibitörleri (stok 1000X)		
1 mM	DTT	BioShop Ca, DTT001.10
1 mM	Benzamidin	Sigma, 12072
0,5 mM	PMSF	Sigma, 78830
1 mM	Löpeptin	Enzo, ALX-260-009-M025
Laemmli yükleme tamponu		
1 M	Tris-HCl, pH 6.8	Sigma, T1503
%0,05 w/v	SDS	Fisher, 10552785
%5	Beta merkaptotanol	Sigma, M3148
%10 w/v	Bromofenol mavisi	Sigma, B0126
Protein Belirteci		
GangNam Stain Prestained Protein Ladder 3 colours		Intron Bio, 24052
SDS koşturma tamponu (1X)		
190 mM	Glisin	BioShop Ca, GLN002.1
25 mM	Tris base	Sigma, T1503
%1 w/v	SDS	Fisher, 10552785
Transfer tamponu (1X)		
190 mM	Glisin	BioShop Ca, GLN002.1
25 mM	Tris base	Sigma, T1503
%20	Metanol	Fisher, M-4056-17
TBS-T yıkama tamponu (1X)		
0.3 M	NaCl	Merck, 106404.1000
0.1 M	Tris base	Sigma, T1503
%0,5	Tween-20	Sigma, P7949
Ponceau boyama solüsyonu		
Ponceau S Solution, Electrophoresis Grade		BioShop Ca, PON002.1

Tablo 3.6. (Devamı) Western blot analizinde kullanılan çözeltiler

Membran bloklama tamponu		
1X	TBS-T	
%5	Yağsız Süt tozu	BioShop Ca, SKI400.250
ECL stok solüsyonları		
250 mM	Luminol	Sigma, 123072
90 mM	pKumarik asit	Sigma, C9008
%30	H2O2	Sigma, H1009

Tablo 3.7. Western Blot analizinde kullanılan antikorlar

Primer antikorlar		
anti-hMOB2	İnvitrogen PA5-61212 lot R43377	1:500
anti-cPARP	Cell Signaling Technology, #9541S	1:500
anti-tubulin	homemade	1:250
anti-Bax	SRB Laboratoties, 201r-0033	1:1000
anti-Cas-9	SRB Laboratoties, 201r-1334	1:500
anti-p53	Santa Cruz, #sc126	1:1000
anti-Cas-3	Santa Cruz #sc271759	1:500
anti-p21	Santa Cruz, #sc6246	1:500
anti-Becclin-1	Santa Cruz, #sc48341	1:500
anti-Bcl-2	SRB Laboratoties, 201r-1696	1: 1000
Sekonder antikorlar		
anti-rabbit	ThermoFisher, #31460	1:5000
anti-rat	ThermoFisher, #31470	1:5000
anti-mouse	ThermoFisher, #32430	1:5000

Tablo 3.8. RNA interferans analizinde kullanılan siRNA kompleksleri

Ürün Adı	Marka - Katalog No	Hedef Sekans
siCTRL	Qiagen, #SI03650325	5' - aacgtacgcggaatacttcga- 3'
siMOB2#4	Qiagen, #SI00434497	5` - caggagagacgtgtcagacga-3`

Tablo 3.8. (Devamı) RNA interferans analizinde kullanılan siRNA kompleksleri

siMOB2#6	Qiagen, #SI04138141	5`- atcggtgccgttttagagaa -3`
----------	---------------------	------------------------------

Tablo 3.9. Koloni sağ-kalım analizinde kullanılan solüsyonlar

Fiksasyon solüsyonu		
3x	Metanol	Sigma, 322415
1x	Acetik asit	Sigma, 27218
Kristal viyole boyama solüsyonu (Fiksasyon solüsyonu içerisinde hazırlandı)		
1x	Kristal viyole	Sigma, C3886

Tablo 3.10. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar

PARP inhibitörleri		
20 mM	Olaparib (AZD2281, KU0059436)	MedChemEx, HY-10162
10 mM	Rucaparib (AG014699, PF-01367338)	Tocris, 6230
10 mM	Veliparib (ABT-888)	Selleck/Stratech, S1004
Hücre kültürü besiyeri		
	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium)	Sigma, D6429
%10	FBS (foetal bovine serum)	Sigma, F7524
%1	Pen/Strep	
PBS		
	dPBS without Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺	Gibco, 14190144
Trypsin		
	Trypsin-EDTA (0.25%), fenol kırmızısı	Gibco, 25200056
Hücre dondurma besiyeri (Freezing Medium)		
%10	DMSO	Sigma, D8418
%90	FBS	Sigma, F7524
Canlı hücre analizi		
%0,4	Tripan mavisi solüsyonu	Gibco, 15250061
Transfeksiyon ajanları		
	Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, 13778150
	Lipofectamine 2000	Invitrogen, 11668019

Tablo 3.10.(Devamı) Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar

Antibiyotik stok konsantrasyon		
	OptiMEM	Gibco, 31985-047
100 mg/mL	G418	Sigma, 1458009
0,8 mg/mL	Polybrene	Sigma, H9268

Tablo 3.11. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan temel gereçler

6- kuyucuklu hücre kültürü plakası	Nest, 606001
60-mm hücre kültürü plakası	Isolab, 120.13.060
100-mm hücre kültürü plakası	Corning, CLS430167
25-cm hücre çoğaltma kabı	Nest, 707003
75-cm hücre çoğaltma kabı	Nest, 708003

Tablo 3.12. Genel laboratuvar çalışmalarında kullanılan tampon çözeltiler

0,5 M	EDTA	Sigma, 31064
10 N NaOH kullanılarak pH 8 olarak ayarlanmıştır.		
0,5 M	EGTA	Sigma, E3889
10 N NaOH kullanılarak pH 8 olarak ayarlanmıştır.		
1 M	Tris-HCl, pH 6,8	Sigma, T1503
%37 HCl kullanılarak pH 6,8 olarak ayarlanmıştır.		
1 M	Tris-HCl, pH 8,5	Sigma, T1503
10 N NaOH kullanılarak pH 8,5 olarak ayarlanmıştır.		
1,5 M	Tris-HCl, pH 6,8	Sigma, T1503
%37 HCl kullanılarak pH 6,8 olarak ayarlanmıştır.		
1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8	Sigma, T1503
10 N NaOH kullanılarak pH 8,5 olarak ayarlanmıştır.		
0,5 M	NaF	Sigma, S7920
%10, w/v	APS	Sigma, A3678

3.2. Yöntem

3.2.1. Memeli Hücre Kültürü Teknikleri

3.2.1.1. Hücre Hattı Seçimi ve Hücre Kültürü Ekipmanları

Bu çalışmada, Dr. Alexander Hergovich (UCL Kanser Enstitüsü, Londra, İngiltere) tarafından gönderilen insan osteosarkom U2OS ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücreler için %10 fetal sıgır serumu (Fatal Bovine Serum; FBS), 64 µg/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin antibiyotikleri içeren DMEM/F12 besiyeri kullanılmıştır. Aynı zamanda hücreler, %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatörü kullanılarak çoğaltılmıştır. Tüm hücre kültürü çalışmaları Good Cell Culture Practice (GCCP) standartlarında gerçekleştirilmiştir.

İnhibitörlerin hazırlanması ve muhafaza edilmesi:

Olaparib (MW: 434,46) stok konsantrasyonu 20 mM olarak şekilde DMSO içerisinde çözünerek 20 µL alikotlara ayrılıp -20°C'de muhafaza edildi. Her deney öncesi taze alikot çıkarılarak hücre kültürü besiyeri içerisinde son konsantrasyon hazırlandı.

Rucaparib (MW: 421,36) stok konsantrasyonu 10 mM olarak şekilde DMSO içerisinde çözünerek 20 µL alikotlara ayrılıp -20°C'de muhafaza edildi. Her deney öncesi taze alikot çıkarılarak hücre kültürü besiyeri içerisinde son konsantrasyon hazırlandı.

Veliparib (MW: 435,08) stok konsantrasyonu 10 mM olarak şekilde DMSO içerisinde çözünerek 20 µL alikotlara ayrılıp -20°C'de muhafaza edildi. Her deney öncesi taze alikot çıkarılarak hücre kültürü besiyeri içerisinde son konsantrasyon hazırlandı.

3.2.1.2. siRNA Transfeksiyonu ile hMOB2 Gen İfadesinin Susturulması

RNA interferans uygulamalarımız (Gundoğdu vd., 2009), ilgili siRNA ve transfeksiyon ajanlarını temin edeceğimiz firmanın protokolünde belirtildiği üzere (Gomez et al., 2015) ve (Gundogdu et al., 2021)'de anlatıldığı şekliyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarımızda

hMOB2 gen sentezinden sorumlu ORF veya 3'UTR bölgesi hedeflenerek tasarlanmış olan en az 2 farklı siRNA kullanılmıştır. İlgili siRNA komplekslerinin hedef mRNA'yı susturma kapasitesi, herhangi bir mRNA'yı baskılama etkisine sahip olmayan (non-silencing) siRNA kompleksleri (siCTRL) ile karşılaştırmalı olarak kontrol edilmiştir. Kullanılan siRNA ve transfeksiyon ajanı oranları ve hücrelerin asgari ne kadar süre ile siRNA manipülasyonuna maruz kalması gerektiği (Gomez et al., 2015)'de belirtildiği şekilde uygulanacak olan pilot deneylerle tespit edilmiştir. Kısaca, 100 uM siRNA kompleksi optimum besiyeri içerisinde (toplam 500 µL) seyreltilmiştir. Diğer taraftan kullanılan siRNA miktarının 2 katı transfeksiyon ajanı (LipoRNAimax) ise ayrı bir tüp içerisinde bulunan optimum besiyeri içerisinde (toplam 500 µL) seyreltilmiştir. İki tüp içeriği karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 1 mL antibiyotiksiz besiyeri içerisinde bulunan hücreler ile optimum içerisinde bulunan siRNA/transfeksiyon ajanı karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. Daha sonrasında antibiyotiksiz besiyeri (optimum) içerisinde seyreltilerek hücrelerin 6 cm petri kaplarına ekimi gerçekleştirilmiştir. Söz konusu hücreler 37°C'lik %5 CO₂ içeren nemli hücre kültür inkübatörüne alındıktan 12-16 saat sonra besiyeri tazelenmiştir. Tüm siRNA manipülasyonları Western blot tekniği ile doğrulanarak en etkin tedavi süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Protein Analiz Yöntemleri

3.2.2.1. Total Protein İzolasyonu ve Bradford Yöntemi

RNA interferans yöntemiyle transfekte edilen hücrelerin total protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için protein içerikleri izole edilerek, hedef proteinlerin ifade düzeyleri SDS-PAGE ve Western blot yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Gomez et al., 2015). Protein örneklerinin analizi için, laboratuvarımızda bulunan dikey SDS-PAGE tank ve güç sistemi (Bio-Rad, Mini-PROTEAN Tetra Cell) kullanılmıştır. İlgili tedavi sürelerinin bitmesinin ardından eski medium uzaklaştırılıp hücreler soğuk PBS (Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ içermeyen) ile yıkanmıştır. Proteinlerin izolasyonunda standart lizis tamponu (150 mM) kullanılmıştır. Tripsin veya kazıyıcı yardımıyla toplanan hücreler PBS muamelesinin ardından 4 dakika 2500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine proteaz inhibitörleri (PMSF, DTT, Löpeptin, Benzamidin) eklenmiş lizis bufferdan

yaklaşık 100' er uL eklenip iyice homojenize edilmiştir. Örnekler yaklaşık 120 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra önceden sıcaklığı +4 °C'ye ayarlanmış santrifüj cihazı ile 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bittikten sonra elde edilen süpernatant yeni bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Yeni tüplere alınan örnekler buz üzerinde bekletilip Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu yöntem için öncelikle spektrofotometre cihazı açılıp kalibrasyon süresi beklenmektedir. Bradford mix tamponu 1/5 oranında otoklavlı su ile seyreltilip her bir örnek için 1 er ml spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. Daha sonra kuvet içerisine örneklerden 5 er ul alınıp Bradford tamponu ile karışımı sağlanmıştır. Spektrofotometre cihazı 595 nm dalga boyuna ayarlanıp ilgili örneklerin absorbans değerleri belirlenmiştir.

3.2.2.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Tekniği

Proteinlerin konsantrasyonları belirlendikten sonra örnekler SDS-PAGE yöntemiyle moleküler ağırlıklarına, elektriksel yük ve büyüklüklerine göre elektriksel alanda ayrılmıştır. Ardından, PET ALF (poliviniliden florür) membrana transfer edilip transfer sonrası bloklama tamponunda (TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik BSA) yaklaşık 1 saat inkübe edilmiştir. Bloklama sonunda membranlar gece boyu ilgili primer antikor ile (%5 BSA içerisinde hazırlanmış) +4°C roller cihazı yardımıyla inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından membranlar 3x10 dakika olacak şekilde TBS-T tamponu ile yıkanıp ilgili sekonder antikor ile (%5 BSA içerisinde hazırlanmış) +4°C roller cihazı yardımıyla yaklaşık 2 saat inkübasyonu sağlanmıştır. Sekonder muamelesinin ardından membranlar tekrar 3x10 dakika TBS-T ile yıkanmıştır. Sonuçların görüntülenmesi için kemilüminesans içeren ECL kiti kullanılmıştır. Kemilüminesans görüntü, X-ray görüntüleme sisteminin kullanılmasıyla filme aktarılaraq elde edilmiştir. Son olarak, bant yoğunluklarının dansitometrik analizi Image-j programı (National Institutes of Health, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3. İmmüno Floresans Yöntemi

Öncelikle, deney için kullanılacak lameller 1M HCl ile 2 saat muamele edildikten sonra ddH₂O ile yıkanıp %70 etanol ile sterilizasyonu gerçekleştirilip 15 dakika UV ışığına maruz bırakılmıştır. Daha sonra, 6 kuyulu plakalara birer adet steril lamel yerleştirilip

kuyular % 0,1 jelatin ile kaplanmıştır. 37°C inkübatörde 30 dakika bekletilen plakalardaki jelatin aspire edilerek ve her bir kuyuya 7×10^4 hücre ekilmiştir. Plakalar, nemli 37°C'lik %5 CO₂ içeren hücre kültür inkübatörüne alınarak hücrelerin jelatin tabana yapışması sağlanmıştır. İmmünfloresans hazırlığı için öncelikle hücre besiyeri aspire edilerek kuyular PBS (Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ içermeyen) ile yıkanıp sonrasında 2 mL PFA (paraformaldehit) solüsyonu (Tablo1) kullanılarak hücreler 15 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Daha sonra, kuyular PBS ile yıkanıp 2 mL %0,5 Triton X-100 solüsyonu kullanılarak hücreler 2 dakika oda sıcaklığında permeabilize edilmiştir. Ardından hücreler PBS ile 1 dakika boyunca yıkanmıştır. Bu işlem PBS değiştirilerek 5 defa tekrarlanmıştır. Yüzeyinde hücrelerin bulunduğu lamel pens yardımı ile dikkatli bir şekilde alınarak üzerinde 50 µL immünfloresans bloklama tamponu (ör. %10 keçi serumu) bulunan parafilm üzerine yatırılmıştır. Bloklama işlemi 30 dakika oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Tekrar plaka içerisine alınan lamellerdeki hücreler PBS ile yıkanmıştır (5x1 dakika). Lameller tekrar dikkatli bir şekilde alınarak üzerinde 50 µL ilgili primer antikor (bloklama tamponu içerisinde seyreltilmiş) bulunan parafilm üzerine yatırılmıştır. Primer antikor ile inkübasyon 4°C'de gece boyunca sürecektir. Ertesi sabah, hücreler tekrar PBS ile yıkanarak aynı şekilde ilgili sekonder antikor (bloklama tamponu içerisinde seyreltilmiş) ile 2 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Son olarak, lameller PBS ile yıkanıp ve 5 saniye saf su içerisine daldırılmıştır. Lam üzerine 8 µL sabitleme sıvısı transfer edilip ilgili lameller dikkatli bir şekilde bu sıvı üzerine yatırılmıştır. Lamellerin kenarları tırnak ojesi ile sabitlenip daha sonra lameller mikroskop altında incelenmek üzere 4°C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen preparatların analizleri immünofloresans mikroskopta (Zeiss Axio Scope) gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Nükleik Asit Analiz Yöntemleri

3.2.3.1. RNA – RT2 qPCR Analizi

RNA interferans (siRNA) ile *hMOB2* ifadesi susturulmuş U2OS hücrelerindeki hücre döngüsü, DNA hasar/tamir ve programlı hücre ölümünde rol oynayan bileşenlerin transkripsiyonel profilleri, RT2 PCR Array tekniği ile tespit edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, Tablo 4.1'de belirtilen genlere ait primerlerin bulunduğu 96-kuyucuklu RT2-PCR plakaları kullanılmıştır. Total RNA izolasyonu ve cDNA'nın elde edilmesi

(Gomez et al., 2015)'de, RT2 PCR Array ise (Locatelli et al., 2013)'de belirtildiği gibi tespit edilmiştir.

3.2.3.2. Total RNA'nın İzolasyonu ve RNA Agaroz Jel Elektroforezi

Total RNA örnekleri, ticari RNA izolasyon kiti (RNeasy Mini Kit, QIAGEN) kullanılarak ilgili protokol uyarınca elde edilmiştir. Pürifiye edilmiş olan total RNA %2'lik agaroz jelde koşturulup ve bütünlüğü teyit edilecektir. RNA agaroz jel elektroforezi için agaroz 2 gr alınıp 100 ml 1X TBE tampon çözeltisi içerisinde çözülmesi için kaynatılıp musluk suyu yardımıyla uygun sıcaklığa getirilmiştir. Ardından 5 ul nükleik asit boyası (GelRed®) eklenmiştir. Hazırlanan agaroz jel tankın içerisine dikkatli bir şekilde dökülerek ve tarak yerleştirilmiştir. Parafilm üzerinde ilgili RNA örnekleri ve RNA yükleme tamponu karıştırılıp kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme miktarları 2 ul RNA, 2 ul loading buffer (6X) ve 8 ul Rnase free water olarak ayarlanmıştır. Son olarak 80-120 V'da 3-4 saat RNA örnekleri koşturulmuştur. Agaroz jel görüntülendiğinde 28S/18S ribozomal RNA'nın olup olmadığı doğrulanmıştır. Ardından cDNA sentezinde kullanılacak miktarının ve saflığının belirlenmesi için 260/280 nm'de nanodrop spektrofotometre (Biodrop) ile total RNA'nın miktarı ($A_{260/280} > 1,8-2,0$) belirlenmiştir.

3.2.3.3. cDNA Sentezi ve Kantitatif Real-Time PCR

1 µg total RNA örneği 0,2 mL'lik mikrofüj tüpüne aktarılmıştır ve üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca 5X cDNA sentez tamponu (Oligo[dT] primerler, hekzamerler, buffer, MgCl₂, dNTPs, DTT ve RNase inhibitörü), enzim ve nuclease-free su eklenmiştir (RNeasy Mini cDNA sentez kiti, QIAGEN). Üniversitemizde bulunan termal siklus cihazında (Sensoquest Labcycler), örnekler önce 5 dakika 42°C ardından hemen buz üzerinde 1 dakika, örnekler 42°C 15 dakika inkübe edilip son olarak 5 dakika 95°C'de bekletilip ve (gerektiğinde) -20°C'de tutulacaktır. Son olarak Nanodrop® spektrofotometre (Biodrop) ile sentezlenen cDNA'ların miktarları tayin edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda, U2OS kontrol hücrelerinin cDNA konsantrasyonu 380,0 ng/ul U2OS si hMOB2 hücrelerinin cDNA konsantrasyonu ise 233,0 ng/ul olarak tespit edilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri (en az 1 µg) ilgili firmanın geliştirdiği protokol uyarınca SYBR green mastermix ile karıştırılmıştır. 20 µL cDNA/SYBR mastermix karışımı ilgili

genlere ait primerlerin bulunduğu kuyulara dikkatli bir şekilde transfer edilmiştir. Üniversitemizde bulunan kantitatif real-time PCR termal siklus cihazında (CFX96 Real Time, Biorad,), önce 10 dakika 95°C’de ilk denatürasyon ve ilgili enzimlerin aktivasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, 10 saniye 95°C, 30 saniye 60°C’de PCR programı (40 defa) uygulanarak ilgili mRNA’lara ait cDNA’ların çoğaltılması sağlanmıştır. Programın sonunda erime eğrisi (melting curve) uygulanarak olası primer dimerizasyonu takip edilmiştir. İlgili proteinin mRNA’sına ait Ct (Cycle at threshold) değerleri öncelikle ilgili housekeeping genlerine (HKG) normalize edilmiştir. RT ve PCR kontrollerinin yanı sıra B2M, HPRT1, RPL13A, ACTB ve GAPDH housekeeping genleri referans olarak kullanılarak sonuçlar siCTRL kontrol grubuna ait Ct değerine normalize edilmiştir. Elde edilen veriler, (Livak et al., 2001) tarafından tarif edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.4. cDNA Kalıcı (Stable) Transfeksiyonu

Retroviral pLXSN plazmidi kullanılarak uygulanmış olan kalıcı cDNA transfeksiyonları (Hergovich et al., 2007)’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Retroviral paketleme hücresi olarak PT67, hedef hücre olarak da U2OS hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmalar, tüm GCCP ve biyogüvenlik hususlarına azami ölçüde riayet edilerek gerçekleştirilmiştir. Kısaca, PT67 hücreleri her bir 100 mm’lik petri kabına 2×10^6 hücre olacak şekilde pasajlanmıştır (gün-1). Bir sonraki gün, transfekte edilecek U2OS hücreleri de her bir 100 mm’lik petri kabına 5×10^5 hücre olacak şekilde pasajlanmıştır (gün-2). Öte yandan, PT67 hücreleri kalıcı transfeksiyon ajanı Lipofectamine 2000 kullanılarak firmanın önerdiği şekilde ilgili plazmid ile transfekte edilmiştir. Bunun için, 30 µL transfeksiyon ajanı toplam 750 µL optimum içerisinde seyreltilip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Diğer taraftan, 12 µg saf plazmit toplam 750 µL optimum içerisinde seyreltilerek ve son olarak transfeksiyon ajanının bulunduğu optimum ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra damla damla hedef PT67 hücrelerinin bulunduğu besiyerine eklenmiştir. Söz konusu hücreler %5 CO₂ içeren nemli 37°C’lik hücre kültür inkübatörüne alındıktan 4-6 saat sonra besiyeri tazelenmiştir (gün-2). Devam eden iki gün, öncelikle transfekte edilecek olan U2OS hücrelerindeki besiyeri aspire edilmiştir. Sonra, PT67 hücrelerinin bulunduğu besiyeri enjektör yardımıyla alınarak 0,45 µm gözeneğe sahip filtreden geçirilerek, transfeksiyon verimliliğini arttırmak için polybrene (0,8 µg/mL) ile

karıştırılacak ve son olarak hedef U2OS hücrelerine eklenmiştir (gün-3 ve 4). Devam eden 7-14 gün boyunca, başarılı bir şekilde transfekte olmuş U2OS hücreleri ilgili antibiyotiği içeren (neomisin) besiyeri kullanılarak seçilmiştir (öncesinde yapılacak olan U2OS antibiyotik killing-curve sonuçlarıyla belirlenen dozlarda antibiyotik kullanılacaktır). Oluşturulan klonlar dondurularak sıvı nitrojen tankta muhafaza edilmiştir. Tüm manipülasyonlar Western blot analizi ile doğrulanmıştır.

3.2.4. Fonksiyonel Analizler

3.2.4.1. Kristal Viyole Hücre Canlılığı Testi

Kristal viyole *in vitro* hücre canlılığı testi için Parker ve ark. (2022)'de açıkladığı protokol optimize edilmiştir (Parker et al., 2022). Öncelikle pilot deneyler planlanarak her bir ekim alanına ilgili hücre modelinden ne kadar hücre ekileceğine, ilgili ilaçların konsantrasyonuna ve tedavi sürelerine karar verilmiştir. Ön çalışmalar tamamlandıktan sonra ilk olarak meme kanseri hücre hattı (MCF-7) 24 kuyucuklu hücre çoğaltma kabına ekimi gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün ilgili olaparib, rucaparib ve veliparib tedavileri gerçekleştirilmiştir. Belirtilen deney süresi sonunda hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkanmıştır. Ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile her 6 cm hücre çoğaltma kabına yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fiks edilmiştir. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp %0,5-%1 kristal viyole (Crystal Violet) boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanmıştır. Ardından oluşan hücre proliferasyonu tarayıcı yardımıyla saptanmıştır. Daha sonra hücrelere %10 asetik asit (1 ml %100 Asetik asit + 9 ml ddH₂O) eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Ardından asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. Spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda hücre canlılık değerleri analiz edilip, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.2. 2D Koloni Sağkalım Deneyi

2D koloni sağkalım analizleri, Gundogdu ve ark. (2021) yapmış oldukları yöntemin protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır (Gundogdu et al., 2021). Öncelikle pilot

deneyler gerçekleştirilmek üzere her bir ekim alanına MCF-7 hücre hattından ne kadar ekileceğine, ilgili siRNA konsantrasyonlarına ve tedavi sürelerine karar verilmiştir. Ön çalışmalarla belirlenmiş yoğunluktaki hücreler ilgili siRNA ve transfeksiyon ajanıyla manipüle edildikten sonra 6 kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen sürenin sonunda hücrelerin besiyeri (DMEM) tazelenmiştir. Hücreler 12 gün boyunca nemli 37°C'lik %5 CO₂ içeren hücre kültür inkübatöründe bekletilmiştir. Hücrelerin her 3-4 günde bir besiyeri ortamı tazelenerek koloni oluşumları mikroskop altında incelenmiştir. Her bir kolonin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerin birbirlerine temas etmemesi dikkate alınarak deney 12. günde durdurulmuştur. Koloniler, PBS (Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ içermeyen) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile (her bir kuyucuğa yaklaşık 600 µL) 5 dakika fikse edilen hücreler %1 kristal violet boyası ile (her bir kuyucuğa yaklaşık 400 µL) 15 dakika boyunca muamele edilmiştir. Sonrasında kuyucuklar su ile dikkatlice yıkanarak koloniler mikroskop altında sayılmıştır. En az elli hücre oluşumu koloni olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.3. Yara İyileşme Deneyi

Yara iyileşmesi (wound healing assay) deneyi ile hücre polarizasyonunun yanı sıra değişken kültür şartlarında hücrelerin proliferasyon ve göç etme (migrasyon) hızlarının analiz edilmesi amaçlanmaktadır. Bu yöntem ile ekilen hücreler tek katmanlı olarak istenilen yoğunluğa ulaştıktan sonra yara alanı oluşturulmakta ve oluşturulan yara alanı açıklığının zamana bağlı olarak kapanması mikroskop yardımıyla görüntülenmektedir (Liang et al., 2007).

Yara iyileşme deneyleri (Erdogan et al., 2021)'de açıklandığı protokol üzerinden gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre çoğalma kaplarına ekilen MCF-7 hücrelerinin tüm yüzeyi kaplaması beklenmiştir. Ardından ilgili kombinasyon tedavileri uygulanıp 100 uL pipet ucu kullanılarak plakalar çizilmiştir (yara açılmıştır) ve PBS ile iki defa yıkama işlemi gerçekleştirilip besiyeri (DMEM) tazelenmiştir. Açılan yaraların kapanma süreçleri ters mikroskop aracılığıyla incelenmiş olup belirli zaman aralıklarında (0, 12, 24h) fotoğraflandırılıp Image-J programı ile analiz edilmiştir.

3.2.4.4. Nötral Kırmızısı Yöntemi

Nötral kırmızısı, ‘bazal kırmızısı’ veya ‘toluen kırmızısı’ olarak bilinen zayıf katyonik bir boya olduğu bilinmektedir. Nötral kırmızısı biyolojik pH’ta sıfır net yüke sahip olduğundan hücre zarını kolayca geçebilmektedir. Boya, hücre zarından sitozole non-iyonik difüzyonla geçtikten sonra lizozomlarda birirmektedir. Lizozomların içinde bulunan proton gradyanları sitozolden daha düşük bir pH oluşturmaktadırlar. Lizozoma giren boya yüklü hale geldiğinden lizozomun içinde kalmaktadır. Hücre ölürse bu pH gradyanı düşeceğinden boya lizozomların içinde tutulamayacaktır. Nötral kırmızısı ölü hücrelerin dışına çıkmakta ve böylece sitotoksitenin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Ates et al., 2017).

Nötral kırmızısı yöntemleri (Ates et al., 2017)’de açıklandığı protokol üzerinden gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu plakalara 1×10^4 kadar hücre ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. İlgili doz ve tedavi süresi geçtikten sonra Nötral kırmızısı deney protokolü izlenmiştir. Bir gece önce hazırlanıp inkübatörde muhafaza edilen nötral kırmızısı besiyeri 1800 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hücrelerin eski mediumu çekilip her kuyucuğa 100 uL nötral kırmızısı mediumu eklenerek 37°C’de 2 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. Ardından medium aspire edilip her kuyucuk 150 uL PBS ile yıkanmaktadır. Daha sonra her kuyucuğa 150 uL Nötral red destain solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Elisa reader cihazı ile 540 nm’de ölçüm alınarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Nötral red stok hazırlama (4 mg/ml): 40 mg Nötral red 10 ml PBS içinde çözündürülür. Nötral Red Mediumu (40 ug/ml): Nötral red stok 1/100 dilüsyonu gerçekleştirilir. 12 ml DMEM içerisinde 0,12 ml stok Nötral red eklenir. Nötral red destain: %50 etanol, %49 ddH₂O, %1 glasiyel asetik asit.

3.2.4.5. DNA Fragmantasyon Analizi

DNA fragmantasyon analizleri (Majtnerová ve Roušar, 2018)’de açıkladığı protokol üzerinden gerçekleştirilmiştir. Total DNA’nın izolasyonu için ticari Genomik DNA izolasyon kiti (Hibrigen) kullanılıp kitteki protokol baz alınarak gerçekleştirildi. Elde edilen DNA’nın saflığı ve konsantrasyonu nanodrop cihazı (Biodrop) ile tespit edilmiştir. Konsantrasyonu belirlenen DNA örnekleri için laboratuvarımızda bulunan yatay agaroz jel

elektroforez tank sistemi (Bio-Rad, Sub-Cell GT) kullanıldı. Elde edilen DNA'nın büyüklüğüne göre %2 oranlarında agaroz jel hazırlandı. Agaroz miktarı hesaplanıp 1X TBE tampon çözeltisi içerisinde kaynatılıp musluk suyu yardımıyla el ile tutulabilecek sıcaklığa ulaşması sağlandı. Ardından önerilen oranda nükleik asit boyası (GelRed®) eklendi. Hazırlanan agaroz jel tankın içerisine dikkatli bir şekilde dökülecek ve tarak yerleştirilmiştir. Parafilm üzerinde ilgili DNA örnekleri ve DNA yükleme tamponu karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Son olarak 80-120 V'da 3-4 saat DNA örnekleri koşturuldu. TBE tampon: 89 mM tris base, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA, pH 8,0. DNA yükleme tamponu: %40 sükröz, %10 bromofenol mavisi.

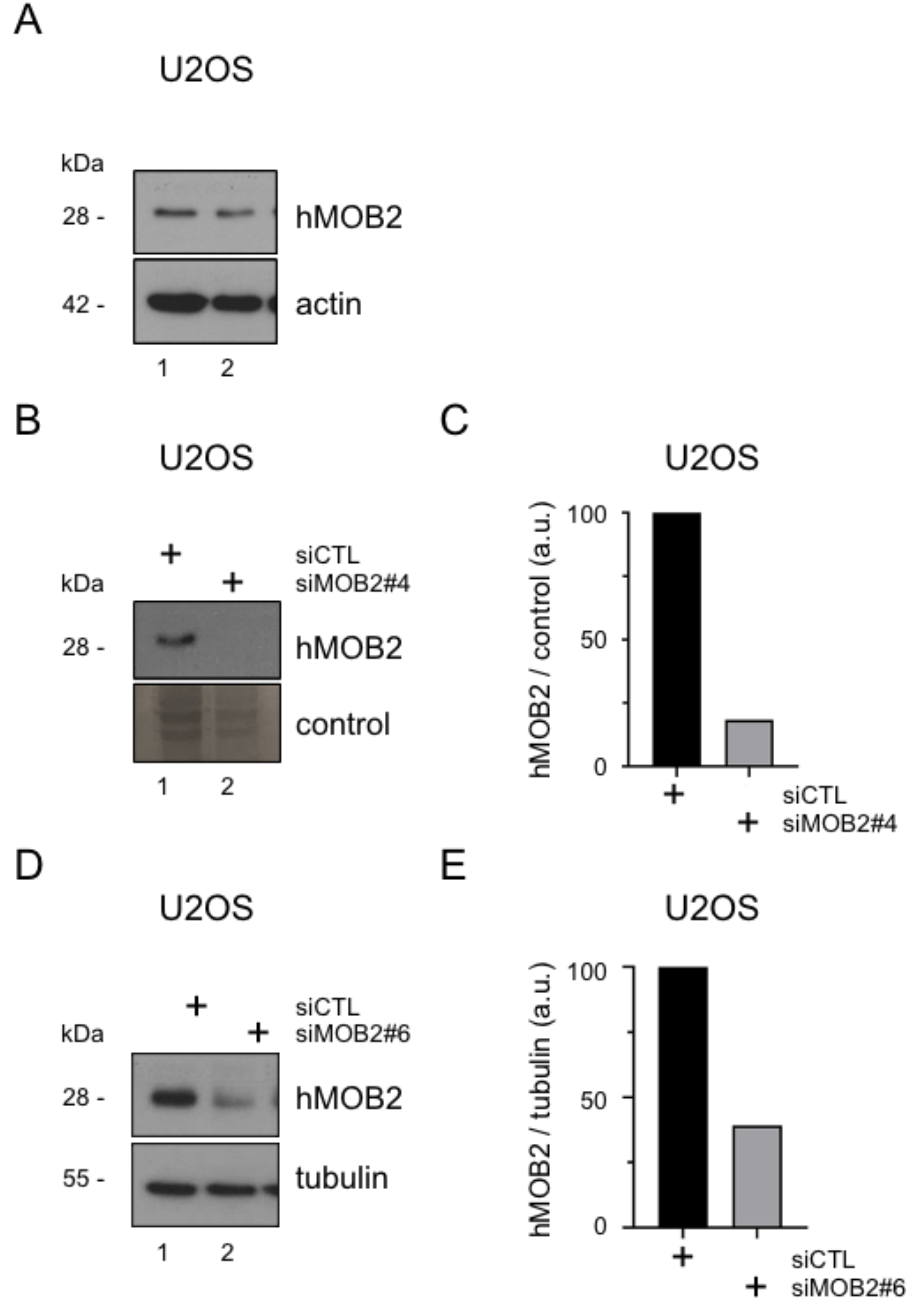
3.2.5. İstatistiksel Analiz

Yapılan tez çalışmasında, tüm deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde planlanmış olup istatistiksel olarak standart sapma değerleri analiz edilmiştir. Grafikler ve istatistiksel analizler GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) programı kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular t-testi ve One-Way ANOVA testi ile değerlendirilip (means $\pm$ bSEM) p-değeri 0,05 (*), 0,01 (**), 0,001 (***) veya 0,0001 (****)'den küçük neticeler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. RNA İnterferans Yöntemi ile hMOB2 Gen İfadesinin Susturulması

Tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda kullandığımız hMOB2 monoklonal antikorunu üreten hybridoma hücreleri firmanın (Epitomics Inc.) önerdiği protokol optimize edilerek uygulanmıştır. İlgili antikorun U2OS ve MCF-7 hücrelerinde anti-hMOB2 aktivitesi Western blot analiziyle teyit edilmiştir. RNA interferans yöntemi kullanılarak ilgili hücre hatlarında hMOB2 ekspresyonu geçici olarak susturulmuştur. Daha önce yapılan çalışmada, siRNA kullanılarak geçici transfeksiyon sonrasında hMOB2 ifadesinin işlemiden 24 saat sonra önemli derecede azaldığı saptanmış olup bu baskılanmanın 120 saate kadar devam ettiği belirlenmiştir (Gundogdu, et al., 2021). Bu nedenle, projemizde gerçekleştirilen tüm inhibitör tedavileri transfeksiyon işleminden 24 saat sonra başlatılarak 72 saat süresince uygulanmıştır. Proje kapsamında satın alınan siRNA komplekslerinin (siCTRL, siMOB2#4 ve siMOB2#6) ve Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanının kullanılmasıyla U2OS hücreleri geçici olarak transfekte edilmiştir. Transfekte hücreler 24 saat sonra toplanarak protein lizatları oluşturulmuştur. Protein kodlayan mRNA bölgesini hedefleyen siMOB2#4 (Şekil 4.1, B ve C) veya 3' UTR bölgesini hedefleyen siMOB2#6 (Şekil 4.1, D ve E) ile transfekte edilen hücrelerdeki azalan hMOB2 protein seviyesi Western blot tekniğiyle teyit edilmiştir.



Şekil 4.1: U2OS kanser hücrelerinde anti-MOB2 antikorunun ve siRNA konstraktlarının aktivitelerinin teyit edilmesi. (A) Aseptik koşullar dikkate alınarak kültüre edilen U2OS kanser hücreleri 10-cm petri kutusuna ekilmiştir. Protein lizatları oluşturularak %12 SDS poliakrilamid jelde koşturulan örnekler Western blot uygulamasıyla bir gece boyunca anti-MOB2 (1:50) veya anti-actin (1:500) antikoruyla 4°C’de inkübe edilen membran daha sonra oda sıcaklığında 2 saat süreyle anti-rabbit (1:5000) veya anti-goat (1:5000) sekonder antikoruyla inkübe edildi. Kemilüminesans görüntüleme yöntemiyle elde edilen sonuçlarda, üretilen anti-MOB2 antikorlarının 28 kDa büyüklüğündeki hMOB2 proteinini tespit ettiği gösterilmiştir. (B,D) 10 µM stok halinde hazırlanarak -20°C’de muhafaza edilen siCTRL ve siMOB2#4 kompleksleri ve Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı 1:2 oranda OPTI-MEM içerisinde dilüte edilerek 15 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Transfekte edilen U2OS hücrelerinin hMOB2 ifadesi baskılanmıştır. Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği Western blot yöntemiyle teyit edilmiştir. (C,E) Taranan filmlerin densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında

4.2. hMOB2 Proteini ile Çeşitli Hücresel Yolaklarda Görevli Proteinler Arasındaki Sentetik Letalitenin Belirlenmesi

hMOB2'nin HR regülasyonundaki potansiyel rollerini ve DNA hasarına karşı artan hMOB2 protein seviyesini (Gundogdu et al., 2021) dikkate alarak gerçekleştirdiğimiz RT2-qPCR analizlerinde, hMOB2 ekspresyonu baskılanan dolayısıyla hMOB2-defektif U2OS kanser hücrelerinin DNA hasar yanıt, DNA tamir ve apoptosis yolaklarında rol oynayan 84 genin (Tablo 4.1) transkripsiyonel profilleri incelenmiştir. Böylece, hMOB2 defektif kanser hücrelerine sağkalım avantajı sağlayan potansiyel ekspresyon profillerinin belirlenmesi sağlanmıştır.

Tablo 4.1. RT² Profiler™ PCR Array Human p53 Signaling Pathway panelinde yer alan gen listesi

Pozisyon	UniGene	GenBank	Sembol	Açıklama
A01	Hs.728891	NM_001160	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
A02	Hs.367437	NM_000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated
A03	Hs.271791	NM_001184	ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
A04	Hs.194654	NM_001702	BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1
A05	Hs.624291	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein
A06	Hs.467020	NM_014417	BBC3	BCL2 binding component 3
A07	Hs.150749	NM_000633	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
A08	Hs.227817	NM_004049	BCL2A1	BCL2-related protein A1
A09	Hs.591054	NM_001196	BID	BH3 interacting domain death agonist
A10	Hs.728893	NM_001168	BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
A11	Hs.194143	NM_007294	BRCA1	Breast cancer 1, early onset
A12	Hs.34012	NM_000059	BRCA2	Breast cancer 2, early onset
B01	Hs.519162	NM_006763	BTG2	BTG family, member 2
B02	Hs.368982	NM_032982	CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
B03	Hs.329502	NM_001229	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
B04	Hs.23960	NM_031966	CCNB1	Cyclin B1
B05	Hs.244723	NM_001238	CCNE1	Cyclin E1

Tablo 4.1. (Devam) RT² Profiler™ PCR Array Human p53 Signaling Pathway panelinde yer alan gen listesi

B06	Hs.79101	NM_004060	CCNG1	Cyclin G1
B07	Hs.292524	NM_001239	CCNH	Cyclin H
B08	Hs.437705	NM_001789	CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)
B09	Hs.656	NM_001790	CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)
B10	Hs.334562	NM_001786	CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
B11	Hs.95577	NM_000075	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
B12	Hs.370771	NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
C01	Hs.512599	NM_000077	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
C02	Hs.24529	NM_001274	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
C03	Hs.291363	NM_007194	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
C04	Hs.38533	NM_003805	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
C05	Hs.202672	NM_001379	DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
C06	Hs.654393	NM_005225	E2F1	E2F transcription factor 1
C07	Hs.269408	NM_001949	E2F3	E2F transcription factor 3
C08	Hs.488293	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor
C09	Hs.326035	NM_001964	EGR1	Early growth response 1
C10	Hs.716416	NM_004879	EI24	Etoposide induced 2.4 mRNA
C11	Hs.208124	NM_000125	ESR1	Estrogen receptor 1
C12	Hs.86131	NM_003824	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
D01	Hs.244139	NM_000043	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
D02	Hs.2007	NM_000639	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
D03	Hs.220950	NM_001455	FOXO3	Forkhead box O3
D04	Hs.80409	NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
D05	Hs.661218	NM_002066	GML	Glycosylphosphatidylinositol anchored molecule like protein
D06	Hs.88556	NM_004964	HDAC1	Histone deacetylase 1
D07	Hs.406266	NM_000189	HK2	Hexokinase 2
D08	Hs.643120	NM_000875	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor

Tablo 4.1. (Devami) RT² Profiler™ PCR Array Human p53 Signaling Pathway panelinde yer alan gen listesi

D09	Hs.654458	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D10	Hs.714791	NM_002228	JUN	Jun proto-oncogene
D11	Hs.533055	NM_003884	KAT2B	K(lysine) acetyltransferase 2B
D12	Hs.505033	NM_004985	KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
E01	Hs.632486	NM_021960	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
E02	Hs.484551	NM_002392	MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)
E03	Hs.497492	NM_002393	MDM4	Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)
E04	Hs.195364	NM_000249	MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
E05	Hs.597656	NM_000251	MSH2	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
E06	Hs.202453	NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
E07	Hs.181768	NM_002478	MYOD1	Myogenic differentiation 1
E08	Hs.113577	NM_000267	NF1	Neurofibromin 1
E09	Hs.654408	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
E10	Hs.728886	NM_182649	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
E11	Hs.592290	NM_145886	PIDD	P53-induced death domain protein
E12	Hs.591184	NM_003620	PPM1D	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1D
F01	Hs.567385	NM_003981	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1
F02	Hs.531704	NM_002737	PRKCA	Protein kinase C, alpha
F03	Hs.500466	NM_000314	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
F04	Hs.350966	NM_004219	PTTG1	Pituitary tumor-transforming 1
F05	Hs.408528	NM_000321	RB1	Retinoblastoma 1
F06	Hs.502875	NM_021975	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
F07	Hs.100890	NM_019845	RPRM	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate
F08	Hs.469543	NM_031459	SESN2	Sestrin 2
F09	Hs.728779	NM_003031	SIAH1	Seven in absentia homolog 1 (Drosophila)
F10	Hs.369779	NM_012238	SIRT1	Sirtuin 1
F11	Hs.642990	NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
F12	Hs.386390	NM_006354	TADA3	Transcriptional adaptor 3

Tablo 4.1. (Devamı) RT² Profiler™ PCR Array Human p53 Signaling Pathway panelinde yer alan gen listesi

G01	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor
G02	Hs.521456	NM_003842	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
G03	Hs.213467	NM_003840	TNFRSF10D	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain
G04	Hs.654481	NM_000546	TP53	Tumor protein p53
G05	Hs.160953	NM_022112	TP53AIP1	Tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1
G06	Hs.523968	NM_005426	TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2
G07	Hs.137569	NM_003722	TP63	Tumor protein p63
G08	Hs.697294	NM_005427	TP73	Tumor protein p73
G09	Hs.522506	NM_021138	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
G10	Hs.370854	NM_000368	TSC1	Tuberous sclerosis 1
G11	Hs.591980	NM_000378	WT1	Wilms tumor 1
G12	Hs.388739	NM_021141	XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	Hs.592355	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

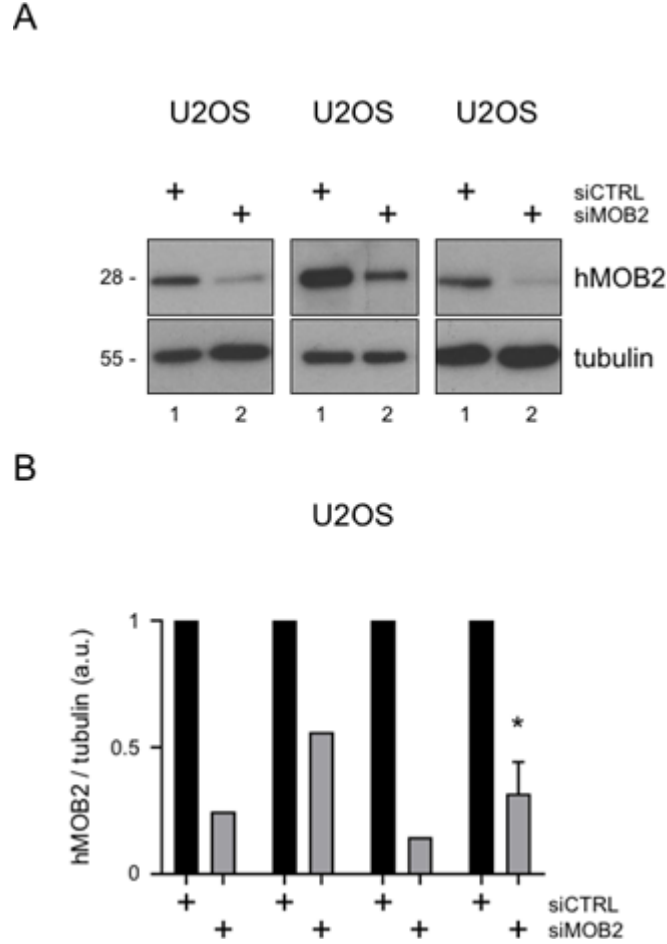
Total RNA örnekleri, ticari RNA izolasyon kiti (RNeasy Mini Kit, Qiagen, #74134) kullanılarak ilgili protokol uyarınca elde edilmiştir. Pürifiye edilmiş olan total RNA %2'lik agaroz jelde koşturularak ve bütünlüğü teyit edilmiştir. RNA agaroz jel elektroforezi için agaroz 2 gr alınıp 100 ml 1X TBE tampon çözeltisi içerisinde çözülmesi için kaynatılıp musluk suyu yardımıyla uygun sıcaklığa getirilmiştir. Ardından 5 µl nükleik asit boyası (GelRed®) eklenmiştir. Hazırlanan agaroz jel tankın içerisine dikkatli bir şekilde dökülmüş ve tarak yerleştirilmiştir. Parafilm üzerinde ilgili RNA örnekleri ve RNA yükleme tamponu

karıştırılıp kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme miktarları 2 µl RNA, 2 µl loading buffer (6X) ve 8 µl Rnase free water olarak ayarlanmıştır. Son olarak 80-120 V'da 3-4 saat RNA örnekleri koşturulmuştur. Agaroz jel görüntülendiğinde 28S/18S ribozomal RNA'nın olup olmadığı doğrulanmıştır. Ardından cDNA sentezinde kullanılacak miktarının ve saflığının belirlenmesi için 260/280 nm'de nanodrop spektrofotometre (Biodrop) ile total RNA'nın miktarı ($A_{260/280} > 1,8-2,0$) belirlenmiştir. Total RNA örnekleri bir sonraki işleme kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

1 µg total RNA örneği 0,2 mL'lik mikrofüj tüpüne aktarılmıştır ve üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca 5X cDNA sentez tamponu (Oligo[dT] primerler, hekzamerler, buffer, MgCl₂, dNTPs, DTT ve RNase inhibitörü), enzim ve nuclease-free su eklenmiştir (RNeasy Mini cDNA sentez kiti, QIAGEN). Üniversitemizde bulunan termal siklus cihazında (Sensoquest Labcycler), örnekler önce 5 dakika 42°C ardından hemen buz üzerinde 1 dakika, örnekler 42°C 15 dakika inkübe edilip son olarak 5 dakika 95°C'de bekletilmiştir. Son olarak Nanodrop® spektrofotometre (Biodrop, Arı ve Doğal Ürünler ARGE-ÜRGE) ile sentezlenen cDNA'ların miktarları tayin edilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri (en az 1 µg) ilgili firmanın geliştirdiği protokol uyarınca SYBR green mastermix (QIAGEN RT² SYBR Green qPCR Mastermix, #330501) ile karıştırılmıştır. 20 µL cDNA/SYBR mastermix karışımı ilgili genlere ait primerlerin bulunduğu kuyulara (Qiagen, RT² Profiler™ PCR Array Human p53 Signaling Pathway, #330231) dikkatli bir şekilde transfer edilmiştir. Üniversitemizde bulunan kantitatif real-time PCR termal siklus cihazında (CFX96 Real Time, Biorad Arı ve Doğal Ürünler ARGE-ÜRGE), önce 10 dakika 95°C'de ilk denaturasyon ve ilgili enzimlerin aktivasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, 10 saniye 95°C, 30 saniye 60°C'de PCR programı (40 defa) uygulanarak ilgili mRNA'lara ait cDNA'ların çoğaltılması sağlanmıştır. Programın sonunda erime eğrisi (melting curve) uygulanarak olası primer dimerizasyonu takip edilmiştir.

İlgili proteinin mRNA'sına ait Ct (Cycle at threshold) değerleri öncelikle ilgili housekeeping genlerine (HKG) normalize edildi. Tüm deney setleri bağımsız olarak 3 defa tekrarlandı ve RNA interferans verimliliği teyit edildi (Şekil 4.2). RT ve PCR kontrollerinin yanı sıra *B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *ACTB* ve *GAPDH* housekeeping genleri referans olarak kullanılarak sonuçlar siCTRL (non-silencing) kontrol grubuna ait Ct

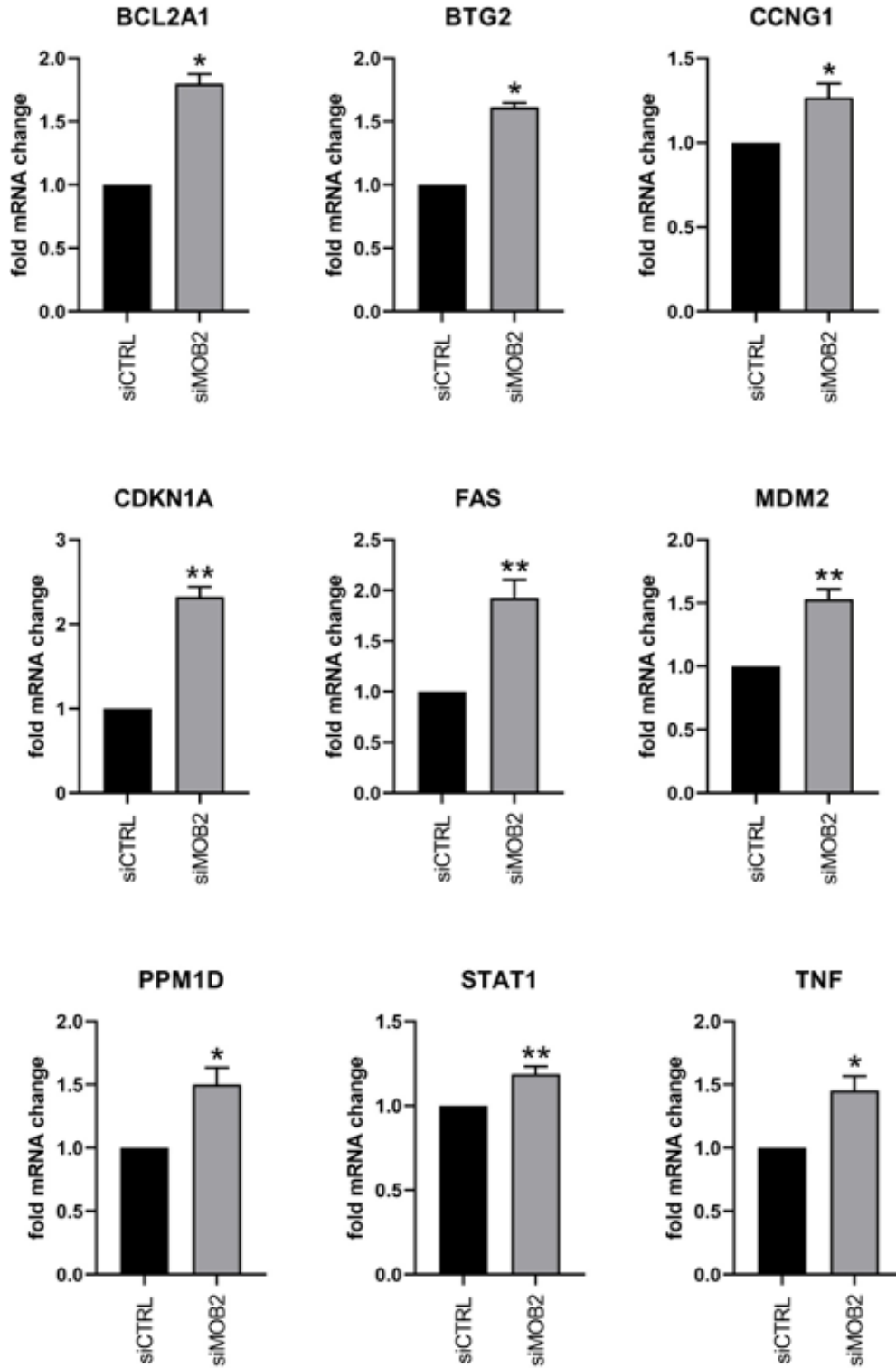
değerine normalize edilmiştir. Elde edilen veriler, (Livak et al., 2001) tarafından tarif edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla kantitatif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.2. RT2-qPCR analizleri için gerçekleştirilen hMOB2 mRNA'sının susturulması aplikasyonlarının teyit edilmesi. (A) Logaritmik büyüme eğrisine sahip U2OS kanser hücrelerinin geçici transfeksiyonun teyit edilmesi için ekimi gerçekleştirilen hücreler toplanarak protein lizatı oluşturulmuştur. Ardından Western blot işlemi gerçekleştirilerek baskılanan hMOB2 miktarı tespit edilmiştir. Bağımsız 3 farklı deneyin sonuçları gösterilmektedir. (B) Taranan filmlerin densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. Bağımsız 3 farklı deneyin sonuçları, hMOB2 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılandığını göstermektedir. İstatistiksel analiz Student's t-test ile gerçekleştirilmiştir. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında

4.2.1. Azalan hMOB2 İfadesi Sonucunda Ekspresyonu Artan Genler

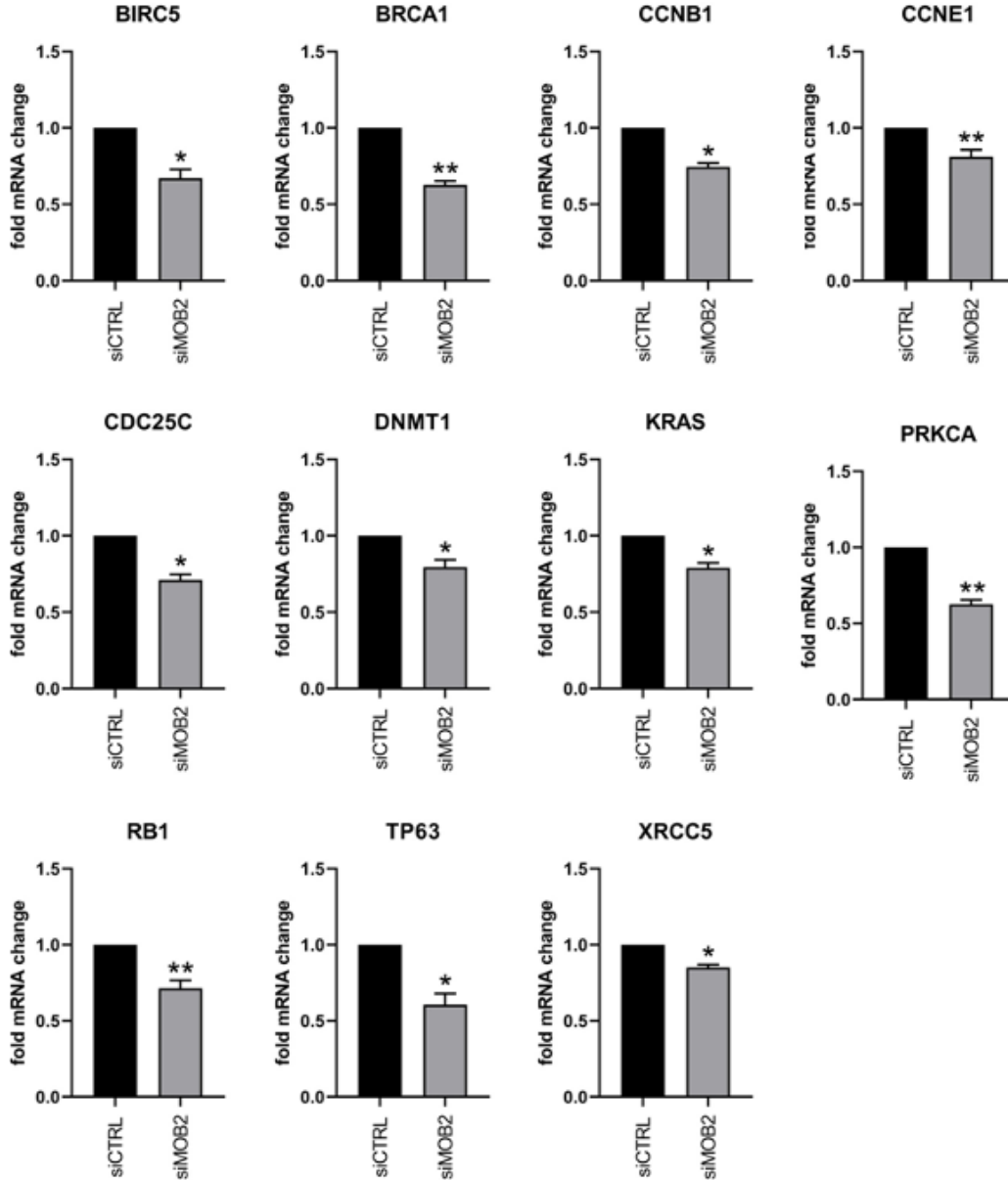
Gerçekleştirdiğimiz RT2-qPCR Array analizlerinden elde ettiğimiz sonuçlar, azalan hMOB2 ifadesine karşı DNA hasar yanıt, DNA tamir ve apoptosis yollarında rol oynayan *BCL2A1*, *BTG2*, *CCNG1*, *CDKN1A*, *FAS*, *MDM2*, *PPM1D*, *STAT1* ve *TNF* genlerin mRNA ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını gösterilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. hMOB2 ifadesi baskılanan U2OS kanser hücrelerinde ekspresyonu artan genler. RT ve PCR kontrollerinin yanı sıra *B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *ACTB* ve *GAPDH* housekeeping genleri referans olarak kullanıldı. qPCR-array veri analizi ilgili firma tarafından sağlanan hazır excel şablonu kullanılarak Livak ve Schmittgen tarafından tanımlanan $\Delta\Delta C_q$ metoduna (Livak et al., 2001) göre gerçekleştirildi. Student's t-test kullanılarak hesaplanan p değerinin 0,05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

4.2.2. Azalan hMOB2 İfadesi Sonucunda Ekspresyonu Azalan Genler

Gerçekleştirdiğimiz RT2-qPCR Array analizlerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre, azalan hMOB2 ifadesine karşı DNA hasar yanıt, DNA tamir ve apoptosis yollarında rol oynayan *BIRC5*, *BRCA1*, *CCNB1*, *CCNE1*, *CDC25C*, *DNMT1*, *KRAS*, *PRKCA*, *RB1*, *TP63* ve *XRCC5* genlerin mRNA ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını saptanmıştır (Şekil 4.4). Azalan genlerden *BRCA1* gen ürününün DNA onarım mekanizması, hücre döngüsü gibi birçok hücresel proseste rol oynadığı bilinmektedir (Tung et al., 2018). *BRCA1* özellikle DNA çift zincir kırık tamir mekanizması olan homolog rekombinasyonda *BRCA2* ve *PALB2* proteinleriyle birlikte oluşturduğu kompleks sayesinde *RAD51* rekombinazının hasarlı kromatin üzerine istila etmesi noktasında önemli olduğu bilinmektedir (Simhadri et al., 2019).

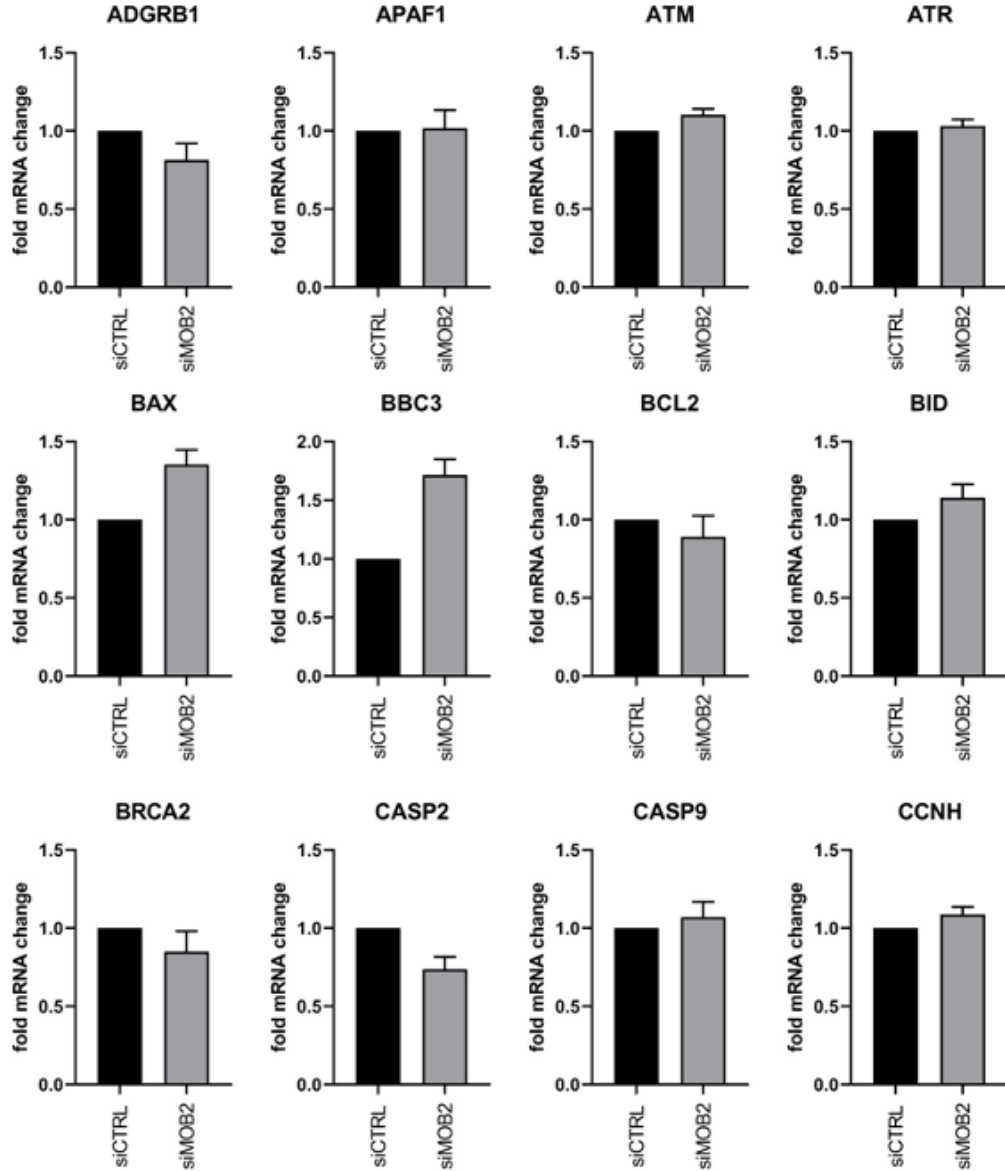


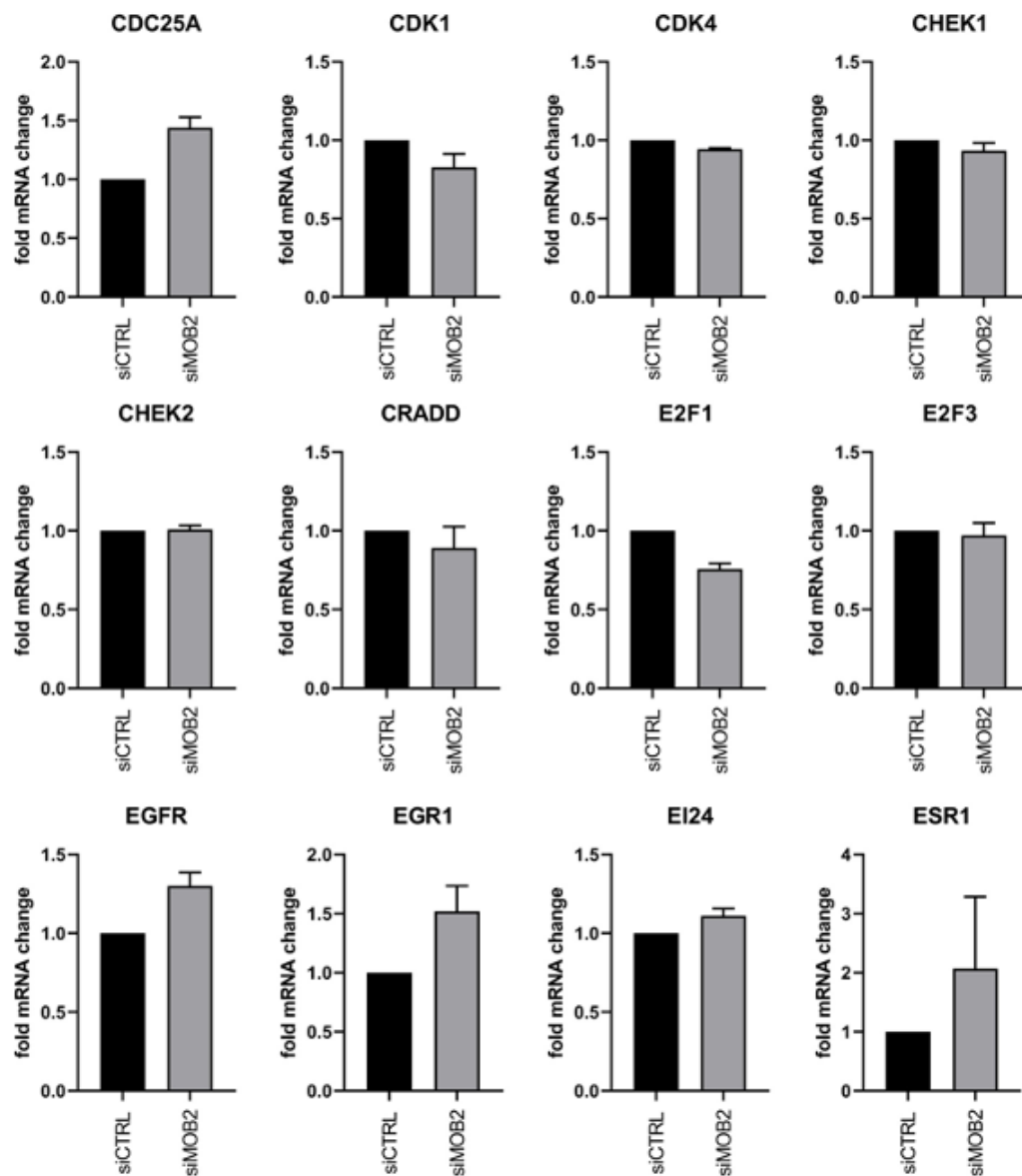
Şekil 4.4. hMOB2 ifadesi baskılanan U2OS kanser hücrelerinde ekspresyonu azalan genler. RT ve PCR kontrollerinin yanı sıra *B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *ACTB* ve *GAPDH* housekeeping genleri referans olarak kullanıldı. qPCR-array veri analizi ilgili firma tarafından sağlanan hazır excel şablonu kullanılarak Livak ve Schmittgen tarafından tanımlanan $\Delta\Delta Cq$ metoduna (Livak et al., 2001) göre gerçekleştirildi. Student's t-test kullanılarak hesaplanan p değerinin 0,05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

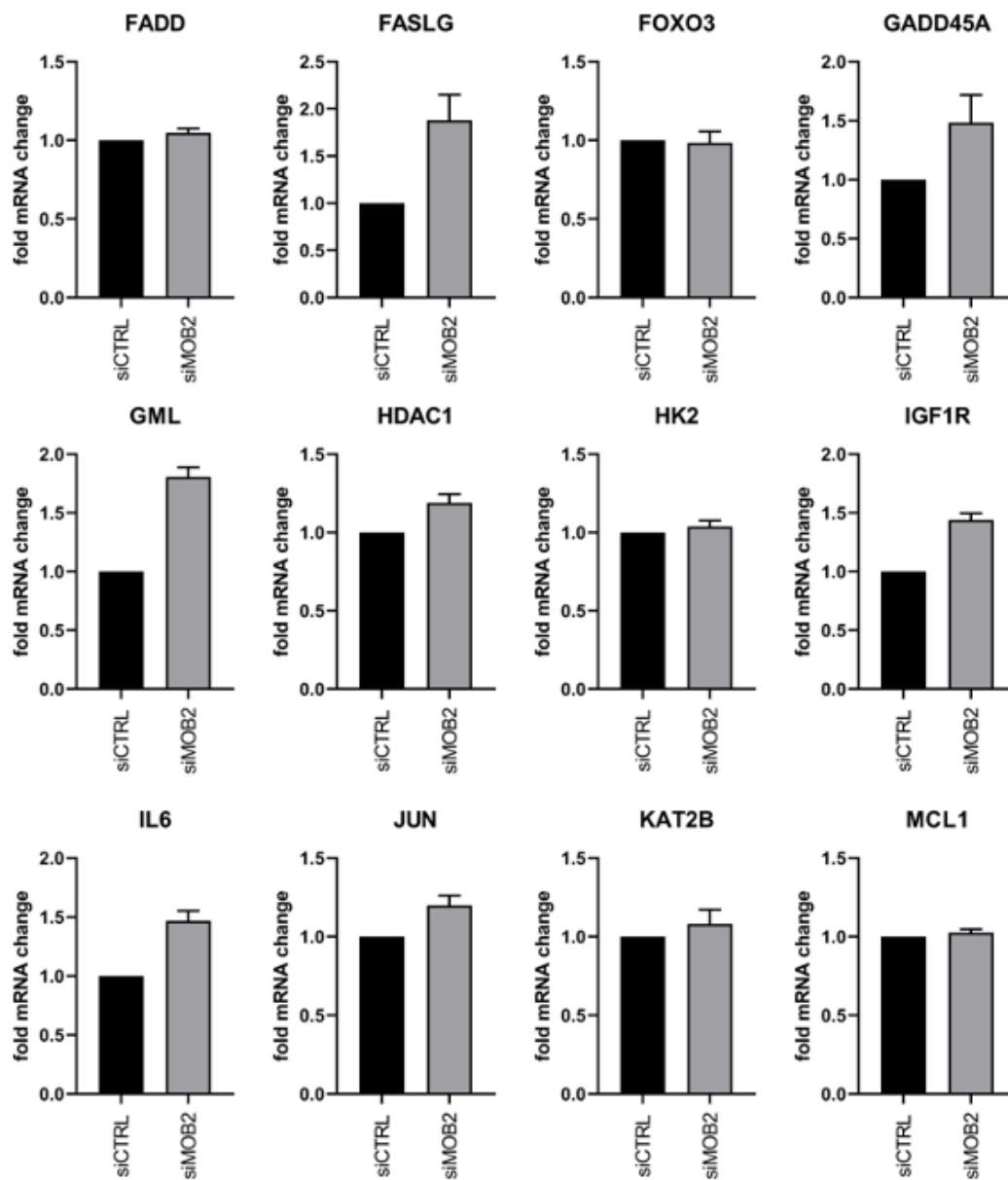
4.2.3. Azalan hMOB2 İfadesi Sonucunda Ekspresyonu Değişmeyen Genler

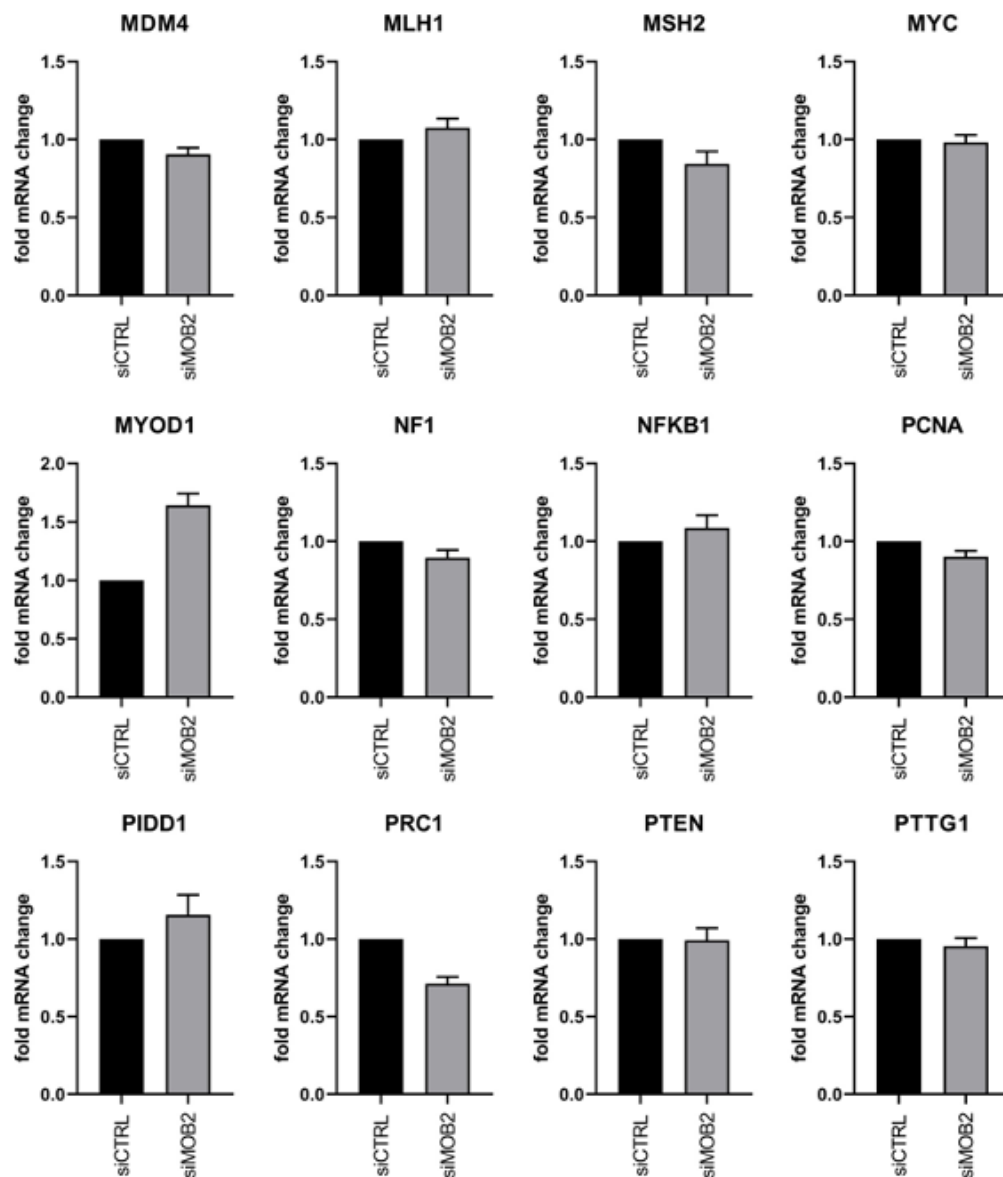
Son olarak, RT2-qPCR Array analizlerimizden elde ettiğimiz sonuçlar, azalan hMOB2 ifadesine karşı DNA hasar yanıt, DNA tamir ve apoptosis yollarında önemli rolleri bulunan *ADGRB1*, *APAF1*, *ATM*, *ATR*, *BAX*, *BBC3*, *BCL2*, *BID*, *BRCA2*, *CASP2*, *CASP9*, *CCNH*, *CDC25A*, *CDK1*, *CDK4*, *CHEK1*, *CHEK2*, *CRADD*, *E2F1*, *E2F3*, *EGFR*, *EGF1*, *EI24*, *ESR1*, *FADD*, *FASLG*, *FOXO3*, *GADD45A*, *GML*, *HDAC1*, *HK2*, *IGF1R*, *IL6*, *JUN*,

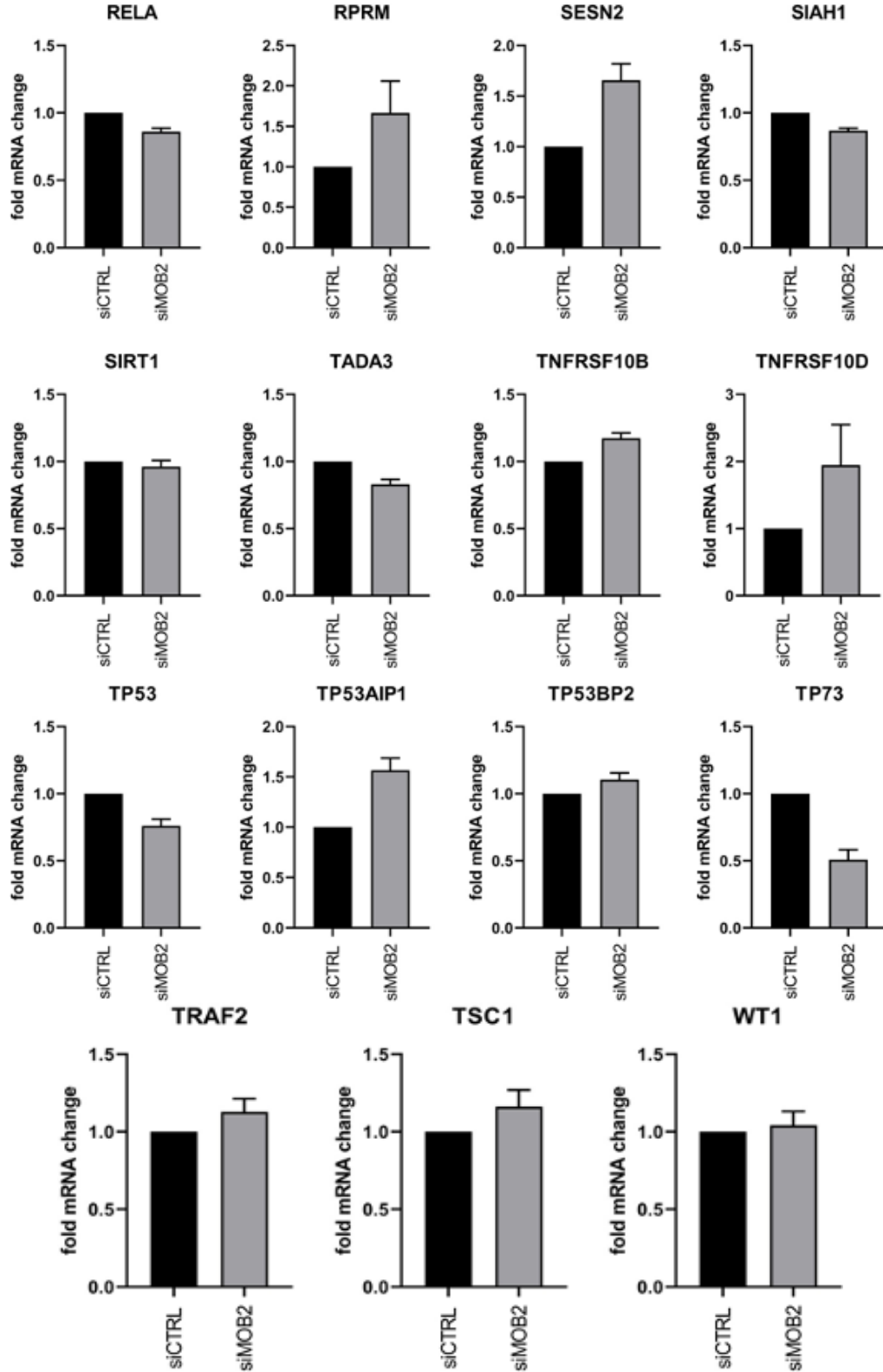
KAT2B, MCL1, MDM4, MLH1, MSH2, MYC, MYOD1, NF1, NFKB1, PCNA, PIDD1, PRC1, PTEN, PTTG1, RELA, RPRM, SESN2, SIAH1, SIRT1, TADA3, TNFRSF10B, TNFRSF10D, TP53, TP53AIP1, TP53BP2, TP73, TRAF2, TSC1 ve *WT1* genlerin mRNA ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde değişmediği gösterilmiştir (Şekil 4.5).









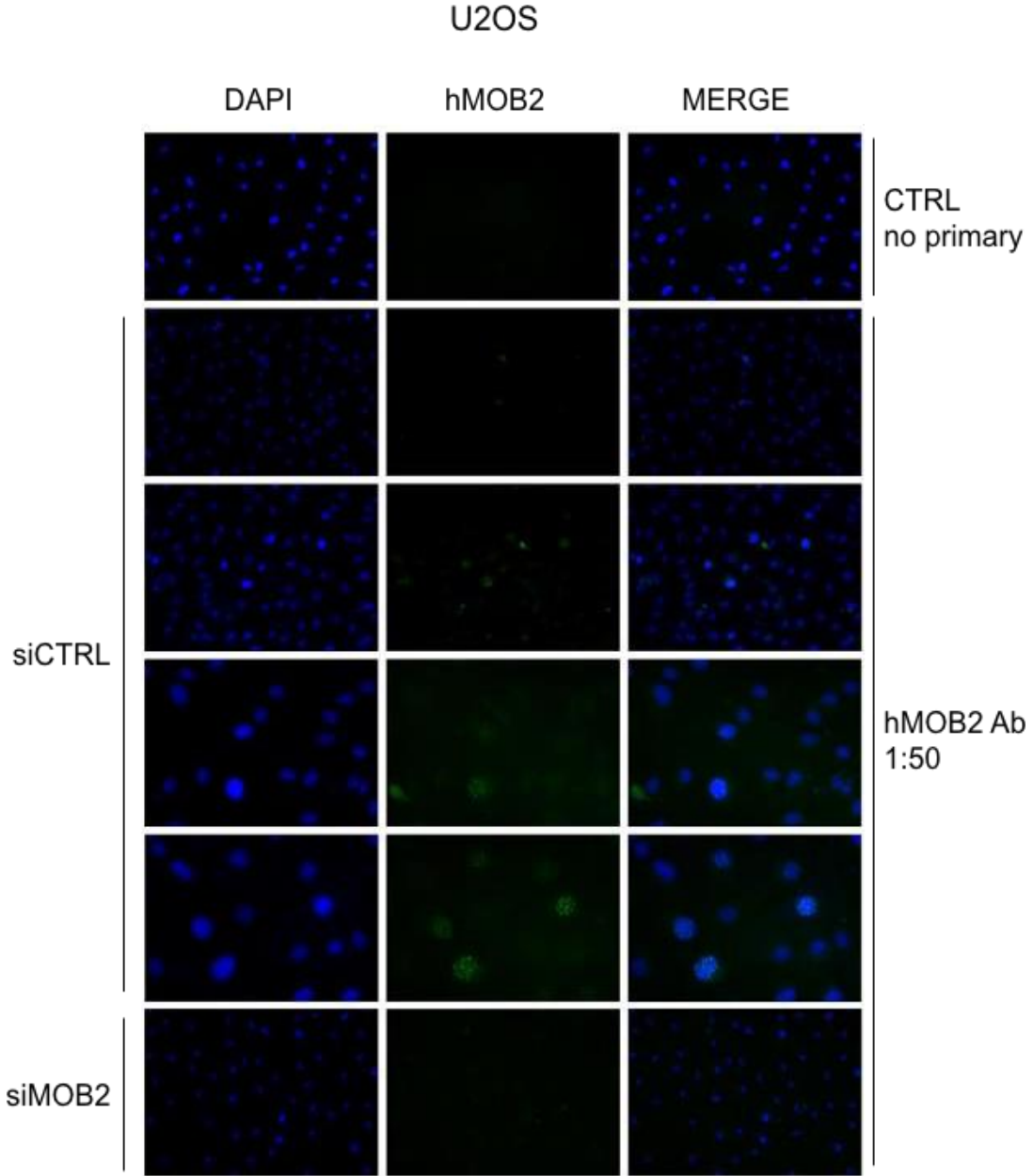


Şekil 4.5. hMOB2 ifadesi baskılanan U2OS kanser hücrelerinde ekspresyonu değişmeyen genler. RT ve PCR kontrollerinin yanı sıra *B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *ACTB* ve *GAPDH* housekeeping genleri referans olarak kullanıldı. qPCR-array veri analizi ilgili firma tarafından sağlanan hazır excel şablonu kullanılarak Livak ve Schmittgen tarafından tanımlanan $\Delta\Delta C_q$ metoduna (Livak et al., 2001) göre gerçekleştirildi. Student's t-test kullanılarak hesaplanan p değerinin 0,05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

4.3. Hücrelerin Eksojen DNA Hasarına Yanıtında hMOB2 Proteininin Subsellüler Lokalizasyonunun Belirlenmesi

Hücrelerin eksojen DNA hasarına verdikleri yanıtta ilk olarak γ H2AX proteini DNA çift zincir kırıklarını anında tespit ederek ATM-MRN aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. ATM protein kinazlar, RAD51, p53, 53BP1 ve BRCA2 başta olmak üzere 700 den fazla proteinin post-translasyonel modifikasyonunun gerçekleşmesinde görev aldığı bilinmektedir (Bakkenist and Kastan, 2003; J.-H. Lee and Paull, 2004; Matsuoka et al., 2007). ATM protein kinazlar ile etkileşim içerisinde olan proteinlerin DNA hasarı sonrası odak formasyonları immunofloresans yöntemleriyle tespit edilebilmektedir (Kuo and Yang, 2008).

Çalışmamız kapsamında, Dr. Alexander Hergovich tarafından temin edilen ve monoklonal hMOB2 antikoru üreten hybridoma klonlarından elde edilen antikorların immüno Floresans aplikasyonundaki etkinliği teyit edildi (Şekil 4.6). Gerçekleştirilen ön çalışmalar kapsamında, jelatin ile kaplı steril lamel üzerine pasajlanan hücreler 0,3 μ M mitomisin C ile 24 saat süreyle tedavi edilmiştir. Akabinde sırasıyla paraformaldehit ve Triton X-100 solüsyonu kullanılarak fikse ve permeabilize edilen hücreler blokama işleminden sonra ilgili primer antikor ile +4°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir (anti-hMOB2 rabbit antibody, 1:50). Ertesi gün anti-FITC ve DAPI ile 2 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilen hücrelerin bulunduğu lameller lam üzerine sabitlenmiş olup preparatların analizleri immüno Floresans mikroskopta gerçekleştirilmiştir. Negatif ve siMOB2 kontrol grupları kullanılarak elimizdeki antikorun hMOB2 özgünlüğü tespit edilmiştir. Buna göre normal kontrol hücrelerinde hMOB2 odak oluşumu gözlenirken hMOB2’nin baskılandığı gruplarda herhangi bir odak gözlenmemiştir.

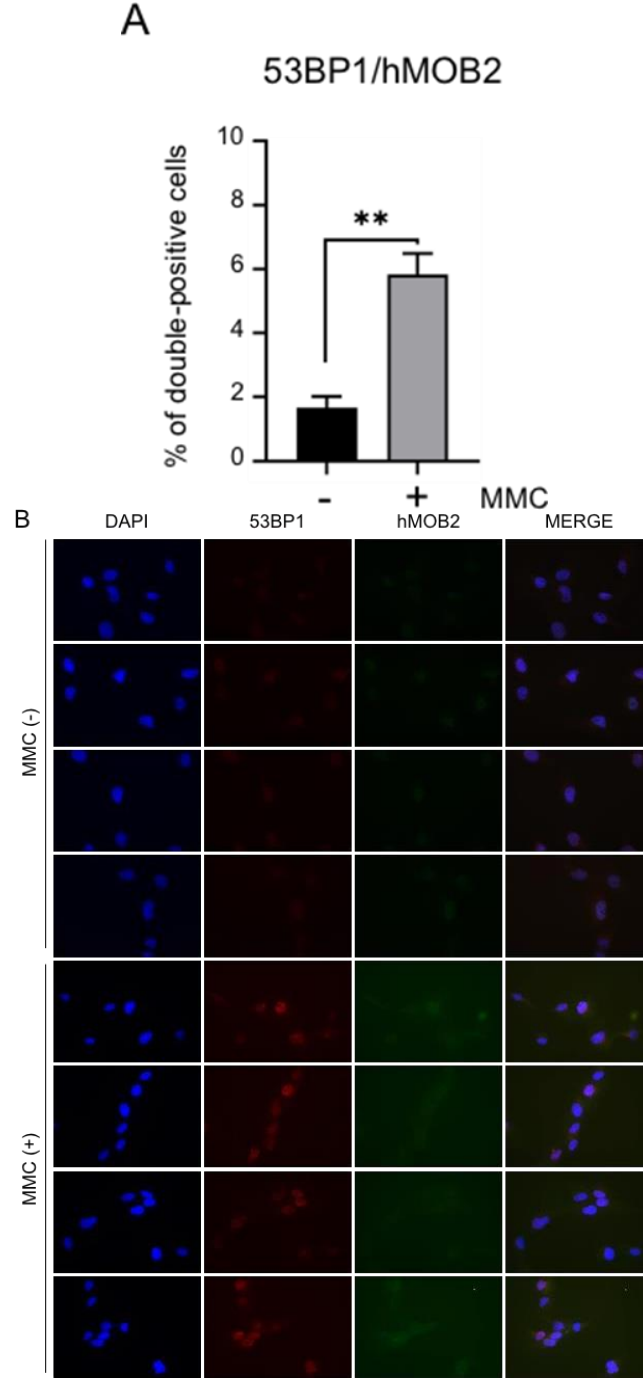


Şekil 4.6. Anti-hMOB2 antikorunun immüno Floresans etkinliğinin teyit edilmesi. 1×10^5 U2OS hücresi (parental) veya Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı ve ilgili siRNA (siCTRL ve siMOB2) ile transfekte edilen 1×10^5 U2OS hücresi 6-kuyucuklu plakalara yerleştirilen ve %0,1 jelatinile kaplanan steril lamel üzerine pasajlanmıştır. Ertesi gün hücreler $0,3 \mu\text{M}$ mitomisin C ile 24 saat süreyle tedavi edilmiştir. Sonrasında, %4 PFA (pH 7,4) solüsyonu kullanılarak hücreler fikse edilmiş ve %0,5 Triton X-100 solüsyonu kullanılarak hücre membranının permeabilizasyonu sağlanmıştır. Lamel üzerinde bulunan hücreler immüno Floresans bloklayıcı tamponu ile inkübe edildikten sonra ilgili primer antikor ile 4°C 'de gece boyunca inkübe edilmiştir (anti-hMOB2 rabbit antibody, 1:50). Aynı şekilde bloklayıcı tamponu içerisinde dilüe edilen ilgili sekonder antikor (FITC, anti-rabbit 1:200, Santa Cruz #sc2359) ve DAPI (1:1000) ile 2 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilen hücrelerin bulunduğu lameller lam üzerine yerleştirildi ve lamel köşeleri parmak ojesiyle sabitlenmiştir. Elde edilen preparatların analizleri immüno Floresans mikroskopta gerçekleştirilmiştir. Ab: antibody. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

4.3.1. Hücrelerin Eksojen DNA Hasarına Maruziyeti ile 53BP1-hMOB2 Ko-lokalizasyonunun Belirlenmesi

Ökaryotik hücrelerin kalıtım materyali endojen ve eksojen kaynaklı genotoksik saldırılara maruz kaldığı bilinmektedir. Genotoksik saldırıları önlemek için hücrelerin kompleks bir DDR mekanizmasına sahiptir. *TP53BP1* (tumour protein p53 binding protein 1) geni tarafından ifade edilen 53BP1 proteini, hasar tespit proteini olan γ H2AX ile ko-lokalize olduğu gösterilmiştir (Rappold et al., 2001). DNA hasarı durumunda 53BP1 proteini, RAD51, NBS1 ve BRCA1 gibi DNA hasar yanıt mekanizmasında rol oynadığı bilinen proteinlerle etkileşim içinde olduğu ve bu etkileşimin hasarlı kromatinin üzerinde ko-lokalizasyon ile açıklanmıştır (Ward et al., 2003; Gupta et al., 2014; Panier and Boulton, 2014; Mirza-Aghazadeh-Attari et al., 2019).

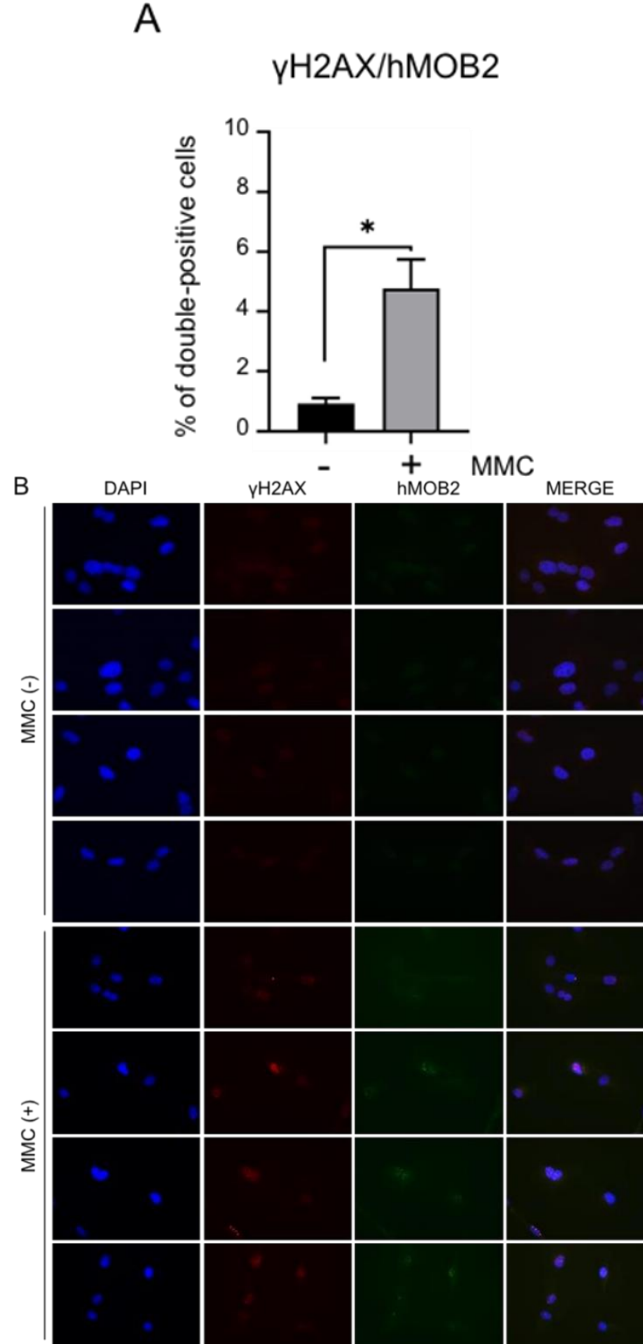
MMC ile 24 saat tedavi edilerek eksojen DNA hasarına maruz kalan hücrelerde 53BP1-hMOB2 ko-lokalizasyonunun belirlenmesine yönelik yaptığımız çalışmada, DNA hasarı durumunda 53BP1 ve hMOB2 proteinlerinin ko-lokalize olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.7). 53BP1'in, DNA çift zincir kırıklarının onarımında rol oynayan proteinleri hasarlı kromatin alanına toplayan moleküler bir scaffold protein olarak görev yaptığı ve oluşan söz konusu katastrofik lezyonların hangi mekanizmayla (homolog rekombinasyon veya homolog olmayan uçların birleştirilmesi) tamir edileceğini belirleyen önemli bir hücresel faktör olduğu dikkate alındığında (Panier and Boulton, 2014), elde edilen sonuçlar; hMOB2'nin MMC tedavisi neticesinde oluşan DNA çift zincir kırıklarının bulunduğu alanlarda lokalize olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.7. Eksojen DNA hasarına maruz kalan hücrelerde 53BP1-hMOB2 ko-lokalizasyonunun belirlenmesi. 1x10E5 U2OS hücresi (parental) veya Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı ve ilgili siRNA (siCTRL ve siMOB2) ile transfekte edilen 1x10E5 U2OS hücresi 6-kuyucuklu plakalara yerleştirilen ve %0,1 jelatinile kaplanan steril lamel üzerine pasajlanmıştır. Ertesi gün hücreler 0,3 µM mitomisin C ile 24 saat süreyle tedavi edilmiştir. Sonrasında, %4 PFA (pH 7,4) solüsyonu kullanılarak hücreler fiks edilmiş ve %0,5 Triton X-100 solüsyonu kullanılarak hücre membranının permeabilizasyonu sağlanmıştır. Lamel üzerinde bulunan hücreler immüno Floresans bloklayıcı tamponu ile inkübe edildikten sonra ilgili primer antikör ile 4°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir (anti-hMOB2 rabbit antibody, 1:50). Aynı şekilde bloklayıcı tamponu içerisinde dilüte edilen ilgili sekonder antikör (FITC, anti-rabbit 1:200, Santa Cruz #sc2359) ve DAPI (1:1000) ile 2 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilen hücrelerin bulunduğu lameller lam üzerine yerleştirildi ve lamel köşeleri parmak ojesiyle sabitlenmiştir. Elde edilen preparatların analizleri immüno Floresans mikroskopta gerçekleştirilmiştir. Ab: antibody. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

4.3.2. Hücrelerin Eksojen DNA Hasarına Maruziyeti ile γ H2AX-hMOB2 Ko-lokalizasyonunun Belirlenmesi

DNA'da oluşan çift zincir kırıkları, hücrelerin eksojen ve endojen saldırılara maruz kalması nedeniyle veya oluşan tek zincir kırıklarının çift zincir kırıklarına dönmesi neticesinde oluşabilmektedir (Khanna and Jackson, 2001; Lindahl and Barnes, 2000). Çeşitli hasar sonucu oluşan çift zincir kırığının tedavisinde öncelikle DDR sistemi hasar sensör proteini olan H2AX'in fosforilasyonu gerçekleşmektedir (Kobayashi et al., 2002; Krejci et al., 2012). H2AX proteini, DNA çift zincir kırıklarının anında tespitini sağlayarak onarım mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin aktivasyon süreçlerinde önem arz etmektedir. Bu nedenle, γ H2AX Ser139 varlığı DNA çift zincir kırık indikatörü olarak kullanılmaktadır (Kuo and Yang, 2008). γ H2AX varlığının DNA çift zincir kırık lezyonlarının indikatörü olduğu dikkate alındığında (Kuo and Yang, 2008) elde ettiğimiz bulgular, hMOB2 proteininin MMC tedavisi sonucu oluşan DNA çift zincir kırıklarının bulunduğu alanlarda lokalize olduğunu göstermektedir (Şekil 4.8).

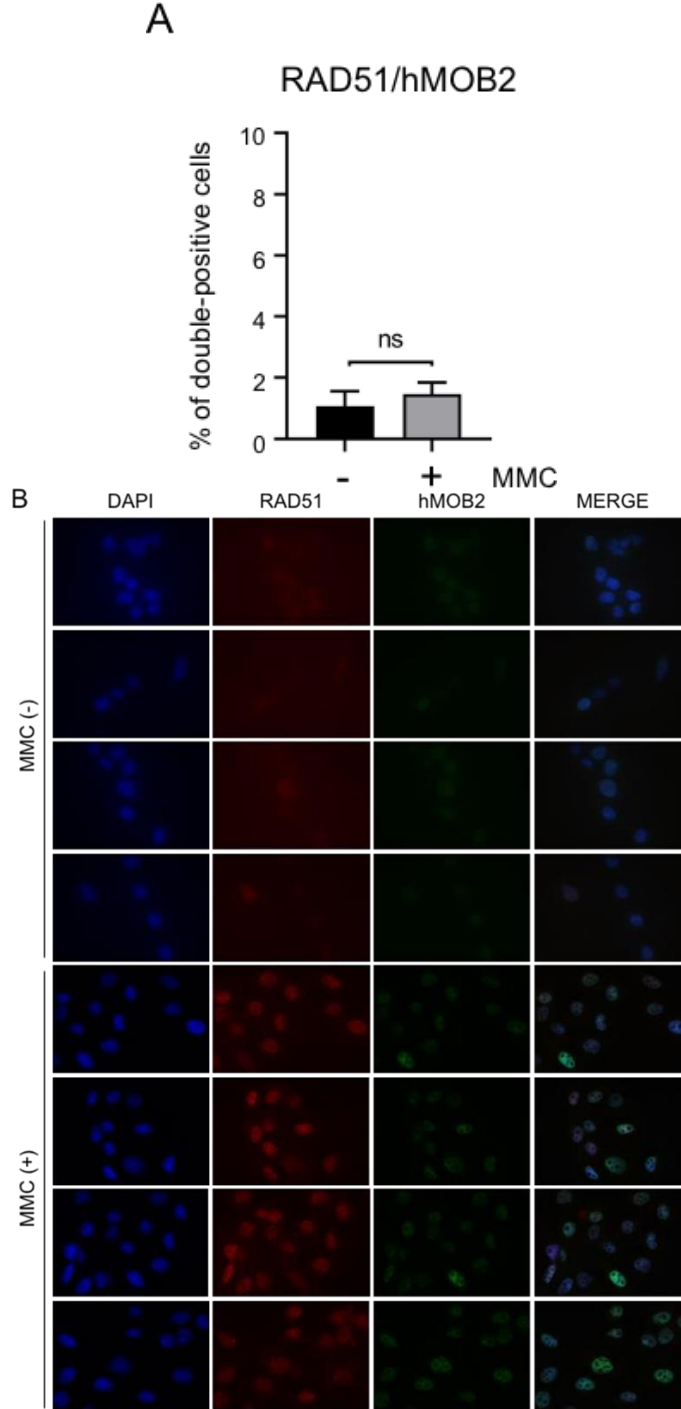


Şekil 4.8. Eksojen DNA hasarına maruz kalan hücrelerde γ H2AX-hMOB2 ko-lokalizasyonunun belirlenmesi. 1×10^5 U2OS hücresi (parental) veya Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı ve ilgili siRNA (siCTRL ve siMOB2) ile transfekte edilen 1×10^5 U2OS hücresi 6-kuyucuklu plakalara yerleştirilen ve %0,1 jelatinle kaplanan steril lamel üzerine pasajlanmıştır. Ertesi gün hücreler 0,3 μ M mitomisin C ile 24 saat süreyle tedavi edilmiştir. Sonrasında, %4 PFA (pH 7,4) solüsyonu kullanılarak hücreler fiks edilmiş ve %0,5 Triton X-100 solüsyonu kullanılarak hücre membranının permeabilizasyonu sağlanmıştır. Lamel üzerinde bulunan hücreler immüno Floresans bloklama tamponu ile inkübe edildikten sonra ilgili primer antikor ile 4°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir (anti-hMOB2 rabbit antibody, 1:50). Aynı şekilde bloklama tamponu içerisinde dilüte edilen ilgili sekonder antikor (FITC, anti-rabbit 1:200, Santa Cruz #sc2359) ve DAPI (1:1000) ile 2 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilen hücrelerin bulunduğu lameller lam üzerine yerleştirildi ve lamel köşeleri parmak ojesiyle sabitlenmiştir. Elde edilen preparatların analizleri immüno Floresans mikroskopta gerçekleştirilmiştir. Ab: antibody. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

4.3.3. Hücrelerin Eksojen DNA Hasarına Maruziyeti ile RAD51-hMOB2 Ko-lokalizasyonunun Belirlenmesi

RAD51, homolog rekombinasyon DNA çift zincir kırık onarım mekanizmasında rol oynayan önemli bir regülatördür (Yata et al., 2012). Daha önceki yapılan çalışmada, hMOB2 ifadesi geçici olarak baskılanan hücrelerde endojen kaynaklı DNA çift zincir kırıklarının biriktiği ve G1/S kontrol noktasında hücre döngüsünün durdurulduğu belirlenmiştir (Gomez et al., 2015). Hücre döngüsünün ATM-CHEK2-p53-p21 yolu üzerinden durdurulması (Gomez et al., 2015), RAD51 enziminin DNA çift zincir kırığı tamir mekanizmasında rol oynayan önemli bir regülatör olduğunu göstermiştir. Bir başka çalışmada ise PLK1 kaynaklı RAD51 Ser14 fosforilasyonunun homolog rekombinasyon DNA çift zincir tamir onarım mekanizmasındaki işlevselliğini ortaya çıkarmaktadır (Yata et al., 2012). hMOB2 defektif hücrelerde yapılan çalışmada RAD51 Ser14 fosforilasyonunun tam olarak işlev görmediği rapor edilmiştir (Gundogdu et al., 2021).

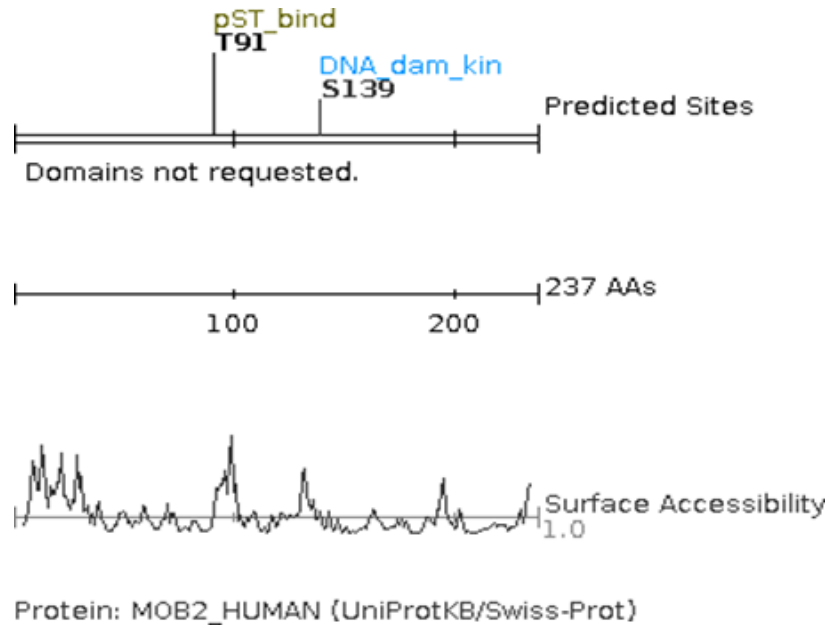
Elde edilen sonuçlara dikkate alarak gerçekleştirdiğimiz immüno Floresans analizleriyle eksojen DNA hasarına karşı RAD51 ve hMOB2 proteinlerinin muhtemel ko-lokalizasyonları araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, indüklenen eksojen DNA hasarına karşı hMOB2 ve RAD51 proteinlerinin hasarlı kromatin bölgesinde ko-lokalizasyonunun gerçekleşmediğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Eksojen DNA hasarına maruz kalan hücrelerde RAD51-hMOB2 ko-lokalizasyonunun belirlenmesi. 1×10^5 U2OS hücresi (parental) veya Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı ve ilgili siRNA (siCTRL ve siMOB2) ile transfekte edilen 1×10^5 U2OS hücresi 6-kuyucuklu plakalara yerleştirilen ve %0,1 jelatinle kaplanan steril lamel üzerine pasajlanmıştır. Ertesi gün hücreler 0,3 μ M mitomisin C ile 24 saat süreyle tedavi edilmiştir. Sonrasında, %4 PFA (pH 7,4) solüsyonu kullanılarak hücreler fiks edilmiş ve %0,5 Triton X-100 solüsyonu kullanılarak hücre membranının permeabilizasyonu sağlanmıştır. Lamel üzerinde bulunan hücreler immüno Floresans bloklama tamponu ile inkübe edildikten sonra ilgili primer antikor ile 4°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir (anti-hMOB2 rabbit antibody, 1:50). Aynı şekilde bloklama tamponu içerisinde dilüte edilen ilgili sekonder antikor (FITC, anti-rabbit 1:200, Santa Cruz #sc2359) ve DAPI (1:1000) ile 2 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilen hücrelerin bulunduğu lameller lam üzerine yerleştirildi ve lamel köşeleri parmak ojesiyle sabitlenmiştir. Elde edilen preparatların analizleri immüno Floresans mikroskopta gerçekleştirilmiştir. Ab: antibody. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

4.4. hMOB2 Proteininin Protein-Protein Etkileşim ve Post-Translasyonel Modifikasyon Statüsünün Saptanması

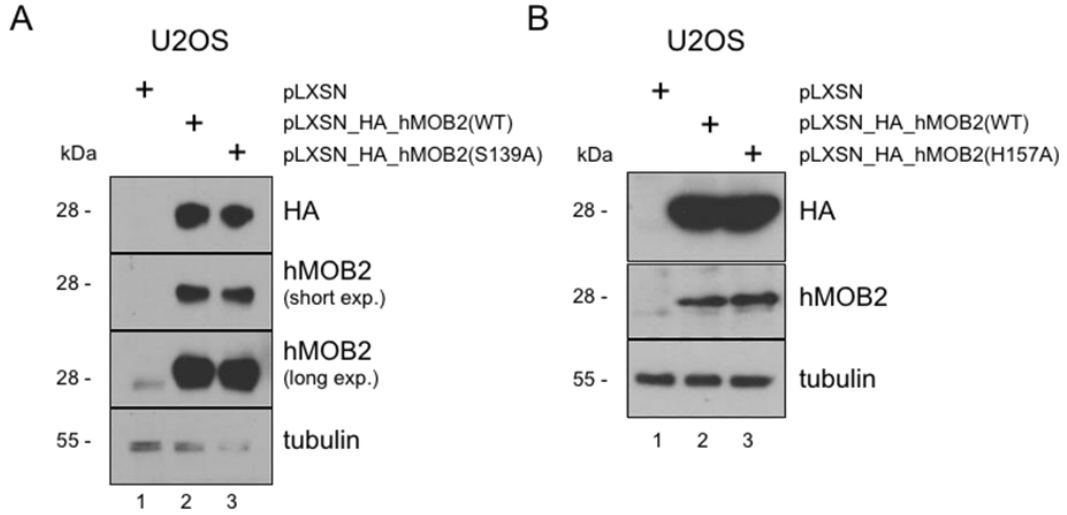
Potansiyel olarak önemli bir homolog rekombinasyon DNA onarım faktörü ve PARP inhibitör duyarlılığının belirleyicisi olması nedeniyle (Gundogdu et al., 2021), hMOB2'nin muhtemel post-translasyonel modifikasyonunun ve protein-protein etkileşiminin biyolojik öneminin ortaya çıkarılması önem arz etmektedir. Bu amaçla, U2OS hücrelerinde wild-type *hMOB2* geni ve mutant gen varyasyonları ektopik olarak sentezlenerek PARP inhibitör duyarlılık fenotipi araştırılmıştır. Bu kapsamda, online veri tabanı scansite taramasında (Obenauer et al., 2003) hMOB2'nin DNA hasar yanıt regülatörü olan ATM kinaz tarafından muhtemelen S139 bölgesinden fosforile olabileceği önerilmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. hMOB2 proteini için scansite taramasında tespit edilen muhtemel ATM fosforilasyon bölgesi (S139) (Obenauer et al., 2003)

hMOB2 wild-type ve mutant versiyonlarının U2OS kanser hücrelerindeki kalıcı ekspresyonları için neomisin dirençli retroviral bir vektör olan pLXSN plazmidi kullanıldı. Potansiyel olarak hMOB2 fosforilasyonunun ve hMOB2-NDR etkileşiminin sağlandığı amino asitleri kodlayan ilgili baz dizileri, pLXSN_HA_MOB2 (WT) plazmidi üzerinde PCR mutagenез ("site-directed mutagenesis") tekniğiyle oluşturulan nokta mutasyonlarla

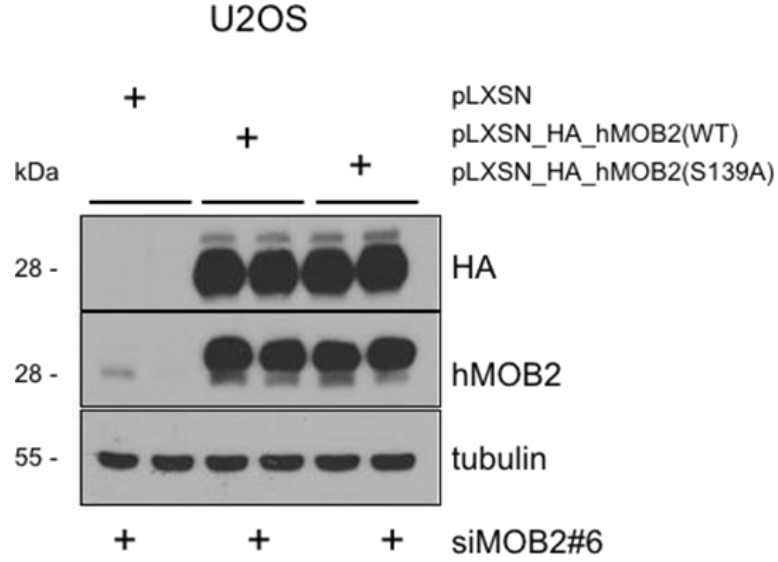
değiştirildi ve ilgili modifikasyonlar (139 S→A, 157 H→A) sekans analiziyle teyit edilmiştir (söz konusu deneysel süreçler Dr. Alexander Hergovich tarafından gerçekleştirilmiştir). İlgili transfeksiyonlar gerçekleştirilen Western blot analizleriyle teyit edilmiştir. Şekil 4.11’de görüldüğü üzere hMOB2 over ekspresyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.11. U2OS kanser hücrelerinde ektojik hMOB2 wild-type ve mutant formlarının kalıcı olarak ifade edilmesi. (A,B) 2×10^6 PT67 retroviral paketlenme hücresi 10-cm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün 5×10^5 U2OS hücresi 10-cm'lik hücre kültür kaplarına ekildi ve PT67 hücreleri ilgili cDNA (pLXSN(EV), pLXSN_HA_MOB2(WT), pLXSN_HA_MOB2(S139A) veya pLXSN_HA_MOB2(H157A)) ve Lipofectamine 2000 süspansiyonu ile transfekte edilmiştir. Devam eden 2 gün boyunca PT67 besiyeri dikkatli bir şekilde toplanarak filtre edilip ve hedef hücrelerin enfeksiyonu için kullanılmıştır. Son olarak kalıcı (stable) transfeksiyondan sonra yaklaşık 2 hafta süreyle neomisin seleksiyonu (G418, 750 ug/mL) gerçekleştirildi ve başarılı bir şekilde transfekte olan hücreler seçilerek hMOB2 overekspresyonu Western blot analiziyle gösterilmiştir

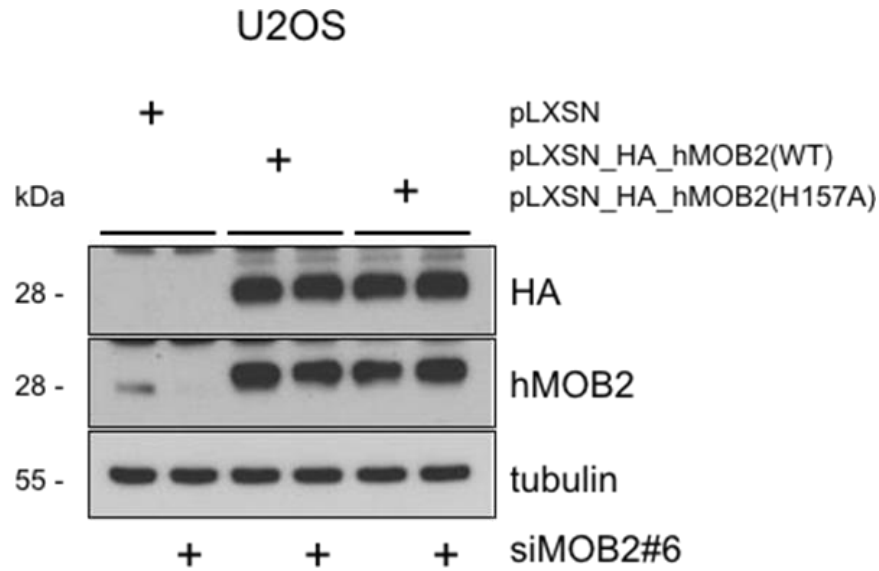
Sonraki çalışmalar neticesinde, öncelikle boş vektör, hMOB2 wild-type ve hMOB2 S139A versiyonlarını eksojen olarak ifade eden U2OS hücrelerindeki endojen hMOB2 ifadesi ilgili mRNA'nın 3' UTR bölgesini hedefleyen siRNA (Qiagen, siMOB2#6) kullanılarak baskılanmıştır (Şekil 4.12). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, boş vektör (pLXSN) ile transfekte edilen U2OS hücrelerinde hMOB2 inhibisyonunun oluparib hassasiyeti oluşturduğu teyit edilmiştir (Şekil 4.13). Beklendiği üzere, ektojik olarak hMOB2 (wild-type) overekspresyonuna sahip U2OS kanser hücrelerinde endojen hMOB2 ifadesi susturulmasına rağmen oluparib hassasiyetinin oluşmadığı gözlenmiştir (phenotype rescue) (Şekil 4.13, B). Endojen hMOB2 ifadesi baskılanan ve ektojik olarak hMOB2 S139A mutant protein overekspresyonunun sağlandığı hücrelerde oluparib duyarlılığının devam ettiği (Şekil 4.13, C) ve dolayısıyla ATM kinaz tarafından muhtemel fosforilasyon

bölgesi olarak önerilen amino asit modifikasyonunun, hMOB2 proteininin olaparib yanıtına katkısının olmadığı belirlenmiştir.

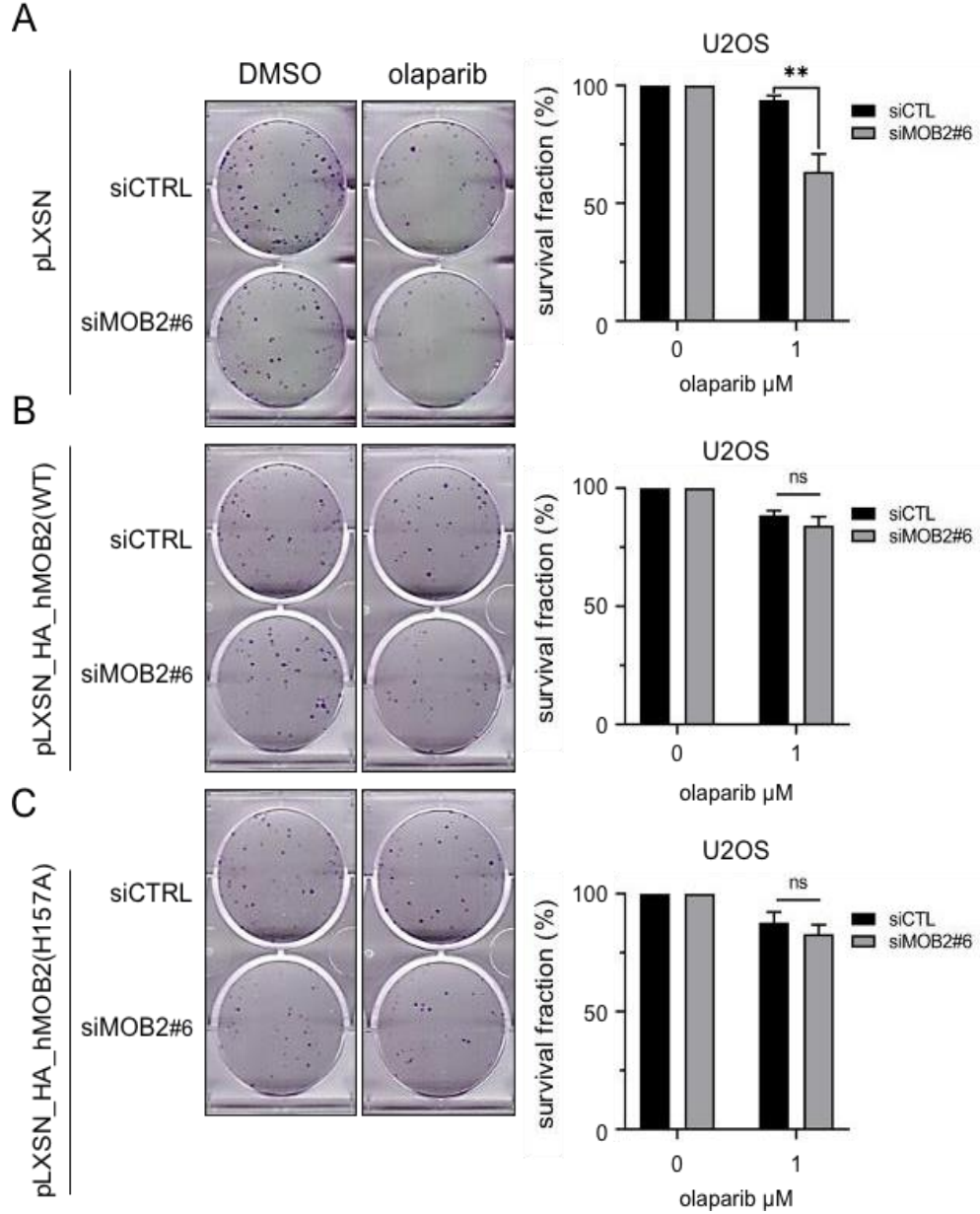


Şekil 4.12. Boş vektör, hMOB2 wild-type veya hMOB2 S139A mutant formlarını ifade eden U2OS kanser hücrelerindeki endojen hMOB2 ifadesinin susturulması. Logaritmik büyüme eğrisine sahip ilgili U2OS kanser hücrelerinin tripsinizasyon işleminden sonra sayımı gerçekleştirilmiştir. Kontrol (siCTRL) ve hMOB2 (siMOB2#6) siRNA kompleksleri ve Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı 1:2 oranda OPTI-MEM içerisinde dilüte edilerek 15 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu esnada her bir transfeksiyon için 5x10E5 U2OS(EV), 5x10E5 U2OS(hMOB2-WT) veya 5x10E5 U2OS (hMOB2-S139A) hücresi DMEM içerisinde süspanse edildi. inkübasyon sürelerinin ardından karıştırılan siRNA/Lipofectamine/hücre süspansiyonu son konsantrasyonu 5 nM olacak şekilde 6-cm'lik petri kutularına transfer edilmiştir. Hücreler 24 saatlik transfeksiyondan sonra toplanarak protein lizatı oluşturuldu ve Western blot işlemi gerçekleştirilerek baskılanan hMOB2 miktarı tespit edilmiştir

Yapılan diğer deneylerde, endojen hMOB2 ifadesi baskılanan ve ektopik olarak hMOB2 H157A mutant protein overekspresyonunun sağlandığı hücrelerde (Şekil 4.14) olaparib duyarlılığının devam ettiği (Şekil 4.15) ve dolayısıyla hMOB2-NDR1 protein-protein etkileşiminin gerçekleştiği amino asit bölgesinin, hMOB2 proteininin olaparib yanıtına katkısının olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak gerçekleştirdiğimiz analizlerde, U2OS kanser hücrelerinde hMOB2 eksikliğiyle ortaya çıkan olaparib hassasiyet fenotipinin ektopik hMOB2 ekspresyonu ile kurtarıldığı teyit edilmiştir ancak hMOB2-NDR1 protein-protein etkileşiminin (Kohler et al., 2010) ve ATM tarafından potansiyel hMOB2 fosforilasyonunun söz konusu olaparib yanıtına bir katkı sunmadığı ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 4.14. Boş vektör, hMOB2 wild-type veya hMOB2 H157A mutant formlarını ifade eden U2OS kanser hücrelerindeki endojen hMOB2 ifadesinin susturulması. Logaritmik büyüme eğrisine sahip ilgili U2OS kanser hücrelerinin tripsinizasyon işleminden sonra sayımı gerçekleştirildi. Kontrol (siCTRL) ve hMOB2 (siMOB2#6) siRNA kompleksleri ve Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı 1:2 oranda OPTI-MEM içerisinde dilüe edilerek 15 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu esnada her bir transfeksiyon için 5x10E5 U2OS(EV), 5x10E5 U2OS(hMOB2-WT) veya 5x10E5 U2OS(hMOB2-H157A) hücresi DMEM içerisinde süspanse edildi. İnkübasyon sürelerinin ardından karıştırılan siRNA/Lipofectamine/hücre süspanasyonu son konsantrasyonu 5 nM olacak şekilde 6-cm'lik petri kutularına transfer edildi. Hücreler 24 saatlik transfeksiyondan sonra toplanarak protein lizatı oluşturuldu ve Western blot işlemi gerçekleştirilerek baskılanan hMOB2 miktarı tespit edilmiştir



Şekil 4.15. hMOB2-NDR1 protein-protein bölgesinin olaparib fenotipi üzerine olan katkısının belirlenmesi. (A,B,C) siCTRL ve siMOB2#6 kompleksleri ve Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı 1:2 oranda OPTI-MEM içerisinde dilüte edilerek 15 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu esnada her bir transfeksiyon için (siCTRL ve siMOB2) eksponansiyel büyüme eğrisine sahip 1×10^5 U2OS(EV), 1×10^5 U2OS(hMOB2-WT) veya 1×10^5 U2OS(hMOB2-H157A) hücresi DMEM içerisinde süspanse edildi. Ardından, $1,5 \times 10^3$ U2OS hücresi 6-kuyucuklu plakalara ekildi. Ekimi gerçekleştirilen transfekte edilmiş hücreler 24 saat sonra DMSO veya olaparib (1μ M) ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Tedavinin ardından hücrelerin besiyerleri tazelenerek %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik inkübatörde 12 gün inkübasyonu takip edildi. Yeterli büyüklüğe ulaşan koloniler, Metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika süreyle fikse edilen koloniler %0,5 kristal viyole boyası ile 15 dakika boyunca boyanmıştır. Ardından petripler musluk suyu ile dikkatlice yıkanarak kurumaları için gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Taranan kolonilerin analizleri Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. siCTRL ve siMOB2 tedavi gruplarının sağ-kalım oranı (SF%) ilgili kontrol gruplarının ekim yeterliliğine (PE%) normalize edildi ve sonuçların istatistiksel analizi Student's t-test ile gerçekleştirilmiştir. DMSO<0,1% (v/v)

4.5. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinin MCF-7 Hücre Canlılığına Olan Etkisinin Belirlenmesi

RNA interferans uygulamalarımız (Gündoğdu vd., 2009), ilgili siRNA ve transfeksiyon ajanlarını temin edeceğimiz firmanın protokolünde belirtildiği üzere (Gomez et al., 2015) ve (Gundogdu et al., 2021)'de anlatıldığı şekliyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarımızda hMOB2 gen sentezinden sorumlu ORF bölgesi hedeflenerek tasarlanmış olan siRNA'lar kullanılmıştır. İlgili siRNA komplekslerinin hedef mRNA'yı susturma kapasitesi, herhangi bir mRNA'yı baskılama etkisine sahip olmayan (non-silencing) siRNA kompleksleri (siCTRL) ile karşılaştırmalı olarak kontrol edilmiştir. Kullanılan siRNA ve transfeksiyon ajanı oranları ve hücrelerin asgari ne kadar süre ile siRNA manipülasyonuna maruz kalması gerektiği (Gomez et al., 2015)'de belirtildiği şekilde uygulanan pilot deneylerle tespit edilmiştir. Kısaca, 100 uM siRNA kompleksi optimum besiyeri içerisinde (toplam 500 µL) seyreltilmiştir. Diğer taraftan kullanılan siRNA miktarının 2 katı transfeksiyon ajanı (LipoRNAimax) ise ayrı bir tüp içerisinde bulunan optimum besiyeri içerisinde (toplam 500 µL) seyreltilmiştir. İki tüp içeriği karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 1 mL antibiyotiksiz besiyeri içerisinde bulunan hücreler ile optimum içerisinde bulunan siRNA/transfeksiyon ajanı karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır.

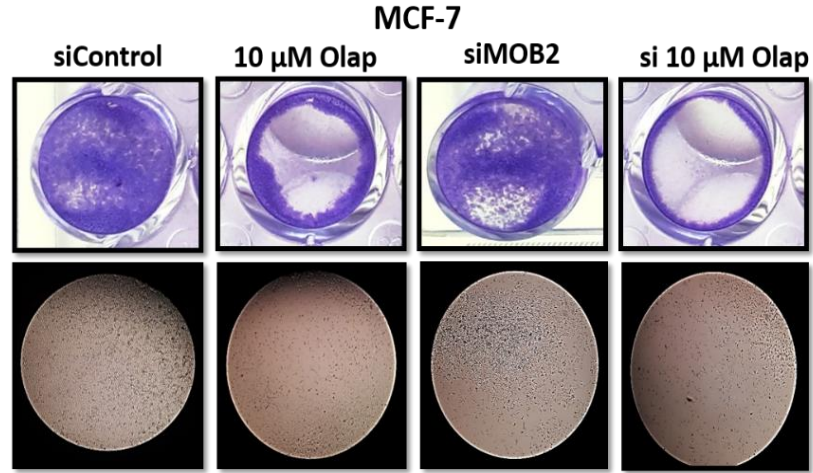
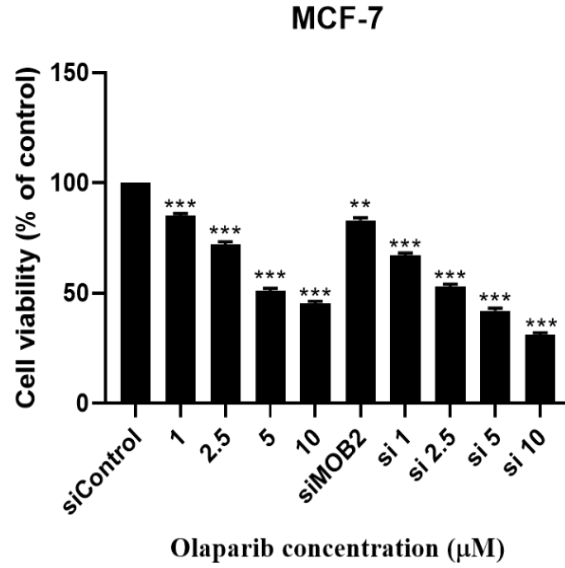
Transfekte edilen hücrelerin kristal viyole *in vitro* hücre canlılığı testi için Parker et al. (2022)'de açıkladığı protokol optimize edilmiştir (Parker et al., 2022). Öncelikle pilot deneyler planlanarak her bir ekim alanına MCF-7 hücre hatlarından ne kadar ekileceğine, olaparib, rucaparib ve veliparib ilaç konsantrasyonuna ve tedavi sürelerine karar verilmiştir.

4.5.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre Canlılığına Olan Etkisinin Belirlenmesi

Yapılan ön çalışmalar neticesinde, 24 kuyucuklu plakalara 1×10^4 transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri ekilmiştir. Transfeksiyonun 24. saatinden itibaren hücreler 1, 2,5, 5 ve 10 µM olaparib ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Belirtilen deney süresi sonunda hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkanmıştır. Ardından metanol-asetik asit (3:1)

solüsyonu ile her 24 kuyucuklu hücre çoğaltma kabına yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fikse edilmiştir. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp %1 kristal viyole (Crystal Violet) boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanmıştır. Ardından oluşan hücre proliferasyonu tarayıcı yardımıyla saptanmıştır. Daha sonra hücrelere %10 asetik asit (1 ml %100 Asetik asit + 9 ml ddH₂O) eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. Spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda hücre canlılık değerleri analiz edilip, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

RNA interferans yöntemi kullanılarak siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olup hMOB2 ifadesi baskılanmıştır. MCF-7/siCTL ve siMOB2 hücreleri olaparib artan dozlarda (1, 2,5, 5 ve 10 µg/mL) 72 saat tedavi edilmiştir (Şekil 4.16). Yapılan analiz neticesinde PARP inhibitörü olaparibin doza bağlı bir şekilde MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu engellediği saptanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla siMOB2 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Kristal viyole hücre canlılık analizi MCF-7 hücre hattı olaparib tedavisi IC₅₀ değeri 5,46 µg/mL olarak belirlenmiştir.

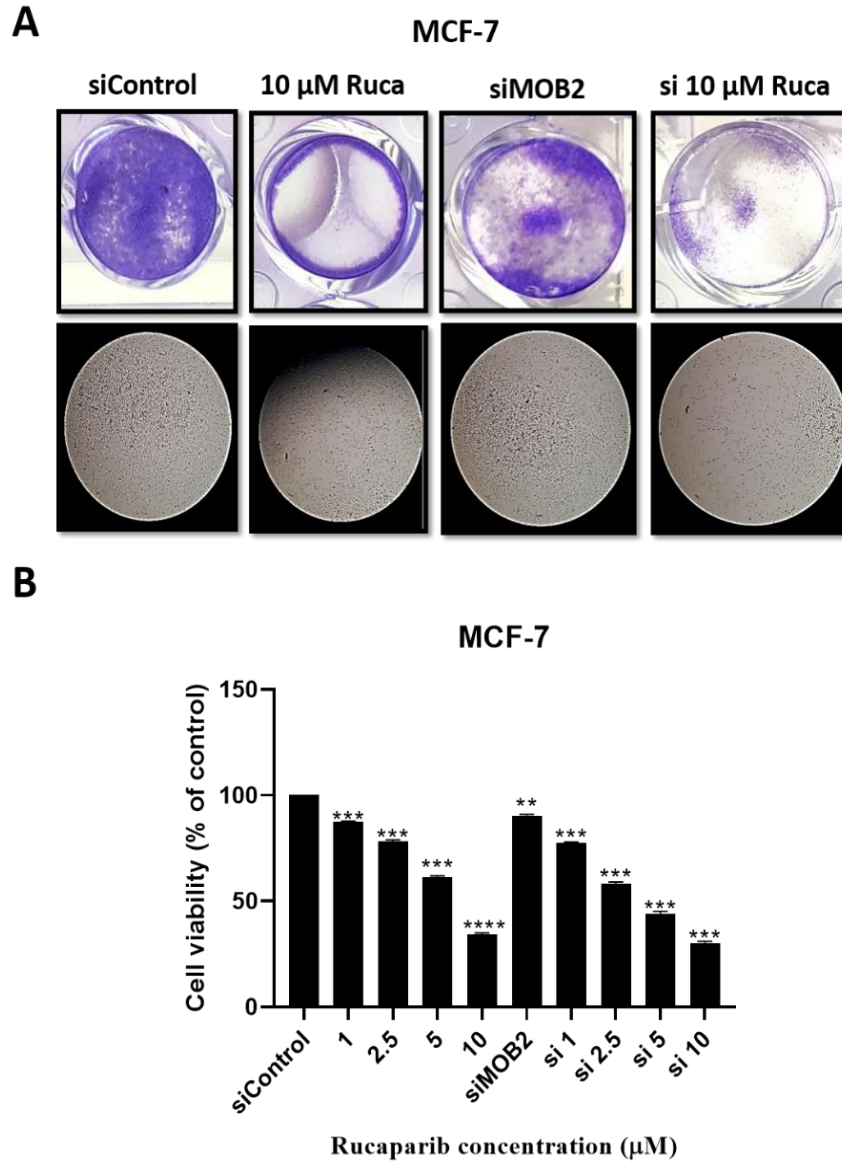
A**B**

Şekil 4.16. Olaparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerin kristal viyole hücre canlılık analizi. (A) Kristal viyole hücre canlılık deneyi için 24 kuyucuklu plakalar kullanılmış olup ilgili RNA interferans yöntemi kullanılıp olaparib tedavi süreci devam etmiştir. Belirtilen deney süresi sonunda hücrelerin genel morfolojileri mikroskop yardımıyla çekilmiştir. Ardından hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile her kuyucuğa yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fikse edilmiştir. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp %0,5 kristal viyole boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanıp %10 asetik asit solüsyonundan 1 er ml eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. (B) Spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda hücre canlılık değerleri analiz edilip, graphpad prism programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir

4.5.2. siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre Canlılığına Olan Etkisinin Belirlenmesi

Yapılan ön çalışmalar neticesinde, 24 kuyucuklu plakalara 1×10^4 transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri ekilmiştir. Transfeksiyonun 24. saatinden itibaren hücreler 1, 2,5, 5 ve 10 μM rucaparib ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Belirtilen deney süresi sonunda hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkanmıştır. Ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile her 24 kuyucuklu hücre çoğaltma kabına yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fikse edilmiştir. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp %1 kristal viyole (Crystal Violet) boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanmıştır. Ardından oluşan hücre proliferasyonu tarayıcı yardımıyla saptanmıştır. Daha sonra hücrelere %10 asetik asit (1 ml %100 Asetik asit + 9 ml ddH₂O) eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. Spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda hücre canlılık değerleri analiz edilip, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

RNA interferans yöntemi kullanılarak siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olup hMOB2 ifadesi baskılanmıştır. MCF-7/siCTL ve siMOB2 hücreleri rucaparib artan dozlarda (1, 2,5, 5 ve 10 μM) 72 saat tedavi edilmiştir (Şekil 4.17). Yapılan analiz neticesinde PARP inhibitörü rucaparibin doza bağlı bir şekilde MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu engellediği saptanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla siMOB2 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Kristal viyole hücre canlılık analizi MCF-7 hücre hattı rucaparib tedavisi IC₅₀ değeri 6,98 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.

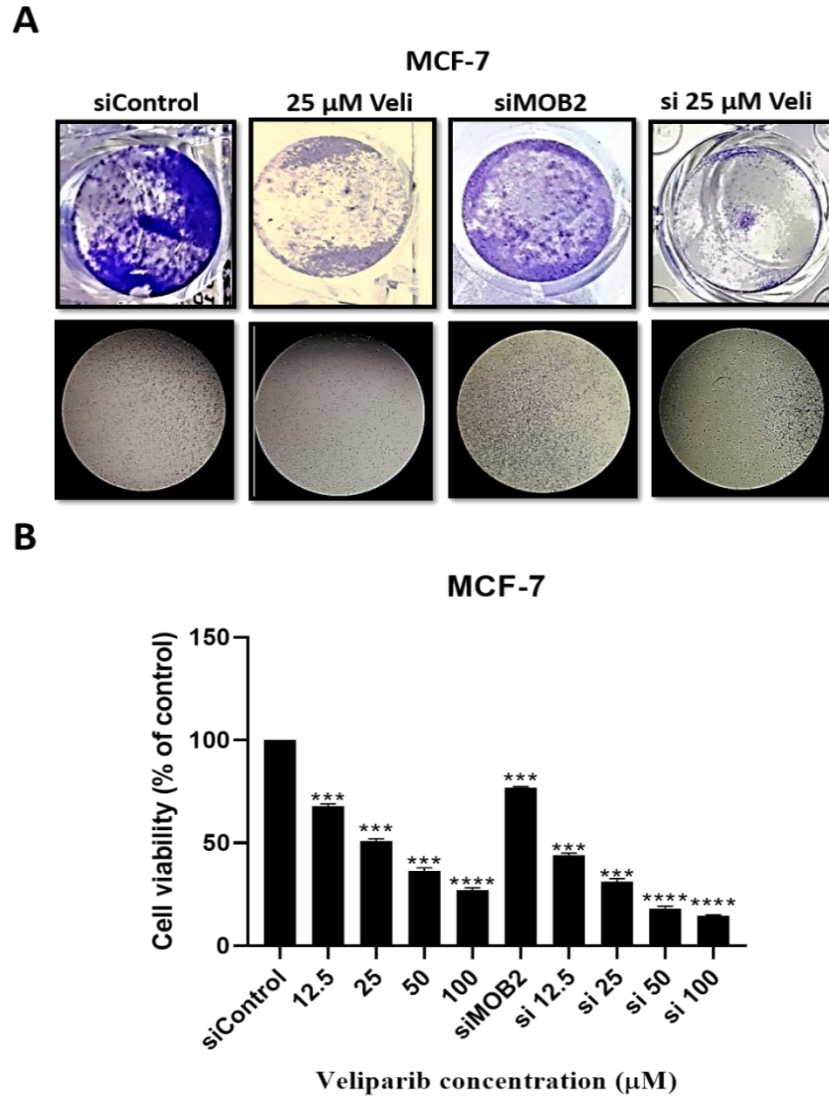


Şekil 4.17. Rucaparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerin kristal viyole hücre canlılık analizi (A) Kristal viyole hücre canlılık deneyi için 24 kuyucuklu plakalar kullanılmış olup ilgili RNA interferans yöntemi kullanılıp rucaparib tedavi süreci devam etmiştir. Belirtilen deney süresi sonunda hücrelerin genel morfolojileri mikroskop yardımıyla çekilmiştir. Ardından hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile her kuyucuğa yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fiks edilmiştir. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp %0,5 kristal viyole boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanıp %10 asetik asit solüsyonundan 1 er ml eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. (B) Spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda hücre canlılık değerleri analiz edilip, graphpad prism programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir

4.5.2. siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre Canlılığına Olan Etkisinin Belirlenmesi

Transfekte edilen hücrelerin kristal viyole *in vitro* hücre canlılığı testi için ön çalışmalar neticesinde 24 kuyucuklu plakalara 1×10^4 transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri ekilmiştir. Daha sonra 12,5, 25, 50 ve 100 μM veliparib ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Belirtilen deney süresi sonunda hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkanmıştır. Ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile her 24 kuyucuklu hücre çoğaltma kabına yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fikse edilmiştir. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp %1 kristal viyole (Crystal Violet) boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanmıştır. Ardından oluşan hücre proliferasyonu tarayıcı yardımıyla saptanmıştır. Daha sonra hücrelere %10 asetik asit (1 ml %100 Asetik asit + 9 ml ddH₂O) eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. Spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda hücre canlılık değerleri analiz edilip, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

RNA interferans yöntemi kullanılarak siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olup hMOB2 ifadesi baskılanmıştır. MCF-7/siCTL ve siMOB2 hücreleri veliparib artan dozlarda (12,5, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$) 72 saat tedavi edilmiştir (Şekil 4.18). Yapılan analiz neticesinde, PARP inhibitörü rucaparibin doza bağlı bir şekilde MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu engellediği saptanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla siMOB2 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Kristal viyole hücre canlılık analizi MCF-7 hücre hattı veliparib tedavisi IC₅₀ değeri 24,97 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Veliparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerin kristal viyole hücre canlılık analizi (A) Kristal viyole hücre canlılık deneyi için 24 kuyucuklu plakalar kullanılmış olup ilgili RNA interferans yöntemi kullanılıp veliparib tedavi süreci devam etmiştir. Belirtilen deney süresi sonunda hücrelerin genel morfolojileri mikroskop yardımıyla çekilmiştir. Ardından hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile her kuyucuğa yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fikse edilmiştir. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp %0,5 kristal viyole boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanıp %10 asetik asit solüsyonundan 1 er ml eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. (B) Spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda hücre canlılık değerleri analiz edilip, graphpad prism programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir

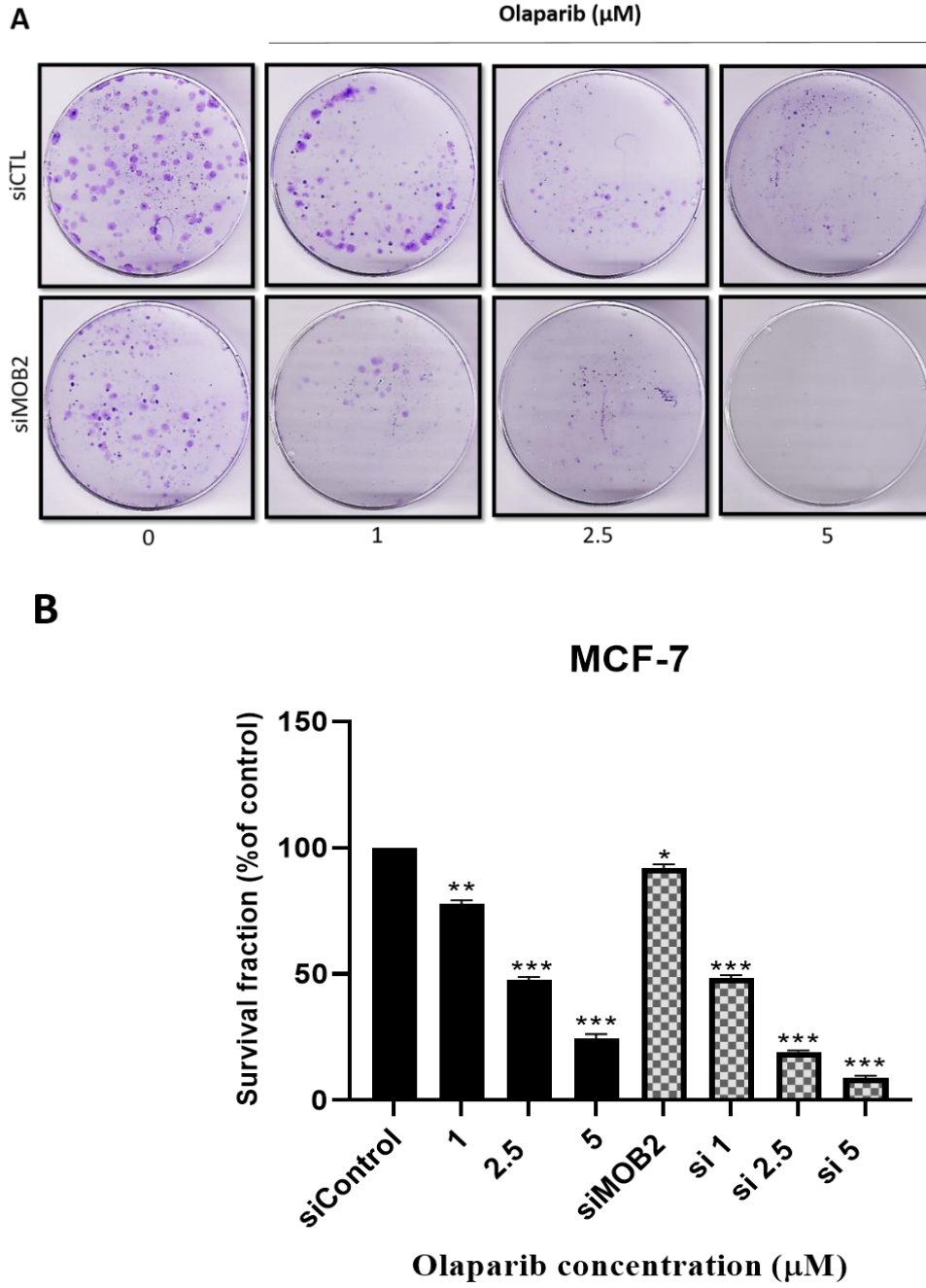
4.6. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinin MCF-7 Koloni Sağ Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi

RNA interferans yöntemi kullanılarak siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olup hMOB2 ifadesi baskılanmıştır. Transfekte edilen MCF-7 hücreleri 6 cm hücre çoğaltma kaplarına ekilmiştir. Transfeksiyonun 24. saatinden sonra transfeksiyon ajanı içeren besiyeri uzaklaştırılıp MCF-7/siCTL ve siMOB2 hücreleri artan dozlarda olaparib, rucaparib ve veliparib ile 72 saat tedavi edilmiştir. Her bir tedavi grubu için ortalama 12 gün inkübasyon süreci takip edilmiştir. Hücrelerin 4 günde bir besiyeri tazelenerek koloni oluşum süreci mikroskop altında incelenmiştir.

4.6.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Koloni Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi

Transfekte olmuş MCF-7 hücreleri 1, 2,5 ve 5 μ M olaparib ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Tedavi sürecinin ardından oluşan koloniler PBS ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 600 μ L metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu eklenip hücrelerin 5 dakika boyunca fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyon solüsyonu aspire edilip her bir kuyucuğa 500 μ L %1 kristal viyole boyası eklenmiştir. Hücrelerin 15 dakika boyunca boyayla muamele edilmesinin ardından kuyucuklar su yardımıyla yıkanarak oluşan kolonilerin mikroskop altında incelenmesi sağlanmıştır. En az elli hücre oluşumu koloni olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan analiz neticesinde, olaparib ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin doza bağlı bir şekilde koloni yapma yeteneğini engellediği istatistiksel olarak saptanmıştır. hMOB2 defektif hücrelerde koloni yapma yetenekleri diğer gruplara göre daha fazla baskılandığı saptanmıştır. Koloni oluşturma yüzdeleri kontrol grubuna kıyasla (%100), siMOB2 %91, 5 μ M olaparib %24 ve siMOB2 5 μ M olaparib tedavisi %9 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.19).

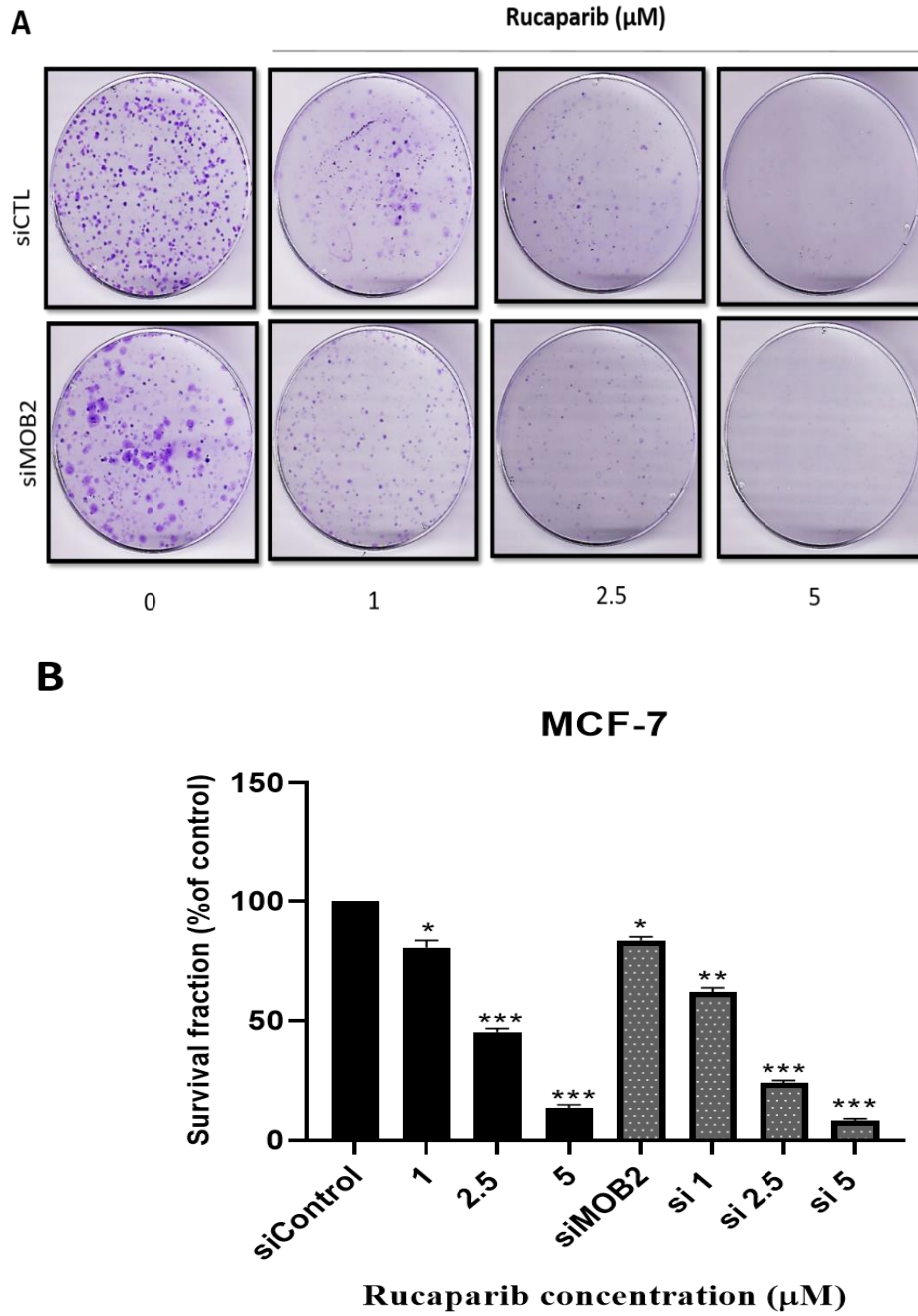


Şekil 4.19. Olaparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerin koloni sağ-kalım analizi (A) MCF-7 hücreleri 6 cm kültür kaplarına ekildikten sonra 72 saat boyunca artan dozlarda (1, 2,5, 5 $\mu\text{g/mL}$) olaparib tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonrasında her bir hücre kültürü plakasına taze besiyeri eklenerek hücreler 12 gün boyunca nemli 37°C'lik %5 CO₂ içeren hücre kültür inkübatöründe inkübe edilmiştir. Daha sonra, PBS ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fiks edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %1 kristal viyole ile 15 dakika boyunca boyanmıştır. Son olarak, plakalar musluk suyu altında ile dikkatlice yıkanarak hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edilmiştir. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdelelerini gösteren grafik. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ kontrol ile kıyaslandığında

4.6.2. siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Koloni Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi

Transfekte olmuş MCF-7 hücreleri 1, 2,5 ve 5 μ M rucaparib ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Tedavi sürecinin ardından oluşan koloniler PBS ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 600 μ L metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu eklenip hücrelerin 5 dakika boyunca fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyon solüsyonu aspire edilip her bir kuyucuğa 500 μ L %1 kristal viyole boyası eklenmiştir. Hücrelerin 15 dakika boyunca boyayla muamele edilmesinin ardından kuyucuklar su yardımıyla yıkanarak oluşan kolonilerin mikroskop altında incelenmesi sağlanmıştır. En az elli hücre oluşumu koloni olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

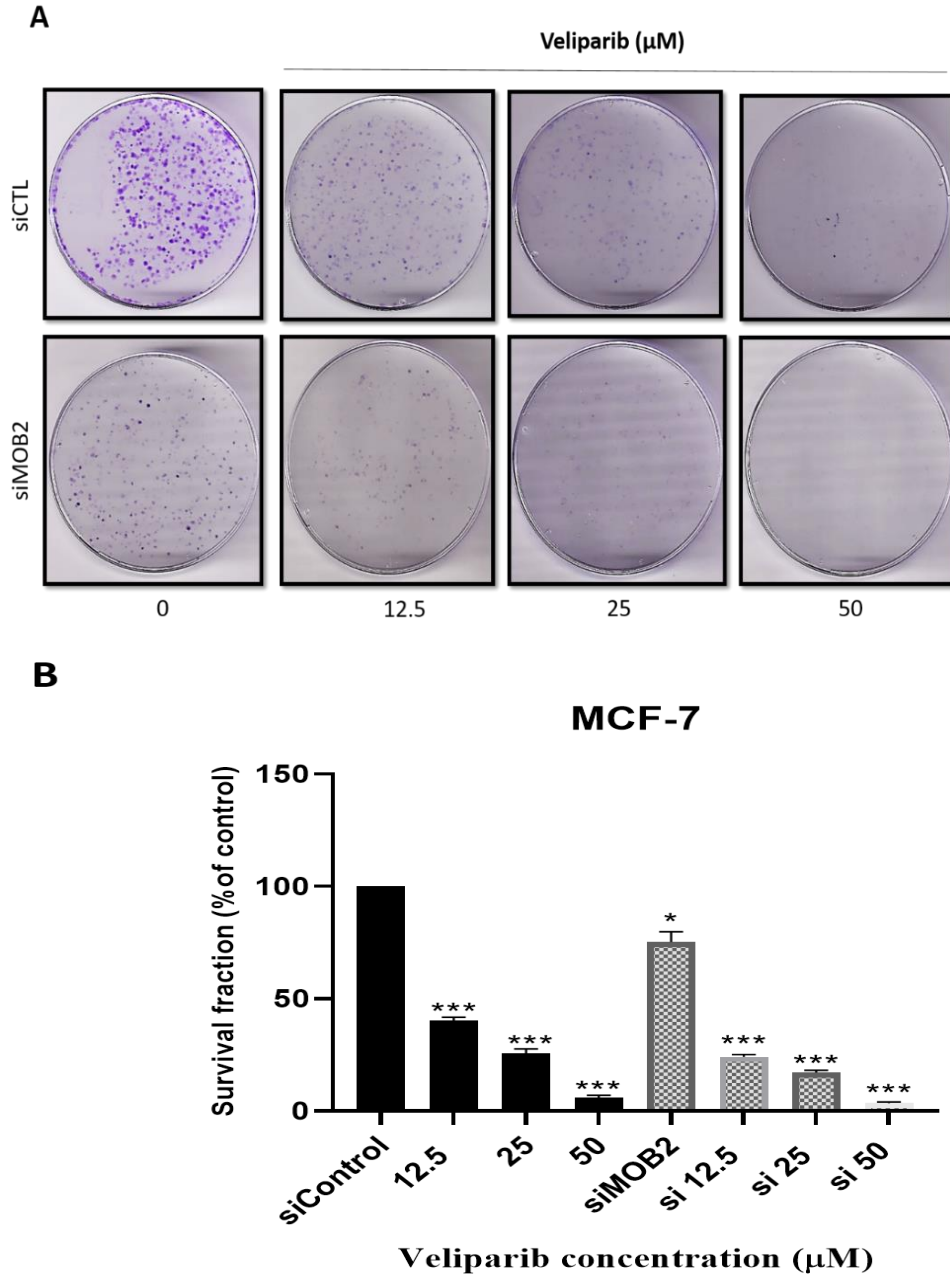
Yapılan analiz neticesinde, rucaparib ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin doza bağlı bir şekilde koloni yapma yeteneğini engellediği istatistiksel olarak saptanmıştır. hMOB2 defektif hücrelerde koloni yapma yetenekleri diğer gruplara göre daha fazla baskılandığı saptanmıştır. Koloni oluşturma yüzdeleri kontrol grubuna kıyasla (%100), siMOB2 %83, 5 μ M rucaparib %15 ve siMOB2 5 μ M rucaparib tedavisi %7,5 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Rucaparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerin koloni sağ-kalım analizi (A) MCF-7 hücreleri 6 cm kültür kaplarına ekildikten sonra 72 saat boyunca artan dozlarda (1, 2,5, 5 $\mu\text{g/mL}$) rucaparib tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonrasında her bir hücre kültürü plakasına taze besiyeri eklenerek hücreler 12 gün boyunca nemli 37°C'lik %5 CO₂ içeren hücre kültür inkübatöründe inkübe edilmiştir. Daha sonra, PBS ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %1 kristal viyole ile 15 dakika boyunca boyanmıştır. Son olarak, plakalar musluk suyu altında ile dikkatlice yıkanarak hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edilmiştir. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ kontrol ile kıyaslandığında

4.6.3. siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Koloni Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi

Transfekte olmuş MCF-7 hücreleri 12,5, 25 ve 50 μ M veliparib ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Tedavi sürecinin ardından oluşan koloniler PBS ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 600 μ L metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu eklenip hücrelerin 5 dakika boyunca fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyon solüsyonu aspire edilip her bir kuyucuğa 500 μ L %1 kristal viyole boyası eklenmiştir. Hücrelerin 15 dakika boyunca boyayla muamele edilmesinin ardından kuyucuklar su yardımıyla yıkanarak oluşan kolonilerin mikroskop altında incelenmesi sağlanmıştır. En az elli hücre oluşumu koloni olarak kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan analiz neticesinde, veliparib ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin doza bağlı bir şekilde koloni yapma yeteneğini engellediği istatistiksel olarak saptanmıştır. hMOB2 defektif hücrelerde koloni yapma yetenekleri diğer gruplara göre daha fazla baskılandığı saptanmıştır. Koloni oluşturma yüzdeleri kontrol grubuna kıyasla (%100), siMOB2 %76, 50 μ M veliparib %6 ve siMOB2 50 μ M veliparib tedavisi %3 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Veliparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerin koloni sağ-kalım analizi (A) MCF-7 hücreleri 6 cm kültür kaplarına ekildikten sonra 72 saat boyunca artan dozlarda (12,5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$) veliparib tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonrasında her bir hücre kültürü plakasına taze besiyeri eklenerek hücreler 12 gün boyunca nemli 37°C'lik %5 CO₂ içeren hücre kültürü inkübatöründe inkübe edilmiştir. Daha sonra, PBS ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %1 kristal viyole ile 15 dakika boyunca boyanmıştır. Son olarak, plakalar musluk suyu altında ile dikkatlice yıkanarak hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edilmiştir. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ kontrol ile kıyaslandığında

4.7. MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinin Apoptotik/Otofajik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

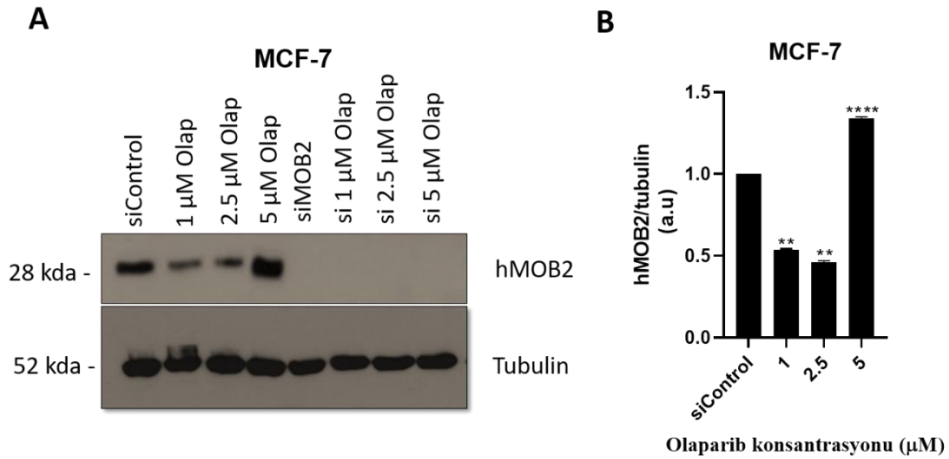
RNA interferans yöntemi kullanılarak siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş olup hMOB2 ifadesi baskılanmıştır. MCF-7/siCTL ve siMOB2 hücreleri artan dozlarda olaparib, rucaparib ve veliparib ile 72 saat tedavi edilmiştir. Tedavinin ardından hücreler tripsinize edilerek total protein izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Söz konusu protein örneklerinin konsantrasyonları Bradford analizi ile saptanmıştır. Konsantrasyonları belirlenen eşit miktarda protein örnekleri Western blot yöntemiyle ilgili primer ve sekonder antikorlarla muamele edilip enzimatik HRP aktivitesi x-ray filmine aktarılacak hMOB2, p53, p21, Bax, Bcl-2, Cas-3, Cas-9, cPARP ve Beclin-1 protein ekspresyon profilleri analiz edilmiştir.

Yapılan bu çalışmada, hMOB2 proteini RNA interferans yöntemiyle geçici olarak baskılanmış ve Parp inhibitörlerinden olaparib, rucaparib ve veliparib ile tedavi edilerek MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki çeşitli proteinlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Meme kanseri hücrelerinin ilgili kombine tedavi ile olası apoptotik/otofajik etkileri üzerinde incelemeler gerçekleştirilmiştir.

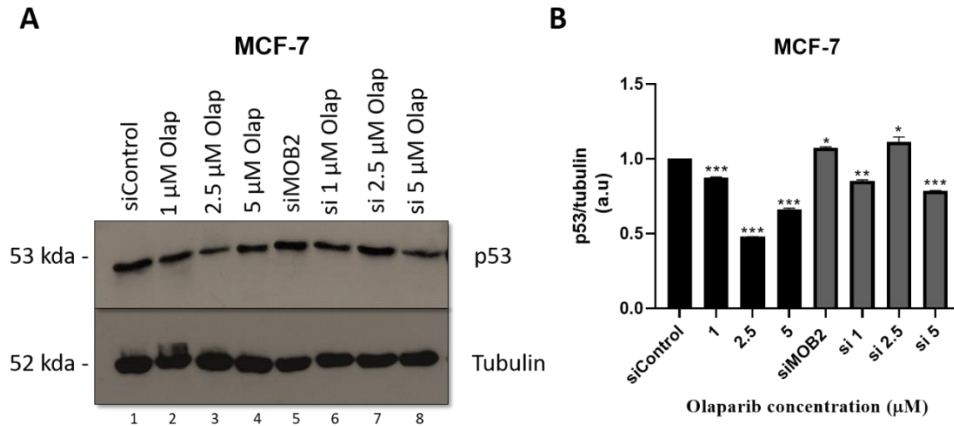
4.7.1. MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin Apoptotik/Otofajik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

MCF-7 hücrelerinde hMOB2 proteininin baskılanması ve olaparib tedavisinin apoptotik-otofajik proteinlerin ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. hMOB2 proteininin, artan dozlarda olaparib tedavisi sonucu ekspresyon profili istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Aynı zamanda transfekte edilen MCF-7 hücrelerindeki hMOB2 proteininin başarılı bir şekilde baskılandığıda görülmektedir (Şekil 4.22). p53 proteinine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla artan dozlarda mono olaparib tedavisi sonrasında ekspresyon düzeylerinde azalma görülürken hMOB2 baskılanan ve olaparib ile tedavi edilen gruplarda (özellikle 2,5 μ M) kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Şekil 4.23). Hücre döngüsünde görev aldığı bilinen p21 ve apoptotik markerlardan Bax protein ekspresyonları doza bağlı tüm gruplarda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermektedir (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25). Anti-

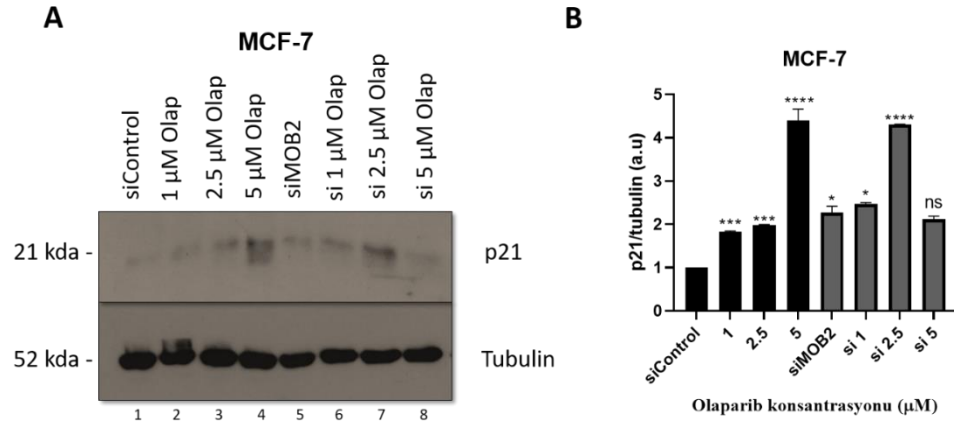
apoptotik özellikleriyle tanınan Bcl-2 proteinine bakıldığında, mono tedavi 2,5, 5 μ M olaparib gruplarında kontrole kıyasla artış gözlenirken hMOB2'nin baskılanmasıyla birlikte doza bağlı bir şekilde protein ekspresyon artışı devam etmektedir (Şekil 4.26). Bir başka apoptotik markerlardan Cas-3 ekspresyon düzeyine bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla 1 ve 5 μ M olaparib tedavilerinde anlamlı bir artış gözlenmiş olup siMOB2 grubunda bu artış devam ederken hMOB2 baskılanmış artan dozlarda olaparib tedavisine maruz bırakılan gruplarda ise bu artışın kontrol seviyelerinde kaldığı saptanmıştır (Şekil 4.27). Cas-9 profilleri incelendiğinde ise kontrole kıyasla 1, 2,5 ve 5 μ M olaparib tedavilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusuken hMOB2'nin baskılandığı gruplarda ise doza bağlı anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.28). DNA hasar yanıt mekanizmasında rol oynadığı bilinen cPARP protein ekspresyon seviyeleri ise olaparib mono tüm gruplarda artış gözlenmiş olup mono siMOB2 grubunda anlamlı bir azalma saptanmıştır. Buna bağlı olarak hMOB2'nin baskılanmasıyla birlikte artan dozlarda olaparib tedavisi sonucu gruplarda artış gözlenmiştir (Şekil 4.29). Son olarak otofajik markerlardan Beclin-1 proteinine bakıldığında, kontrole kıyasla 2,5 ve 5 μ M olaparib tedavi gruplarında anlamlı bir azalma meydana gelirken hMOB2'nin baskılanmasıyla birlikte doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Şekil 4.30).



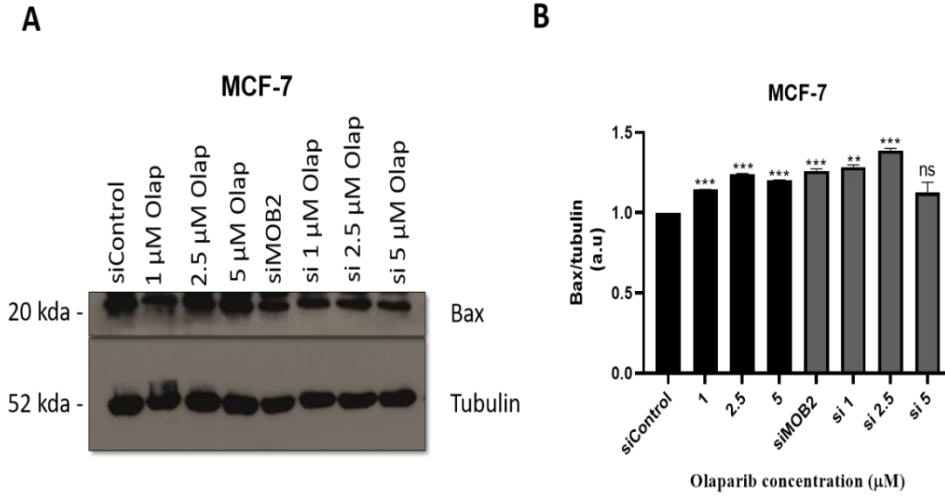
Şekil 4.22. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin hMOB2 protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan hMOB2 antikoru gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



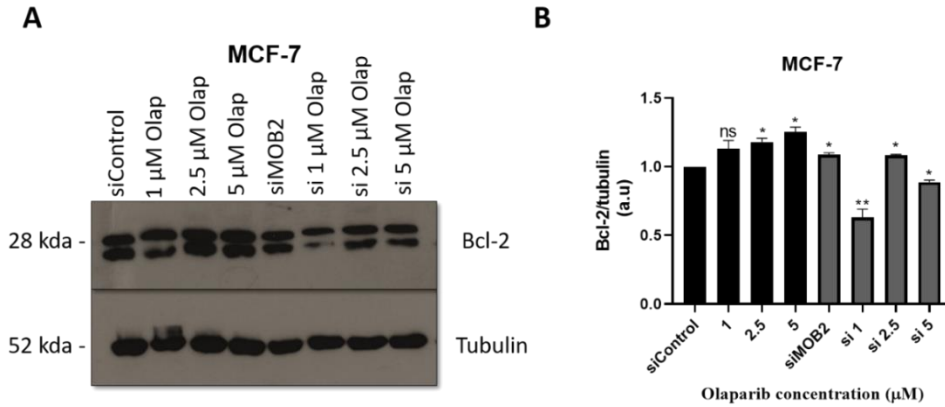
Şekil 4.23. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin p53 protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan p53 antikoruna gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında



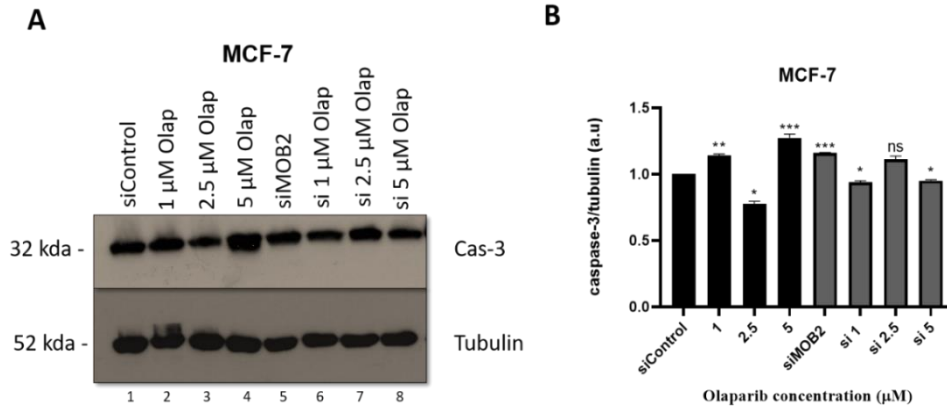
Şekil 4.24. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/100 oranında hazırlanan p21 antikoruna gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında



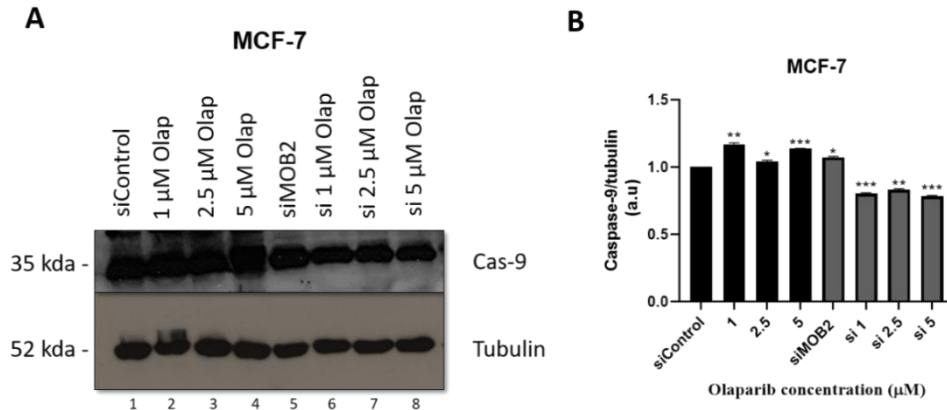
Şekil 4.25. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan Bax antikoru gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



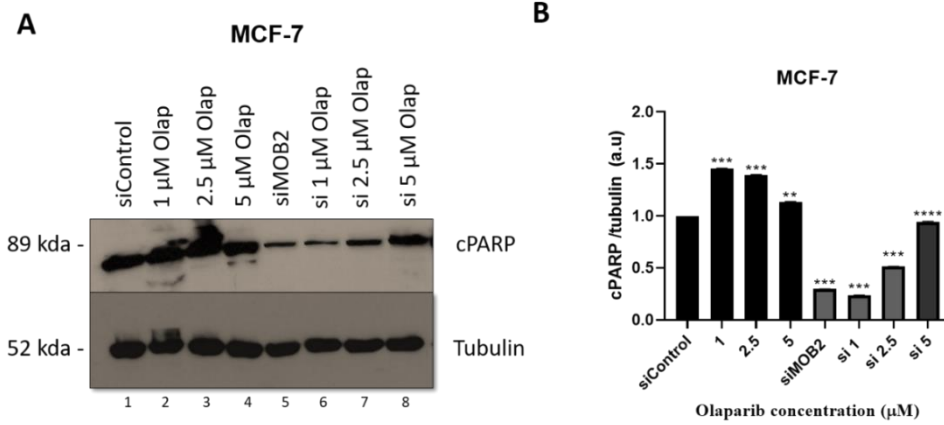
Şekil 4.26. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/1000 oranında hazırlanan Bcl-2 antikoru gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



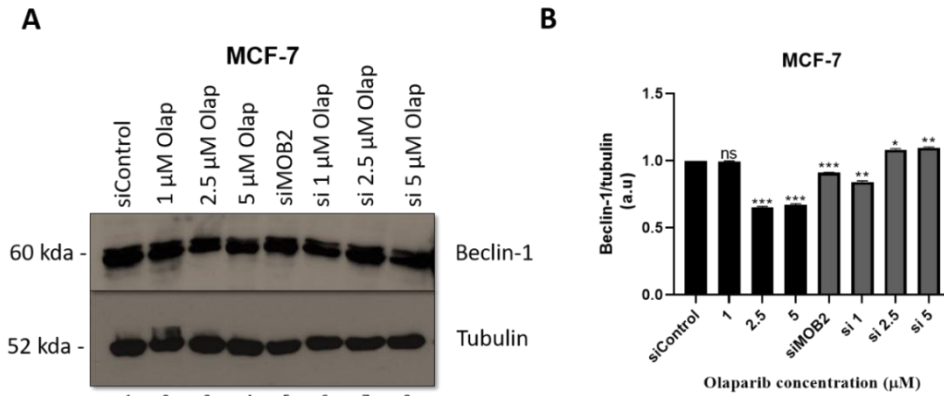
Şekil 4.27. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan Cas-3 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



Şekil 4.28. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/250 oranında hazırlanan Cas-9 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



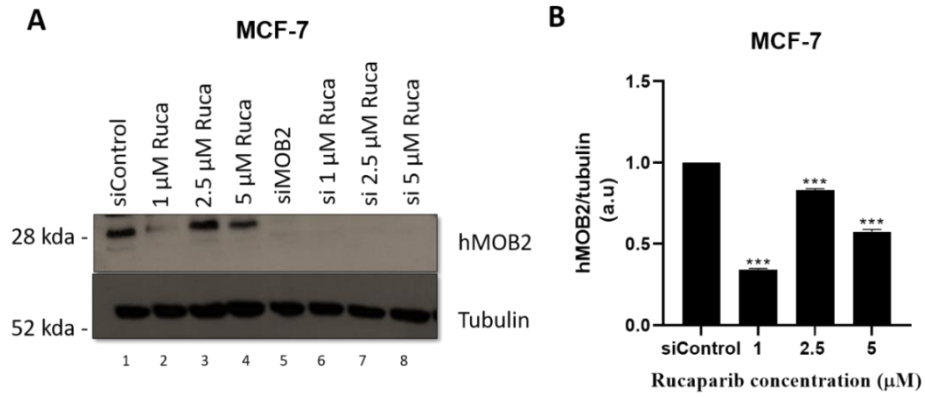
Şekil 4.29. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan c-PARP antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında



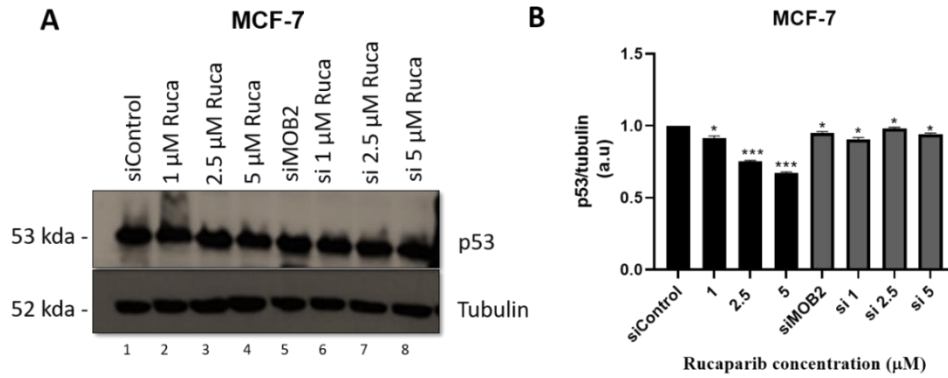
Şekil 4.30. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan Beclin-1 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında

4.7.2. MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin Apoptotik/Otofajik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

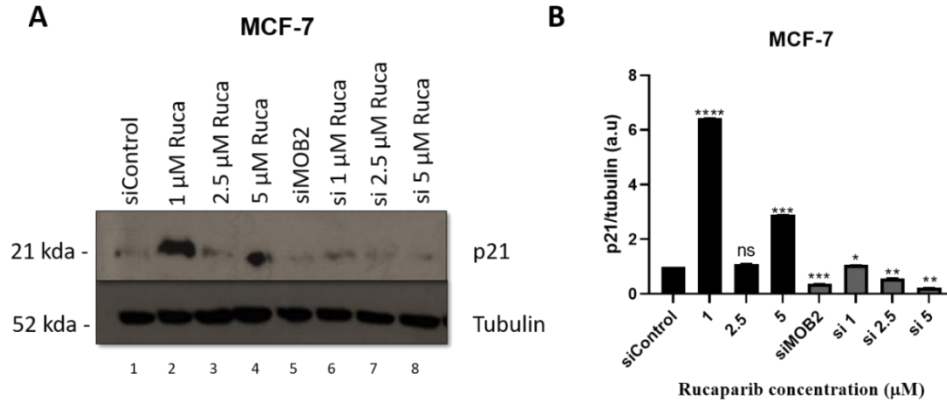
MCF-7 hücrelerinde hMOB2 proteininin susturulması ve rucaparib tedavisinin apoptotik-otofajik proteinlerin ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. hMOB2 proteininin, artan dozlarda olaparib tedavisi sonucu ekspresyon profili istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalış göstermiştir. Aynı zamanda transfekte edilen MCF-7 hücrelerindeki hMOB2 proteininin başarılı bir şekilde baskılandığıda görülmektedir (Şekil 4.31). p53 proteinine bakıldığında kontrol grubuna kıyasla artan dozlarda mono rucaparib tedavisi sonrasında ekspresyon düzeylerinde azalma görülürken hMOB2 baskılanan ve rucaparib ile tedavi edilen gruplarda (özellikle 5 μ M) kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Şekil 4.32). p21 protein ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, kontrole kıyasla 1 ve 5 μ M rucaparib tedavilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken hMOB2 baskılanan gruplarda ise doza bağlı bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.33). Apoptotik markerlardan Bax protein ekspresyonları doza bağlı tüm gruplarda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermektedir (Şekil 4.34). Anti-apoptotik özellikleriyle tanınan Bcl-2 proteinine bakıldığında, tüm tedavi gruplarında kontrole kıyasla doza bağlı bir şekilde azalış saptanmıştır (Şekil 4.35). Bir başka apoptotik markerlardan Cas-3 ve Cas-9 ekspresyon düzeyine bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla tüm rucaparib tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 4.36 ve Şekil 4.37). DNA hasar yanıt mekanizmasında rol oynadığı bilinen cPARP protein ekspresyon seviyeleri ise 1 μ M rucaparib tedavisinde kontrole kıyasla artış gözlenirken diğer gruplarda azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.38). Son olarak otofajik markerlardan Beclin-1 proteinine bakıldığında, kontrole kıyasla 1, 2,5 ve 5 μ M rucaparib tedavi gruplarında anlamlı bir azalma meydana gelirken hMOB2'nin baskılanmasıyla birlikte bu azalma miktarı kontrole yakın seviyelerde kalmıştır (Şekil 4.39).



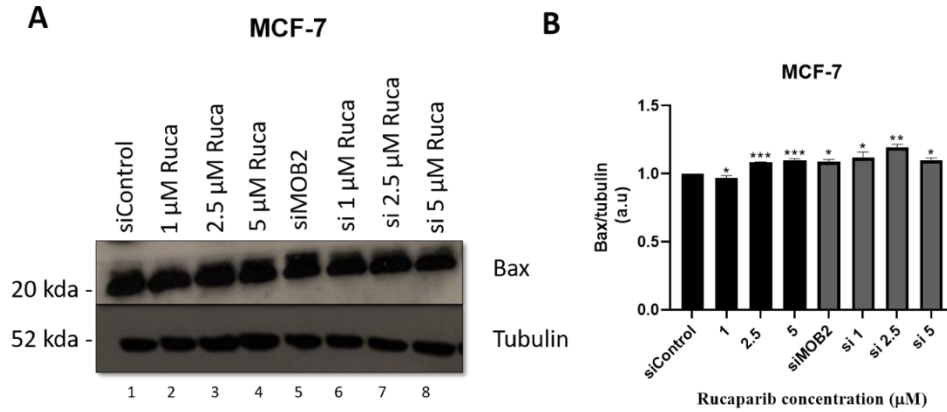
Şekil 4.31. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve rucaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan hMOB2 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



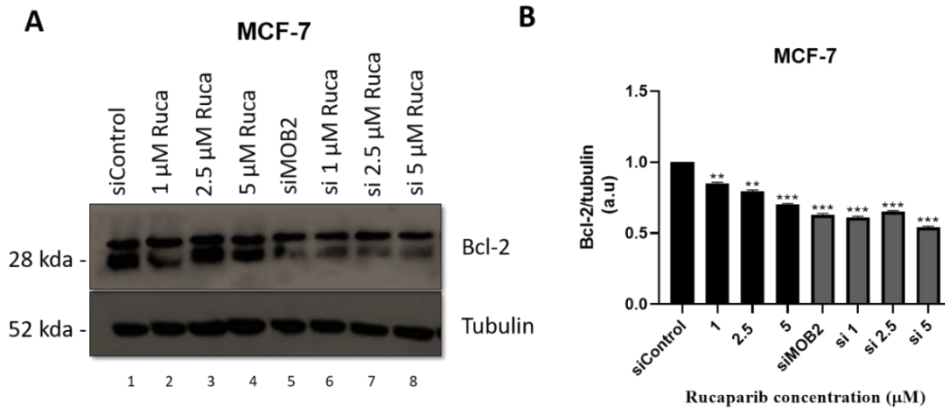
Şekil 4.32. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve rucaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan p53 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



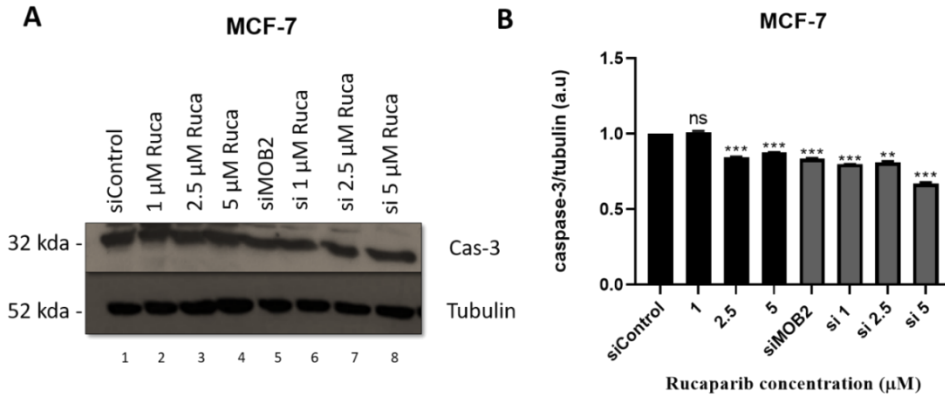
Şekil 4.33. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve rucaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/100 oranında hazırlanan p21 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında



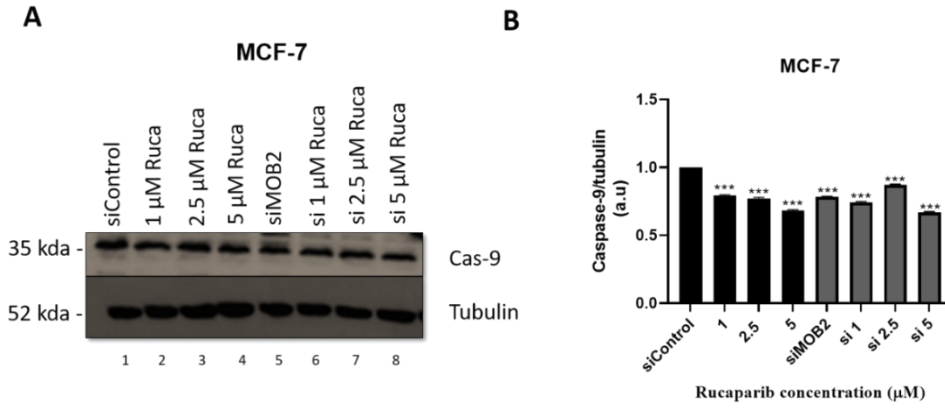
Şekil 4.34. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve rucaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan Bax antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında



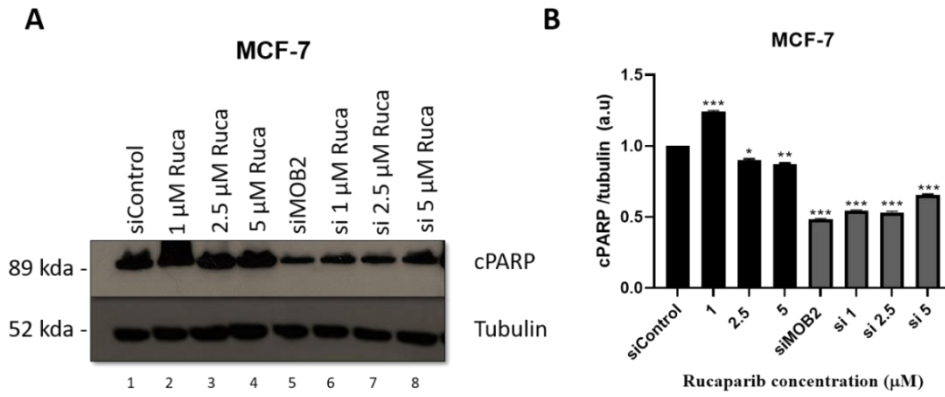
Şekil 4.35. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve rucaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/1000 oranında hazırlanan Bcl-2 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



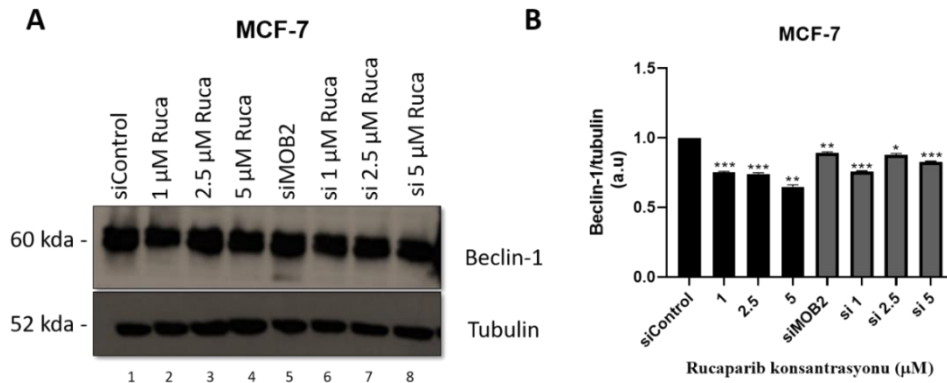
Şekil 4.36. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan Cas-3 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



Şekil 4.37. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve rucaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/250 oranında hazırlanan Cas-9 antikoruna gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



Şekil 4.38. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve rucaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan c-PARP antikoruna gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

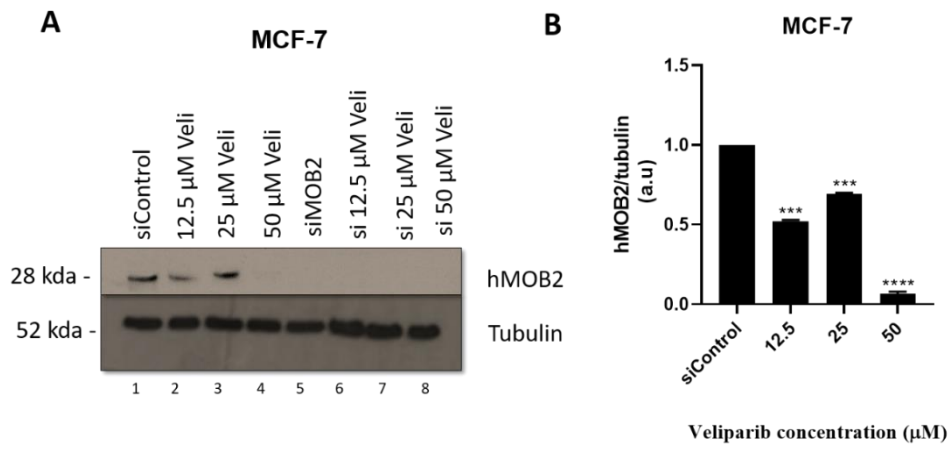


Şekil 4.39. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve rucaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan Beclin-1 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

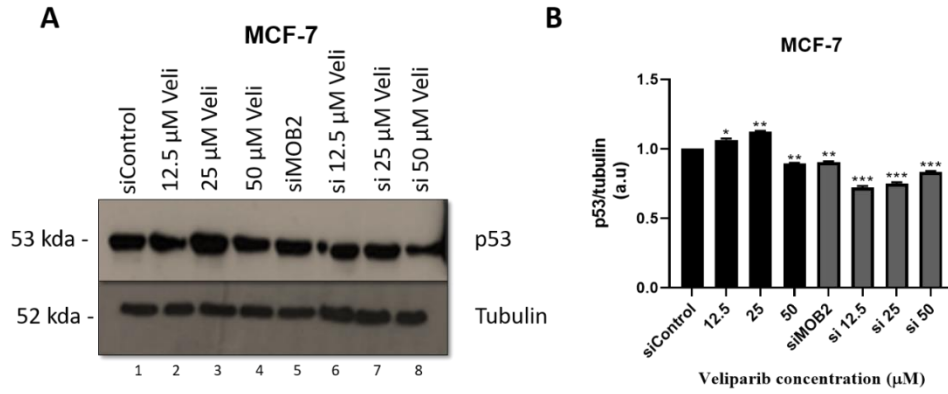
4.7.3. MCF-7 Hücrelerinde siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin Apoptotik/Otofajik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

Meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücrelerinde hMOB2 proteininin susturulması ve rucaparib tedavisinin apoptotik-otofajik proteinlerin ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. hMOB2 proteininin, artan dozlarda veliparib (12,5, 25 ve 50 μ M) tedavisi sonucu ekspresyon profili istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalış göstermiştir. Aynı zamanda transfekte edilen MCF-7 hücrelerindeki hMOB2 proteininin başarılı bir şekilde baskılandığıda görülmektedir (Şekil 4.40). p53 protein seviyesine bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla 12,5 ve 25 μ M veliparib tedavi gruplarında artış gözlenirken diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.41). p21 protein ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, kontrole kıyasla tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.42). Apoptotik markerlardan Bax protein ekspresyonları doza bağlı tüm gruplarda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalış göstermektedir (Şekil 4.43). Anti-apoptotik özellikleriyle tanınan Bcl-2 proteinine bakıldığında, tüm tedavi gruplarında (12,5 μ M hariç) kontrole kıyasla doza bağlı bir şekilde azalış saptanmıştır (Şekil 4.44). Bir başka apoptotik markerlardan Cas-3 ekspresyon düzeyine bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla 12,5 μ M veliparib ve siMOB2 tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken diğer gruplarda azalma

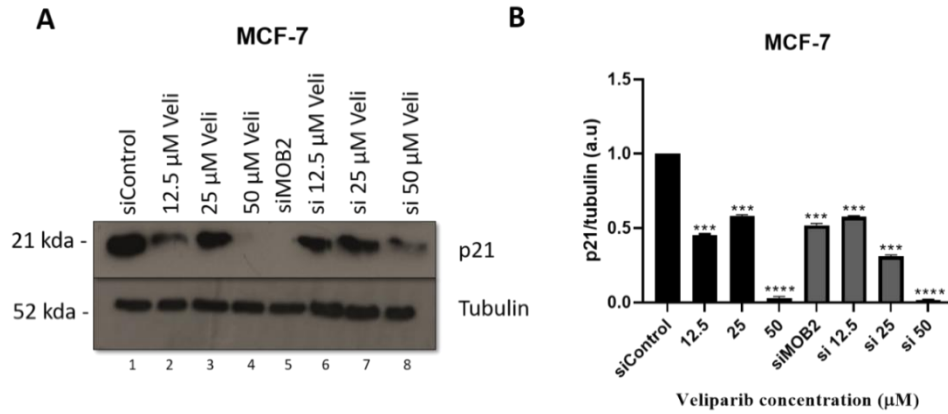
meydana gelmektedir (Şekil 4.45). Cas-9 proteinin profili incelendiğinde ise 12,5, 50 μ M veliparib ve siMOB2 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanırken diğer gruplarda azalma görülmektedir (Şekil 4.46). DNA hasar yanıt mekanizmasında rol oynadığı bilinen cPARP protein ekspresyon seviyeleri kontrole kıyasla mono veliparib gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ile sonuçlanırken hMOB2 baskılanmış gruplarda azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.47). Son olarak otofajik markerlardan Beclin-1 proteinine bakıldığında, kontrole kıyasla tüm veliparib (12,5 μ M hariç) tedavi gruplarında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.48).



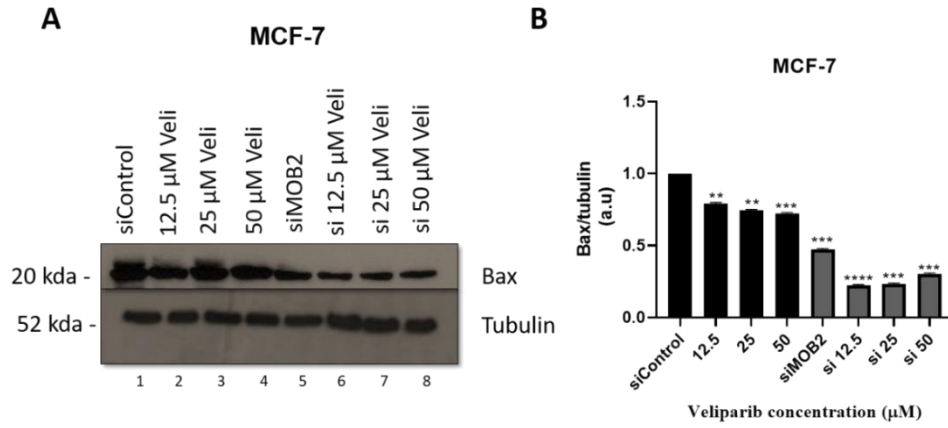
Şekil 4.40. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve veliparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan hMOB2 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında



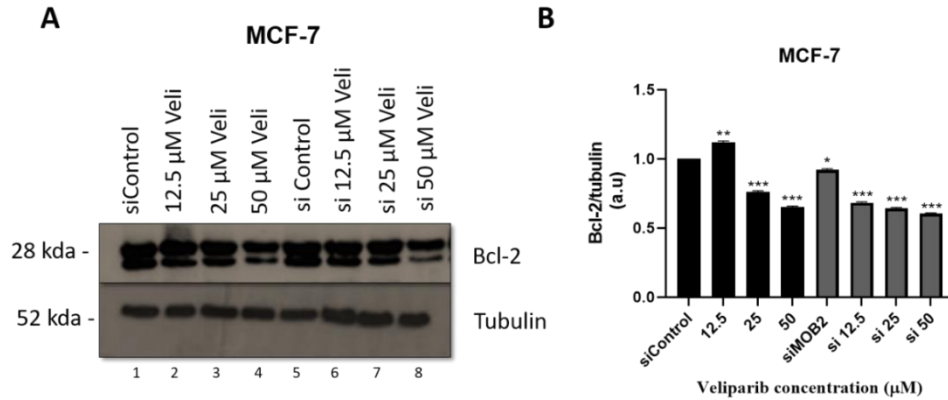
Şekil 4.41. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve veliparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan p53 antikoruna gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında



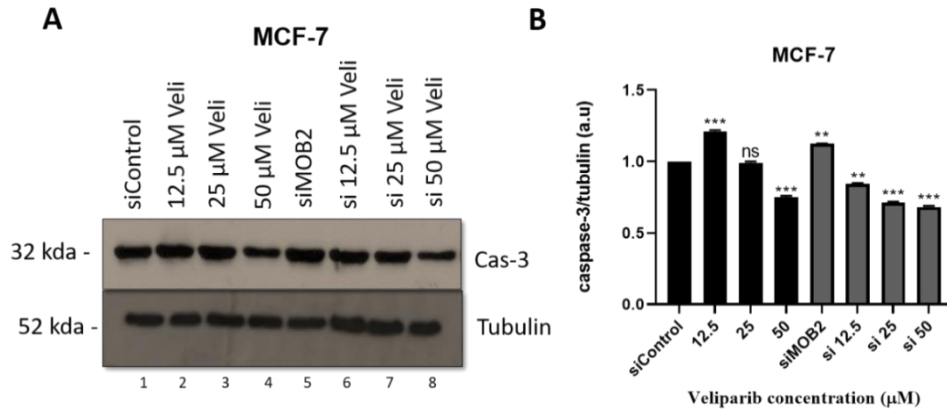
Şekil 4.42. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve veliparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/100 oranında hazırlanan p21 antikoruna gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında



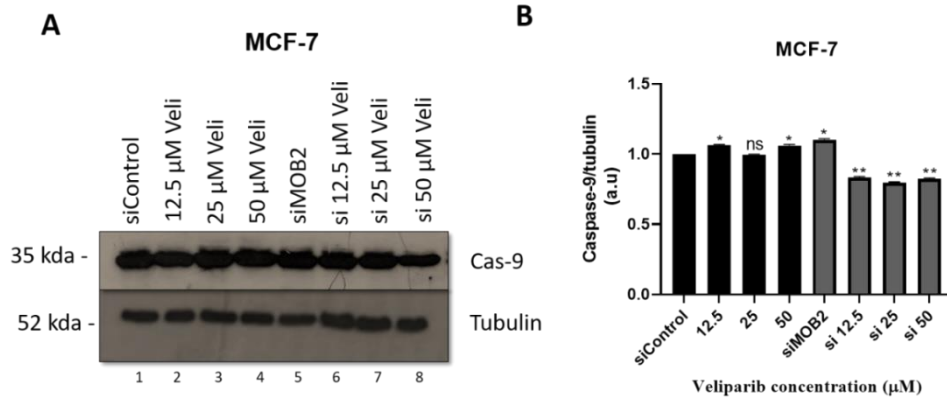
Şekil 4.43. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve veliparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan Bax antikoru gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



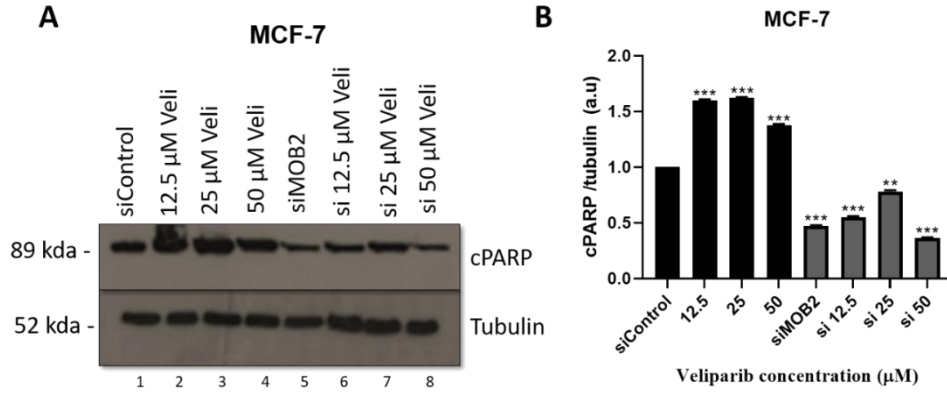
Şekil 4.44. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve veliparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/1000 oranında hazırlanan Bcl-2 antikoru gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



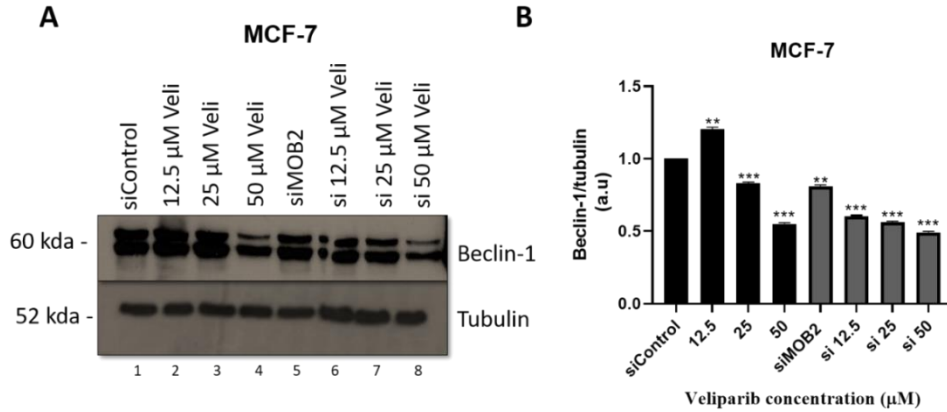
Şekil 4.45. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve veliparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan Cas-3 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



Şekil 4.46. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve olaparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/250 oranında hazırlanan Cas-9 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



Şekil 4.47. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve veliparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan c-PARP antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 rabbit sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

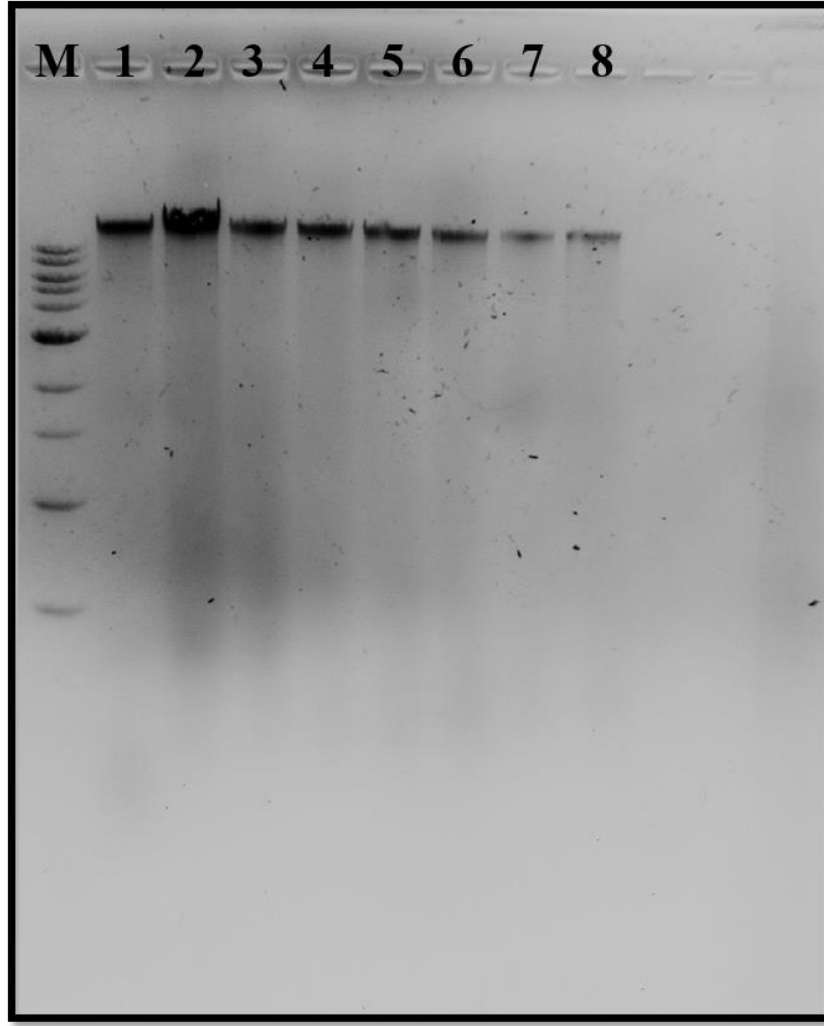


Şekil 4.48. MCF-7 hücrelerinde siMOB2 ve veliparib kombinasyon tedavisinin apoptotik/otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri (A) Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra protein lizatları toplanarak Bradford yöntemiyle konsantrasyonları belirlendi. %12 SDS poliakrilamid jelde yürütülen örnekler western blot tekniğiyle PET ALF membrana transfer edildi. Membran %5 süt tozu içerisinde 1 saat inkübe edilerek 1/500 oranında hazırlanan Beclin-1 antikoru gece boyu +4 °C’de inkübe edildi. TBS-T yıkamalarının ardından 2 saat 1/3000 mouse sekonder muamelesi yapıldı. (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

4.8. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinin MCF-7 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunun Saptanması

4.8.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunun Saptanması

DNA fragmentasyon deneyi öncelikle transfekte edilen MCF-7 hücreleri 1, 2,5 ve 5 μ M olaparib ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Tedavi sonrasında ticari kit (Hibrigen) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yatay elektroforez tankı kullanılarak koşturulan örneklerin fragmentasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Örnek grupları sırasıyla; M: Marker 1: siCtl 2: 1 μ M olap 3: 2,5 μ M olap 4: 5 μ M olap 5: siMOB2 6: si 1 μ M olap 7: si 2,5 μ M olap 8: si 5 μ M olap şeklindedir. Yapılan deney neticesinde, kontrol grubuna kıyasla mono olaparib tedavi gruplarında diğer gruplara göre daha yoğun fragmentasyon saptanmıştır (Şekil 4.49).

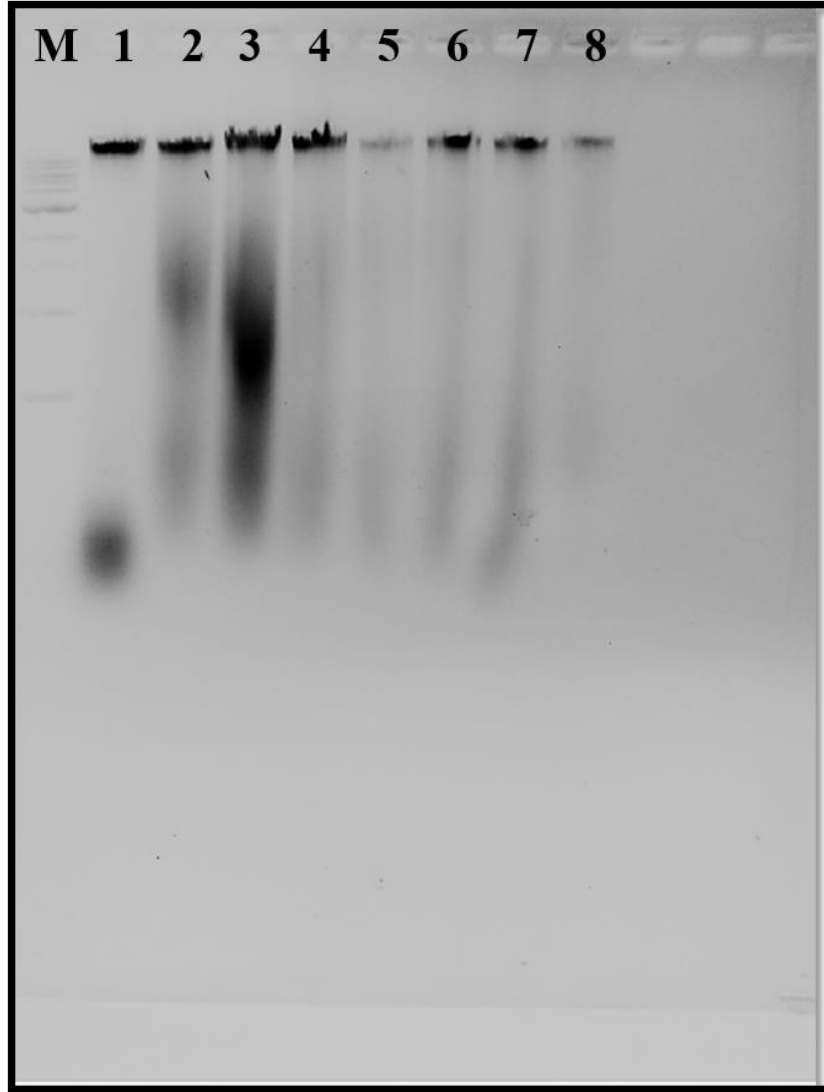


Şekil 4.49. MCF-7 olaparib tedavisi DNA fragmentasyon analizi. Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra hücrelerin DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total DNA'nın izolasyonu için ticari Genomik DNA izolasyon kiti (Hibrigen) kullanılıp kitteki protokol baz alınarak gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodrop cihazı (Biodrop) ile tespit edilmiştir. Konsantrasyonu belirlenen DNA örnekleri için laboratuvarımızda bulunan yatay agaroz jel elektroforez tank sistemi (Bio-Rad, Sub-Cell GT) kullanıldı. Elde edilen DNA'nın büyüklüğüne göre %0,5- 2 oranlarında agaroz jel hazırlandı. Örnek grupları M: Marker 1: siCtl 2: 1 μ M olap 3: 2,5 μ M olap 4: 5 μ M olap 5: siMOB2 6: si 1 μ M olap 7: si 2,5 μ M olap 8: si 5 μ M olap şeklindedir

4.8.2. siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunun Saptanması

DNA fragmentasyon deneyi öncelikle transfekte edilen MCF-7 hücreleri 1, 2,5 ve 5 μ M rucaparib ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Tedavi sonrasında ticari kit (Hibrigen) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yatay elektroforez tankı kullanılarak koşturulan örneklerin fragmentasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Örnek grupları sırasıyla; M: Marker 1: siCtl 2: 1 μ M ruca 3: 2,5 μ M ruca 4: 5 μ M ruca 5: siMOB2 6: si 1

μM ruca 7: si 2,5 μM ruca 8: si 5 μM ruca şeklindedir. Yapılan deney neticesinde, kontrol grubuna kıyasla 1 ve 2,5 μM rucaparib tedavi gruplarında diğer gruplara nazaran daha yoğun fragmentasyon saptanmıştır (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. MCF-7 rucaparib tedavisi DNA fragmentasyon analizi. Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra hücrelerin DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total DNA'nın izolasyonu için ticari Genomik DNA izolasyon kiti (Hibrogen) kullanılıp kitteki protokol baz alınarak gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodrop cihazı (Biodrop) ile tespit edilmiştir. Konsantrasyonu belirlenen DNA örnekleri için laboratuvarımızda bulunan yatay agaroz jel elektroforez tank sistemi (Bio-Rad, Sub-Cell GT) kullanıldı. Elde edilen DNA'nın büyüklüğüne göre %0,5- 2 oranlarında agaroz jel hazırlandı. Örnek grupları M: Marker 1: siCtl 2: 1 μM ruca 3: 2,5 μM ruca 4: 5 μM ruca 5: siMOB2 6: si 1 μM ruca 7: si 2,5 μM ruca 8: si 5 μM ruca şeklindedir

4.8.3. siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunun Saptanması

DNA fragmentasyon deneyi için öncelikle transfekte edilen MCF-7 hücreleri 12,5, 25 ve 50 μ M veliparib ile 72 saat boyunca tedavi edilmiştir. Tedavi sonrasında ticari kit (Hibrigen) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yatay elektroforez tankı kullanılarak koşturulan örneklerin fragmentasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Örnek grupları sırasıyla; M: Marker 1: siCtl 2: 12,5 μ M veli 3: 25 μ M veli 4: 50 μ M veli 5: siMOB2 6: si 12,5 μ M veli 7: si 25 μ M veli 8: si 50 μ M veli şeklindedir. Yapılan deney sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla 12,5, 25 μ M veliparib ve siMOB2 tedavi gruplarında diğer gruplara nazaran daha yoğun fragmentasyon saptanmıştır (Şekil 4.51).

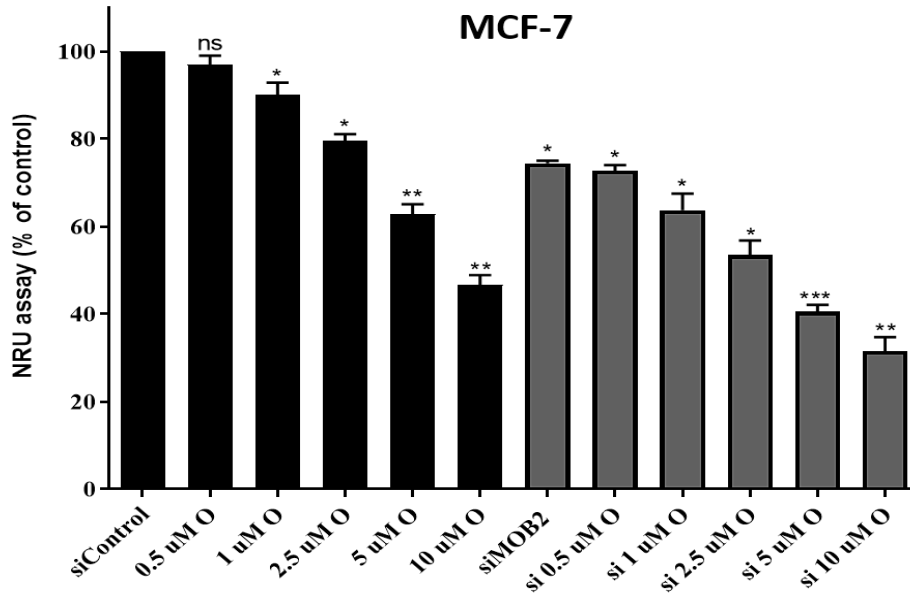


Şekil 4.51. MCF-7 veliparib tedavisi DNA fragmentasyon analizi. Aseptik şartlar dikkate alınarak kültüre edilen MCF-7 hücre hattı 6 cm kültür plakalarına ekildi. Toplam 72 saat sonra hücrelerin DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total DNA'nın izolasyonu için ticari Genomik DNA izolasyon kiti (Hibrigen) kullanılıp kitteki protokol baz alınarak gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodrop cihazı (Biodrop) ile tespit edilmiştir. Konsantrasyonu belirlenen DNA örnekleri için laboratuvarımızda bulunan yatay agaroz jel elektroforez tank sistemi (Bio-Rad, Sub-Cell GT) kullanıldı. Elde edilen DNA'nın büyüklüğüne göre %0,5- 2 oranlarında agaroz jel hazırlandı. Örnek grupları M: Marker 1: siCtl 2: 12,5 μ M veli 3: 25 μ M veli 4: 50 μ M veli 5: siMOB2 6: si 12,5 μ M veli 7: si 25 μ M veli 8: si 50 μ M veli şeklindedir

4.9. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinde Nötral Kırmızısı Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

4.9.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavilerinde Nötral Kırmızısı Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

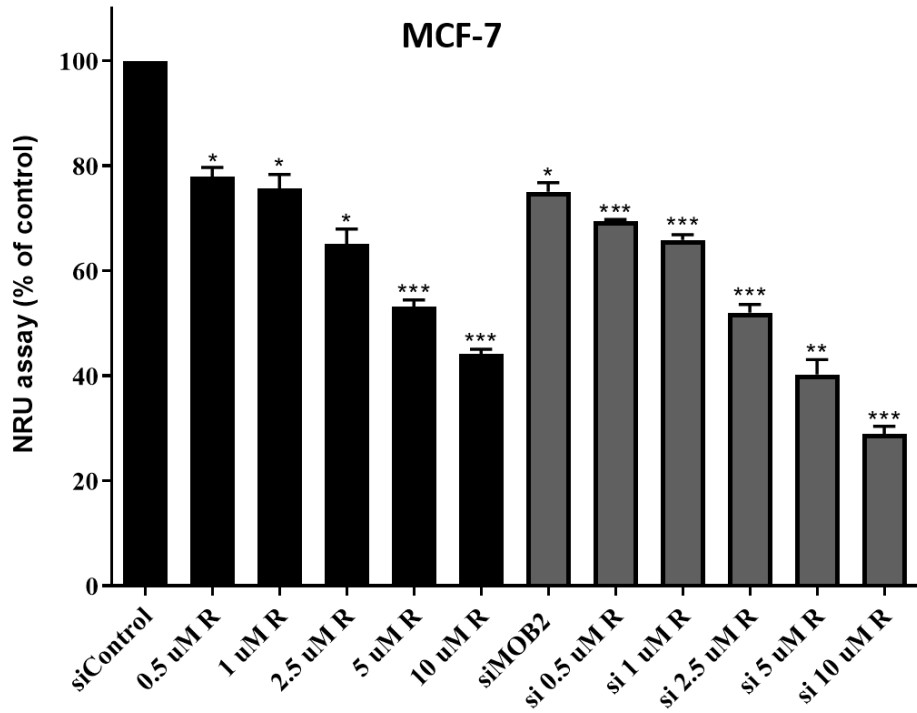
RNA interferans yöntemiyle hMOB2 geçici transfeksiyonunun gerçekleştirildiği MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksitenin belirlenmesine yönelik nötral kırmızısı yöntemi uygulanmıştır. Nötral kırmızısı besiyeri ve destain solüsyonu kullanılarak yapılan yöntemde spektrofotometrik analizler gerçekleştirilmiştir. hMOB2 baskılandığı gruplarda dahil olmak üzere olaparib tedavi grupları sırasıyla 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 μ M şeklindedir. Yapılan analizler neticesinde, kontrol grubuna kıyasla doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir. Nötral kırmızısı yöntemi MCF-7 hücrelerinde olaparib tedavisi IC₅₀ değeri 7,24 μ g/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. Olaparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerin nötral kırmızısı analizi. RNA interferans yöntemiyle hMOB2 geçici transfeksiyonu gerçekleştirilip MCF-7 hücreleri kullanılarak 96 kuyucuklu plakalara transfeksiyon grupları ve kontrol gruplarının ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Yukardaki belirtilen dozlar ve 72 saat tedavi süresi geçtikten sonra Nötral kırmızısı yöntemi deney protokolü izlenmiştir. Bir gece önce hazırlanıp inkübatörde muhafaza edilen nötral kırmızısı besiyeri 1800 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hücrelerin eski mediumu çekilip her kuyucuğa 100 uL nötral kırmızısı mediumu eklenerek 37 °C’de 2 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. Ardından medium aspire edilip her kuyucuk 150 uL PBS ile yıkanmaktadır. Daha sonra her kuyucuğa 150 uL Nötral red destain solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Elisa reader cihazı ile 540 nm’de ölçüm alınarak analizleri gerçekleştirilmiştir

4.9.2. siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavilerinde Nötral Kırmızısı Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

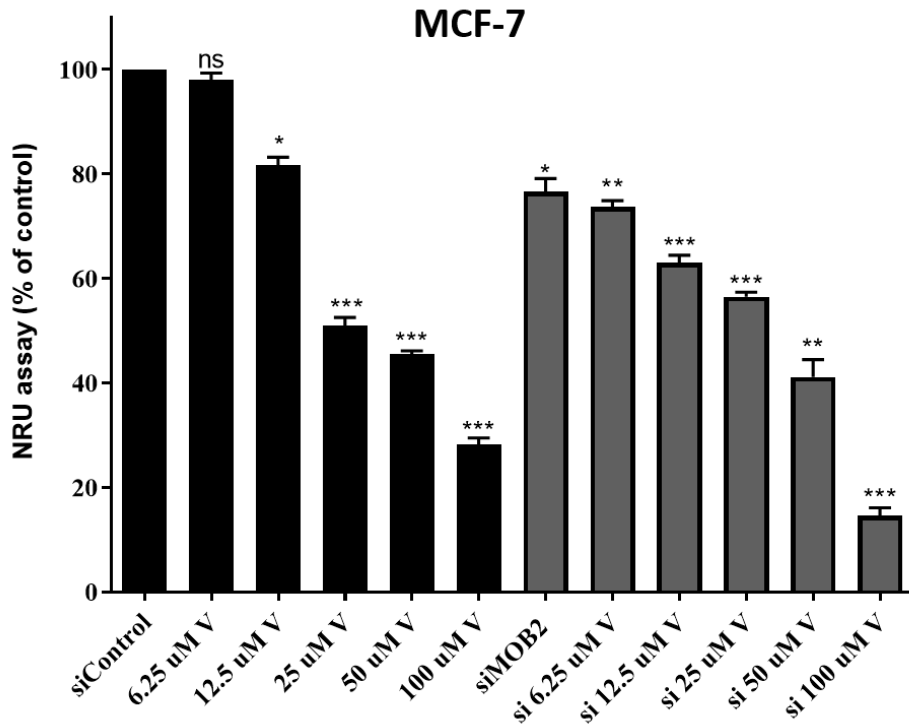
RNA interferans yöntemiyle hMOB2 geçici transfeksiyonunun gerçekleştirildiği MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksitenin belirlenmesine yönelik nötral kırmızısı yöntemi uygulanmıştır. Nötral kırmızısı besiyeri ve destain solüsyonu kullanılarak yapılan yöntemde spektrofotometrik analizler gerçekleştirilmiştir. hMOB2 baskılandığı gruplarda dahil olmak üzere rucaparib tedavi grupları sırasıyla 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 μ M şeklindedir. Yapılan analizler neticesinde, kontrol grubuna kıyasla doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir Nötral kırmızısı yöntemi MCF-7 hücrelerinde rucaparib tedavisi IC50 değeri 7,58 μ g/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.53).



Şekil 4.53. Rucaparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerin nötral kırmızısı analizi. RNA interferans yöntemiyle hMOB2 geçici transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından 96 kuyucuklu plakalara transfeksiyon grupları ve kontrol gruplarının ekim işlemi yapılmıştır. Yukardaki belirtilen dozlar ve 72 saat tedavi süresi geçtikten sonra Nötral kırmızısı yöntemi deney protokolü izlenmiştir. Bir gece önce hazırlanıp inkübatörde muhafaza edilen nötral kırmızısı besiyeri 1800 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hücrelerin eski mediumu çekilip her kuyucuğa 100 uL nötral kırmızısı mediumu eklenerek 37 °C’de 2 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. Ardından medium aspire edilip her kuyucuk 150 uL PBS ile yıkanmaktadır. Daha sonra her kuyucuğa 150 uL Nötral red destain solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Elisa reader cihazı ile 540 nm’de ölçüm alınarak analizleri gerçekleştirilmiştir

4.9.3. siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavilerinde Nötral Kırmızısı Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

RNA interferans yöntemiyle hMOB2 geçici transfeksiyonunun gerçekleştirildiği MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksitenin belirlenmesine yönelik nötral kırmızısı yöntemi uygulanmıştır. Nötral kırmızısı besiyeri ve destain solüsyonu kullanılarak yapılan yöntemde spektrofotometrik analizler gerçekleştirilmiştir. hMOB2 baskılandığı gruplarda dahil olmak üzere rucaparib tedavi grupları sırasıyla 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 μ M şeklindedir. Yapılan analizler neticesinde, kontrol grubuna kıyasla doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir. Nötral kırmızısı yöntemi MCF-7 hücrelerinde veliparib tedavisi IC50 değeri 28,19 μ g/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.54).

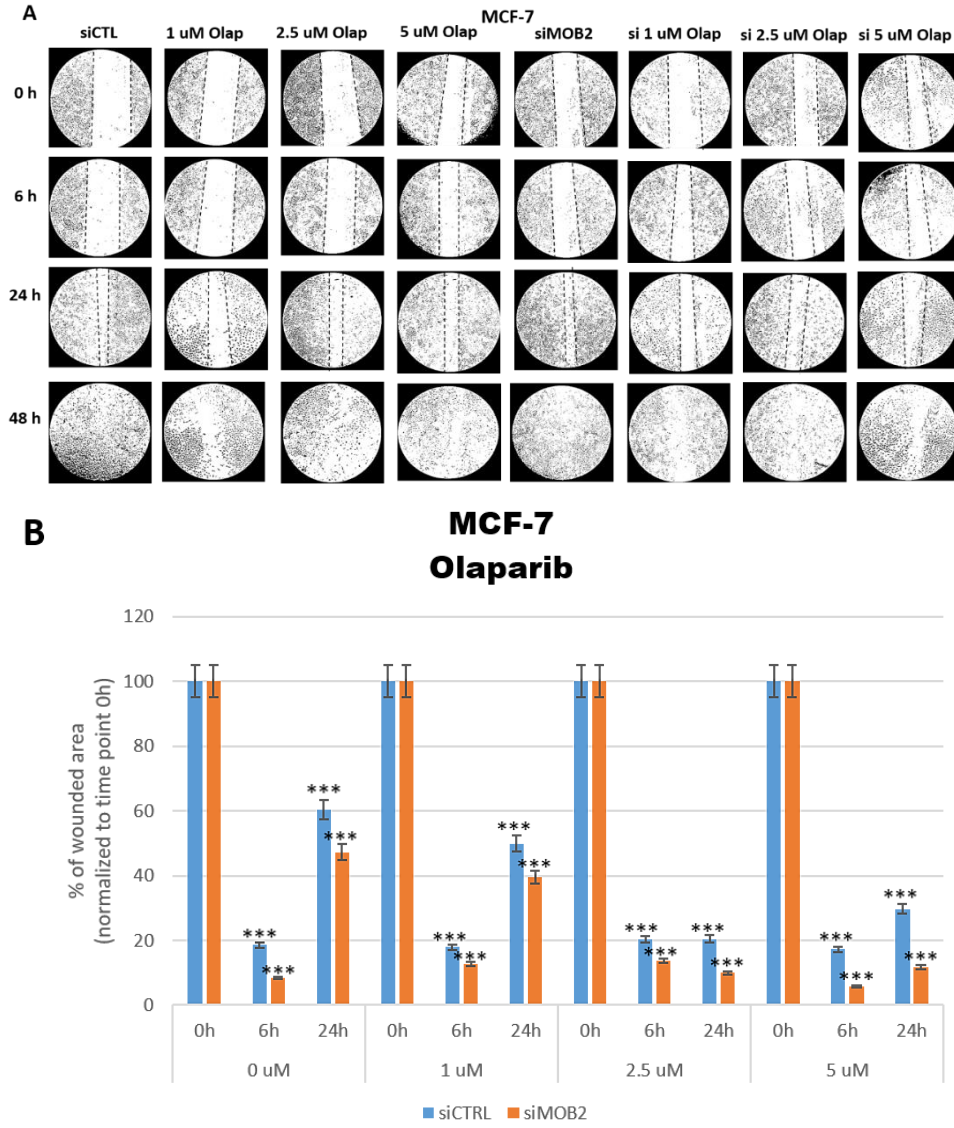


Şekil 4.54. Veliparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerin nötral kırmızısı analizi. Nötral kırmızısı deneyi için RNA interferans yöntemiyle hMOB2 geçici transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından 96 kuyucuklu plakalara transfeksiyon grupları ve kontrol gruplarının ekim işlemi yapılmıştır. Yukardaki belirtilen dozlar ve 72 saat tedavi süresi geçtikten sonra Nötral kırmızısı yöntemi deney protokolü izlenmiştir. Bir gece önce hazırlanıp inkübatörde muhafaza edilen nötral kırmızısı besiyeri 1800 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hücrelerin eski mediumu çekilip her kuyucuğa 100 uL nötral kırmızısı mediumu eklenerek 37 °C’de 2 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. Ardından medium aspire edilip her kuyucuk 150 uL PBS ile yıkanmaktadır. Daha sonra her kuyucuğa 150 uL Nötral red destain solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Elisa reader cihazı ile 540 nm’de ölçüm alınarak analizleri gerçekleştirilmiştir

4.10. siMOB2 ve PARP İnhibitörleri Kombinasyon Tedavilerinin MCF-7 Hücre Migrasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

4.10.1. siMOB2 ve Olaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre Migrasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

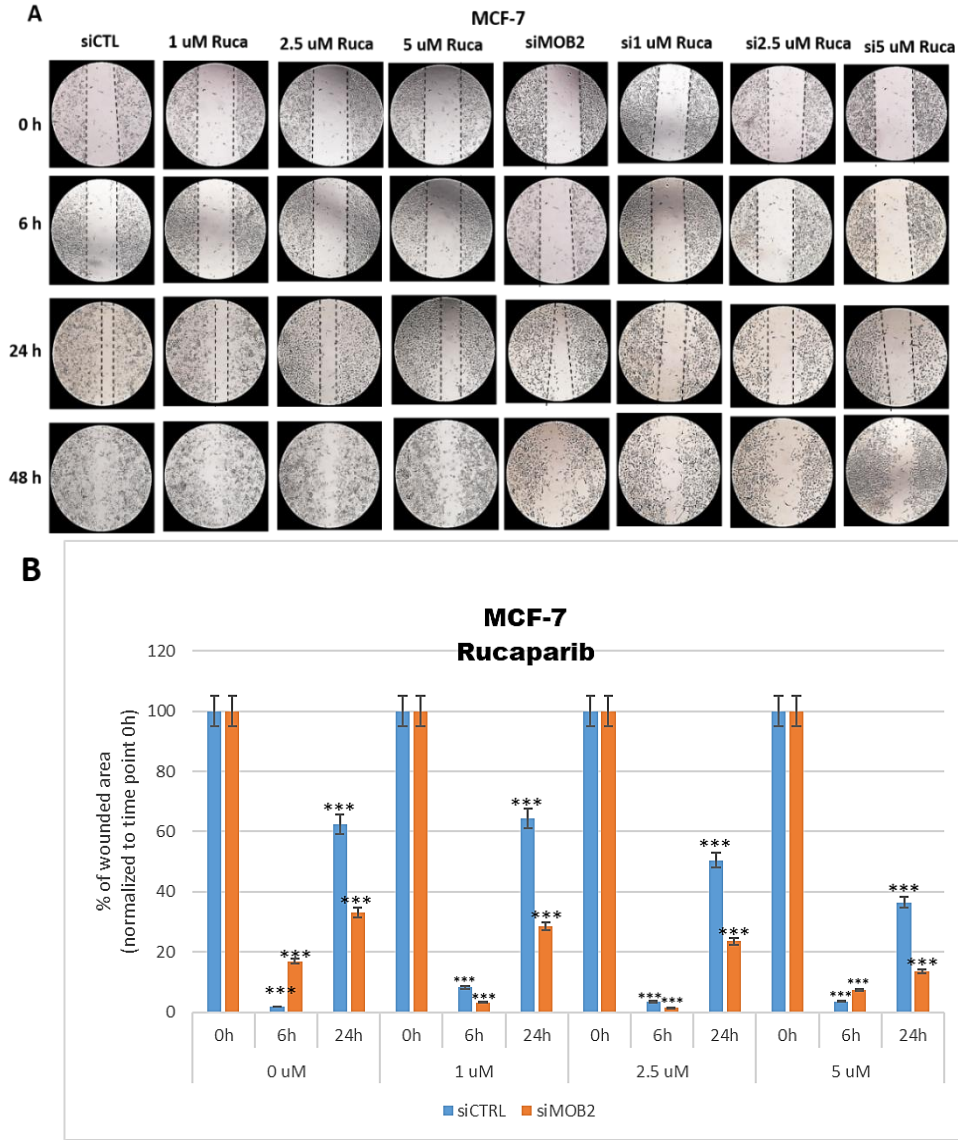
Transfekte edilen MCF-7 hücrelerinin ekimi gerçekleştirilip hücre yoğunluğu %85-90 civarında olduğunda mikropipet yardımıyla yara açılmıştır. Hücreler sırasıyla 1, 2,5 ve 5 μ M olaparib ile 24 saat süreyle tedavi edilmiştir. Hücrelerin 0., 6. ve 24. Saatleri dikkate alınarak yara açıklığı analiz edilmiştir. Her grup kendi 0. saati ile normalize edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda yara kapanma durumu kontrol grubunda artarken siMOB2 ve artan olaparib dozlarında yara kapanma süreci azalarak hücresel migrasyonun baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.55).



Şekil 4.55. Olaparib tedavisi ile MCF-7 hücrelerinde migrasyon wound healing yöntemi ile analiz edildi. (A) 6 kuyucuklu plakaya 1×10^6 MCF-7 meme kanseri hücreleri ekildi ve hücre yoğunluğu %90 civarına ulaştıktan sonra steril 100 μ L pipet ucu ile düz bir çizgi oluşturuldu. Çizgi oluşturulduktan sonra hücre kalıntıları gidermek için kuyucuklar 2 defa PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı. Taze besiyeri eklendi ve hücreler belirlenen dozlarda tedavi 24 saat edildi ve %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Yapılan wound healing deney planı ile hücreler 0. saat, 6. saat, 24. ve 48. saatlerde mikroskop altında görüntülendi. (B) Her grup kendi arasında 0. saat değerleri kullanılarak normalize edildi. Normalizasyon yapılan yara açıklığı yüzdesi grafiği. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

4.10.2. siMOB2 ve Rucaparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre Migrasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

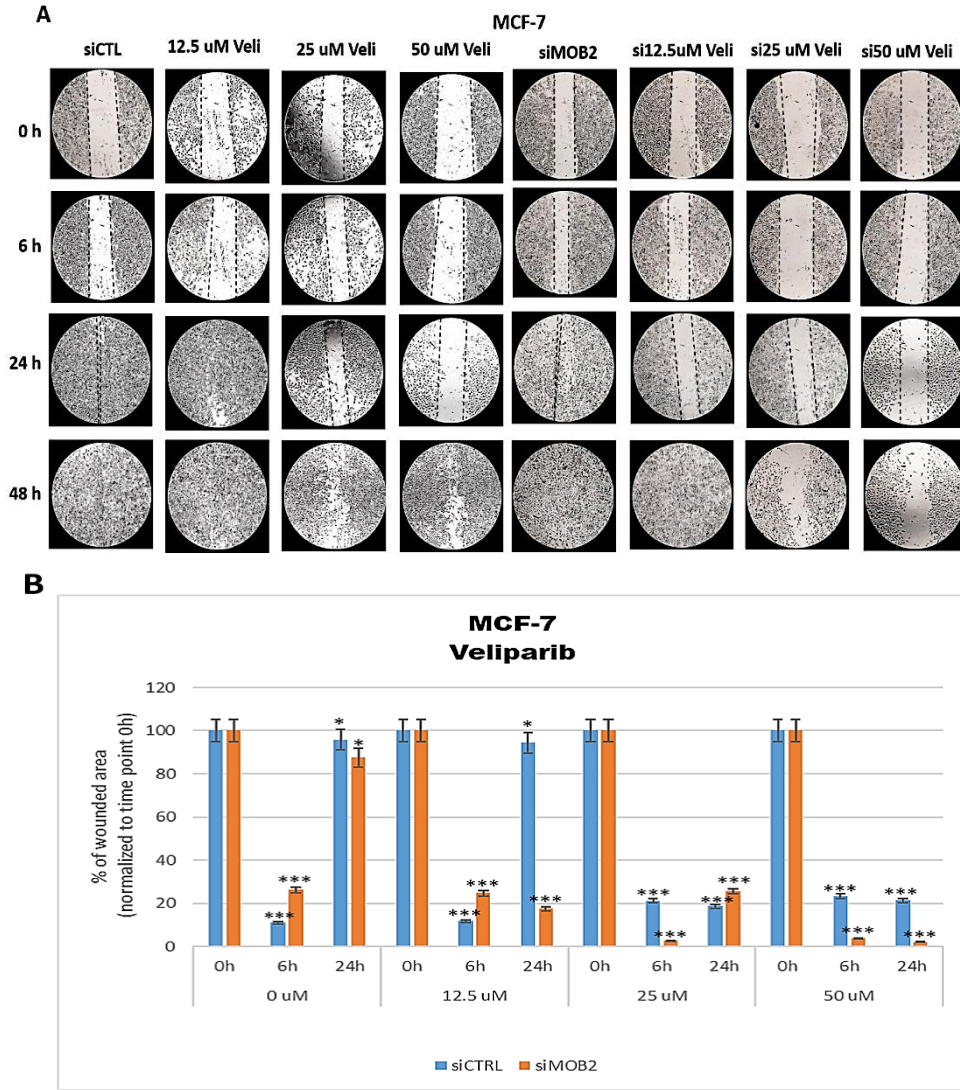
Transfekte edilen MCF-7 hücrelerinin ekimi gerçekleştirilip hücre yoğunluğu %85-90 civarında olduğunda mikropipet yardımıyla yara açılmıştır. Hücreler sırasıyla 1, 2,5 ve 5 μ M rucaparib ile 24 saat süreyle tedavi edilmiştir. Hücrelerin 0., 6. ve 24. saatleri dikkate alınarak yara açıklığı analiz edilmiştir. MCF-7 hücrelerinin yara açıldıktan 48 saat sonraki morfolojik durumları da ayrıyeten gösterilmiştir. Her grup kendi 0. saati ile normalize edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda yara kapanma durumu kontrol grubunda artarken siMOB2 ve artan rucaparib dozlarında yara kapanma süreci azalarak hücrel migrasyonun inhibe edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. MCF-7 hücrelerinde migrasyon wound healing yöntemi ile analiz edildi. (A) 6 kuyucuklu plakaya 1×10^6 MCF-7 meme kanseri hücresi ekildi ve hücre yoğunluğu %90 civarına ulaştıktan sonra steril 100 μ L pipet ucu ile düz bir çizgi oluşturuldu. Çizgi oluşturulduktan sonra hücre kalıntılarını gidermek için kuyucuklar 2 defa PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı. Taze besiyeri eklendi ve hücreler belirlenen dozlarda tedavi 24 saat edildi ve %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Yapılan wound healing deney planı ile hücreler 0. saat, 6. saat, 24. ve 48. saatlerde mikroskop altında görüntülendi. (B) Her grup kendi arasında 0. saat değerleri kullanılarak normalize edildi. Normalizasyon yapılan yara açıklığı yüzdesi grafiği. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

4.10.3. siMOB2 ve Veliparib Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücre Migrasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

Transfekte edilen MCF-7 hücrelerinin ekimi gerçekleştirilip hücre yoğunluğu %85-90 civarında olduğunda mikropipet yardımıyla yara açılmıştır. Hücreler sırasıyla 12,5, 25 ve 50 μ M veliparib ile 24 saat süreyle tedavi edilmiştir. Hücrelerin 0., 6. ve 24. saatleri dikkate alınarak yara açıklığı analiz edilmiştir. MCF-7 hücrelerinin yara açıldıktan 48 saat sonraki morfolojik durumları da ayrıyeten gösterilmiştir. Her grup kendi 0. saati ile normalize edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda, 24. saatin sonunda kontrol, 12,5 μ M veliparib ve siMOB2 gruplarında açılan yaralar tamamen kapanırken diğer gruplarda doza bağlı bir şekilde migrasyon inhibisyonları artış göstermektedir (Şekil 4.57).



Şekil 4.57. MCF-7 hücrelerinde migrasyon wound healing yöntemi ile analiz edildi. (A) 6 kuyucuklu plakaya 1×10^6 MCF-7 meme kanseri hücresi ekildi ve hücre yoğunluğu %90 civarına ulaştıktan sonra steril $100 \mu\text{L}$ pipet ucu ile düz bir çizgi oluşturuldu. Çizgi oluşturulduktan sonra hücre kalıntıları gidermek için kuyucuklar 2 defa PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı. Taze besiyeri eklendi ve hücreler belirlenen dozlarda tedavi 24 saat edildi ve %5 CO_2 içeren nemli 37°C 'lik inkübatörde inkübe edildi. Yapılan wound healing deney planı ile hücreler 0. saat, 6. saat, 24. ve 48. saatlerde mikroskop altında görüntülendi. (B) Her grup kendi arasında 0. saat değerleri kullanılarak normalize edildi. Normalizasyon yapılan yara açıklığı yüzdesi grafiği. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

Uluslararası kanser araştırma ajansı tarafından 2022 yılına ait yayımlanan raporda yaklaşık 20 milyon insana kanser teşhisi konulduğu bilinmektedir (Bray et al., 2024). Söz konusu bu verilerin kanser tedavileri noktasında ciddi adımlar atılması gerektiğini birkez daha göz önüne sermektedir. Yapılan çalışmalarla klinikte başarılı sonuçlar elde edilsede, var olan yada sonradan kazanılmış ilaç dirençleriyle birlikte tedavilerin ciddi yan etkiler göstermesi sebebiyle uzun vadeli başarılar sınırlandırılmaktadır (O'Connor, 2015; Tsimberidou et al., 2020). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, hücrelerin genomik ve proteomik profilleri kanser tedavi yanıtını belirleyen faktörler arasında yer aldığı saptanmıştır. Bu kapsamda kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının gelişimi sayesinde epigenetik, proteomik, transkriptomik, farmakogenomik ve farmakoproteomik araştırmaların artışı söz konusu olmuştur (Chambliss and Chan, 2016; Crabtree, 2019; Crews et al., 2012; D'Alessandro and Zolla, 2010; Hess, 2013; Nandal and Burt, 2017; Roden et al., 2019; Wheeler et al., 2013; Whirl-Carrillo et al., 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde hastaların yeni nesil anti kanser ilaçlar (küçük molekül inhibitörler, monoklonal antikorlar vd.) kullanarak tedaviye verdikleri yanıt neticesinde bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının önemi ortaya çıkacaktır (Chambliss and Chan, 2016; Wheeler et al., 2013). Küçük molekül PARP inhibitörlerinden olaparib, rucaparib, talazoparib ve niraparib yumurtalık ve meme kanserleri dahil birçok kanserli hastaların tedavilerinde FDA ve EMA tarafından onay aldığı bilinmektedir. Fakat uzun vadeli klinik çalışmalarda hücrelerin PARP inhibitör tedavilerine karşı ilaç direnci gösterdiği saptanmıştır. Söz konusu direncin ortadan kaldırılması için çok sayıda kombinasyon tedavi stratejileri uygulanmaktadır (Moore et al., 2019).

Hippo sinyal yolağı, tümör baskılayıcı sinyal yolaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Memeli hücrelerindeki temel bileşenlerinden Ste20 benzeri kinaz MST1/2, NDR 1/2 ve LATS 1/2 aktivasyonunu gerçekleştirmektedir (Meng et al., 2016). Hippo sinyal yolağında görev aldığı düşünülen MOB (monopolar spindle-one-binder) protein ailesi üyelerinden hMOB2 çekirdekte lokalize olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda hMOB2'nin sadece NDR1/2 ile etkileşim içerisinde olduğu da rapor edilmiştir (Hergovich et al., 2005; Kohler et al., 2010). hMOB2 proteininin, NDR1/2 etkileşimi (Kohler et al., 2010), bir başka çalışmada ise potansiyel bir DDR elementi olabileceği vurgusu (Cotta-Ramusino et al., 2011), hMOB2 üzerindeki çalışmaları hızlandırmıştır. Gomez ve ark. (2015) yaptıkları

çalışmada ise hMOB2'nin DDR regülatörü olma potansiyeli ortaya çıkarılmıştır (Gomez et al., 2015).

hMOB2 proteininin, NDR1 ve NDR2 protein kinazları ile olan ilişkisini (Kohler et al., 2010) ve bahsi geçen genomik taramanın hMOB2'nin potansiyel bir DDR elementi olabileceği tahminini (Cotta-Ramusino et al., 2011) göz önüne alarak gerçekleştirilen araştırmalar, hMOB2 proteininin hücre döngüsünün, DNA hasar yanıt ve onarım yollarının modülasyonunda rol oynayabileceğini ortaya çıkarmıştır (Gomez et al., 2015; Gundogdu et al., 2021). Yapılan bu çalışmada, RNA interferans yöntemi ile hMOB2 mRNA'sı baskılanmıştır. Bu baskılama sonucu hücrelerde DNA çift zincir kırıklarının kırıklarının birikmesi ve artan ATM-CHK2-p53-p21 protein aktivitesiyle hücre döngüsünün G1/S fazında durdurulduğu tespit edilmiştir (Gomez et al., 2015). Gündoğdu ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada ise hMOB2-defektif hücrelerde, homolog rekombinasyon DNA çift zincir kırık tamir mekanizmasının tam olarak işlevini yerine getirmediği saptanmıştır (Gundogdu, et al., 2021). İmmünofloresans yöntemi kullanılarak, eksojen olarak oluşturulan DNA hasarının tamiri esnasında RPA kompleksinin hasarlı bölgeye iletiminin başarılı bir şekilde olduğu ancak RAD51 rekombinaz yüklenmesinin gerçekleşmediği rapor edilmiştir (Gundogdu, et al., 2021).

Bu tez çalışması ile osteosarkoma U2OS hücreleri kullanılarak hMOB2'nin moleküler mekanizması ve MCF-7 hücre hattı kullanılarak hMOB2'nin bireyselleştirilmiş kanser tedavilerindeki prediktif rolü araştırılmıştır. hMOB2'nin söz konusu prediktif rolünün deşifre edilmesi kanser hücrelerinin spesifik olarak elimine edilmesini sağlayarak tedavi yaklaşımlarına katkı sunacağı düşünülmektedir. Yapılan tez çalışmasının amacı, hMOB2 proteininin çeşitli hücresel yollarda rol oynayan bileşenler arasındaki sentetik letal etkileşimlerinin ortaya çıkarılması, DNA hasarına yanıt olarak hMOB2 proteininin subsellüler lokalizasyonu ile post translasyonel modifikasyon statüsünün belirlenmesi ve son olarak hMOB2'nin meme kanseri hücre hattı kullanılarak (MCF-7) konvansiyonel ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına olan yanıtındaki rolünün saptanmasıdır.

Yaptığımız doktora tez çalışmasında, hMOB2'nin HR regülasyonundaki potansiyel rollerini ve DNA hasarına karşı artan hMOB2 protein (Gundogdu et al., 2021) seviyesini dikkate alarak gerçekleştirdiğimiz qPCR analizleriyle, hMOB2-efektif ve hMOB2-defektif

U2OS kanser hücrelerindeki DNA hasar yanıt, DNA tamir ve apoptosis yollarında rol oynayan 84 genin transkriptomik davranışı karşılaştırılmıştır. Azalan hMOB2 ifadesine karşı DNA hasar yanıt, DNA tamir ve apoptosis yollarında rol oynayan *BCL2A1*, *BTG2*, *CCNG1*, *CDKN1A*, *FAS*, *MDM2*, *PPM1D*, *STAT1* ve *TNF* genlerinin mRNA ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.3). Anti-apoptotik fonksiyonları bilinen *BCL2A1* mRNA ekspresyonunun mide, kolon, akciğer, yumurtalık, prostat ve özellikle meme tümör dokularında ciddi manada arttığı bilinmektedir. Yapılan çalışmada, artan *BCL2A1* mRNA ekspresyonu programlanmış hücre ölüm mekanizması apoptosisi engelleyerek kemoterapi direncine neden olduğu saptanmıştır (Vogler, 2012). *BIRC5* geni *BCL2A1* geni ile benzer profil sergilemekte olup hücre sağ kalımını desteklemektedir (Wheatley and Altieri, 2019). *BTG2* geni hücre proliferasyonu ve apoptosis gibi birçok hücrel mekanizmada tümör baskılayıcı olarak rol oynamaktadır (Mao et al., 2015; Yuniati et al., 2019). Transkripsiyon faktörü p53 tarafından aktif hale gelen *CDKN1A* gen ürünü p21 proteininin, hücre döngüsünün işleyişini durdurarak tümör baskılayıcı ve pro-apoptotik bir işlev gördüğü bilinmektedir (Gundogdu et al., 2021). p21 proteini üzerine yapılan çalışmalarda, kanser hücrelerinde p21 proteininin artışı onkojenik ve anti apoptotik rol oynayabileceği görüşüyle beraber p53 proteininden bağımsız bir şekilde etki gösterdiği saptanmıştır (Georgakilas et al., 2017; Ohkoshi et al., 2015). Tümör nekroz faktörü ailesine ait *TNF* geni, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptosis gibi birçok hücrel yolda görev aldığı tespit edilmiştir (Micheau and Tschopp, 2003). Azalan hMOB2 ifadesine karşı DNA hasar yanıt, DNA tamir ve apoptosis yollarında rol oynayan *BIRC5*, *BRCA1*, *CCNB1*, *CCNE1*, *CDC25C*, *DNMT1*, *KRAS*, *PRKCA*, *RB1*, *TP63* ve *XRCC5* genlerin mRNA ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını saptanmıştır (Şekil 4.4). Azalan genlerden *BRCA1* gen ürününün DNA onarım mekanizması, hücre döngüsü gibi birçok proseste rol oynadığı bilinmektedir (Tung et al., 2018). *BRCA1* özellikle DNA çift zincir kırık tamir mekanizması olan homolog rekombinasyonda *BRCA2* ve *PALB2* proteinleriyle birlikte oluşturduğu kompleks sayesinde *RAD51* rekombinazının hasarlı kromatin üzerine istila etmesi noktasında önemli olduğu bilinmektedir (Simhadri et al., 2019). Azalan hMOB2 ifadesine karşı DNA hasar yanıt, DNA tamir ve apoptosis yollarında önemli rolleri bulunan *ADGRB1*, *APAF1*, *ATM*, *ATR*, *BAX*, *BBC3*, *BCL2*, *BID*, *BRCA2*, *CASP2*, *CASP9*, *CCNH*, *CDC25A*, *CDK1*, *CDK4*, *CHEK1*, *CHEK2*, *CRADD*, *E2F1*, *E2F3*, *EGFR*, *EGF1*, *EI24*, *ESR1*, *FADD*, *FASLG*, *FOXO3*, *GADD45A*, *GML*, *HDAC1*, *HK2*, *IGF1R*, *IL6*, *JUN*,

KAT2B, MCL1, MDM4, MLH1, MSH2, MYC, MYOD1, NF1, NFKB1, PCNA, PIDD1, PRC1, PTEN, PTTG1, RELA, RPRM, SESN2, SIAH1, SIRT1, TADA3, TNFRSF10B, TNFRSF10D, TP53, TP53AIP1, TP53BP2, TP73, TRAF2, TSC1 ve *WT1* genlerin mRNA ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde değişmediği gösterilmiştir (Şekil 4.5). Yaptığımız deney neticesinde anti apoptotik fonksiyonları bilinen BCL2A1 mRNA'sının hMOB2-defektif hücrelerde önemli oranda arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).

BCL2A1 mRNA'sının hMOB2-defektif hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmasının nedenini ve hMOB2 ile olası sentetik letal etkileşimini anlamaya yönelik ayrıca yazdığımız ve TÜBİTAK tarafından desteklenen projemiz (222S786) doğrultusunda, U2OS kanser hücre canlılığı, koloni sağ-kalımı, hücre migrasyonu ve hMOB2-BCL2A1 arasındaki olası sentetik letal ilişki araştırılmıştır. Yapılan proje neticesinde, hMOB2 ve BCL2A1 proteinlerinin baskılanmasıyla olası sentetik letal etkileşimleri ortaya çıkarılmıştır. Doktora çalışmasında yapılan hMOB2 defektif hücrelerde BCL2A1 mRNA'sının aşırı arttığı belirlenirken söz konusu bu artışın protein ekspresyon düzeylerinde de olduğu bu proje çalışması ile teyit edilmiştir. hMOB2 ve BCL2A1 proteinlerinin tekli ve ikili baskılanması U2OS hücre canlılığını, koloni sağ-kalımını ve hücre migrasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanmıştır.

Memeli hücrelerinin, genomik stabiliteyi tekrar sağlamak amacıyla DNA hasarının anında tespitini, iletimini ve tamirini sağlayan oldukça karmaşık bir DNA hasar yanıt mekanizmasına sahip oldukları bilinmektedir (Ciccio et al., 2010; Gundogdu et al., 2021; Jackson and Bartek, 2009). Yapılan araştırmalar neticesinde, DNA hasar yanıtında ve hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan proteinlerin (RAD51, γ H2AX, 53BP1) DNA çift zincir kırığı meydana geldiğinde ilgili bölgeye toplandığı immünofloresans deneyleriyle tespit edilmiştir (Anderson et al., 2001; Paull et al., 2000; Richie et al., 2002; Tashiro et al., 2000).

TP53BP1 geni tarafından kodlanan 53BP1 (İng. "*p53 binding protein 1*") proteininin, p53 tümör baskılayıcı proteininin transkripsiyonel ko-aktivatörü olarak rol oynadığı saptanmıştır. 53BP1 proteininin DNA çift zincir kırıklarının olduğu bölgelerde yoğun olarak lokalize olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda 53BP1 proteini, hasar oluşumunun tespitinden itibaren hücre döngüsü kontrol noktalarının aktivasyonu, hasarın HR

mekanizması yerine NHEJ mekanizması ile onarılması teşvik ederek proteinlerin ilgili bölgeye toplanmasını regüle ettiği çeşitli çalışmalarla saptanmıştır (Anderson et al., 2001; Gupta et al., 2014; Mirza-Aghazadeh-Attari et al., 2019; Ward et al., 2003). ATM kinaz tarafından fosforile edilerek aktif hale gelen γ H2AX DNA çift zincir kırık tamir mekanizmasında önemli bir biyobelirteç olduğu bilinmektedir (Kuo and Yang, 2008). Gomez ve ark. 2015’de yaptıkları çalışmada, hMOB2 defektif hücrelerde hMOB2 efektif hücrelere göre 53BP1 ve γ H2AX ikili odak oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Gomez et al., 2015). Tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz immüno Floresans deneylerinde, mitomisin C kullanılarak oluşturulan DNA hasarı sonucunda hMOB2 proteini ile birlikte 53BP1 ve γ H2AX proteinleride hasarlı alana toplanarak ko-lokalize oldukları immüno Floresans yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).

DNA çift zincir kırığı meydana geldiğinde hasarın tamiri için homolog rekombinasyondan sorumlu proteinler hasarlı kromatin bölgesinde yoğunlaşmaktadır. Hasar tespit edildikten sonra MRE11 tarafından kırık uçların stabilizasyonu gerçekleştirilir. Kırık uçların olası nükleaz aktivitesinden dolayı RPA kompleksiyle kaplanması ardından RAD51 rekombinazı BRCA1-BRCA2-PALB2 protein kompleksi tarafından ilgili bölgeye yüklenmektedir. Ardından RAD51 kardeş kromatitteki bilgiyi istila ederek zincirin hatasız bir şekilde tamir edilmesine olanak sağlamaktadır (Chapman et al., 2012; Jasin and Rothstein, 2013; Krejci et al., 2012; Meyer et al., 2020). Gerçekleştirdiğimiz immüno Floresans analizleriyle, eksojen DNA hasarına karşı RAD51 ve hMOB2 proteinlerinin muhtemel ko-lokalizasyonları araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre indüklenen eksojen DNA hasarına karşı hMOB2 ve RAD51 proteinlerinin hasarlı kromatin bölgesinde ko-lokalizasyonunun gerçekleşmediğini fakat hMOB2 proteininin önemli bir DDR regülatörü olduğuna dair hipotezimizi desteklemektedir (Şekil 4.9).

Potansiyel olarak önemli bir homolog rekombinasyon DNA onarım faktörü ve PARP inhibitör duyarlılığının belirleyicisi olması nedeniyle (Gundogdu et al., 2021), hMOB2’nin muhtemel post-translasyonel modifikasyonunun ve protein-protein etkileşiminin biyolojik öneminin ortaya çıkarılması önem arz etmektedir. Bu amaçla, U2OS hücrelerinde wild-type *hMOB2* geni ve mutant gen varyasyonları ektopik olarak sentezlenerek PARP inhibitör duyarlılık fenotipi araştırılmıştır. Bu kapsamda, online veri tabanı scansite

taramasında (Obenauer et al., 2003) hMOB2'nin DNA hasar yanıt regülatörü olan ATM kinaz tarafından muhtemelen S139 bölgesinden fosforile olabileceği önerilmektedir (Şekil 4.10). hMOB2-defektif kanser hücrelerinin olaparibe karşı hassasiyeti teyit edilmiştir ancak eksojen olarak hMOB2 wild-type veya hMOB2 S139A mutant formunun ifade edildiği kanser hücrelerinin olaparib tedavisine verdiği yanıtlar arasında anlamlı bir farkın gözlenmediği dikkat çekmektedir (Şekil 4.13). Sonuç olarak, *in silico* olarak tanımlanan ATM kaynaklı muhtemel hMOB2 fosforilasyonunun hMOB2-PARP arasındaki sentetik letal etkileşimde etkili olmadığı, ancak söz konusu etkileşimin daha kapsamlı deneylerde teyit edilmesinin gerekliliği anlaşılmıştır.

Hippo sinyal yolağı, merkezi bir düzenleyici olarak doku homeostazi ve organ büyüklüğünün kontrolünü sağlamaktadır (Justice et al., 1995; Xu et al., 1995). Hippo sinyal yolağının upstream regülatörü olarak merkezde bulunan LATS1/2 ve NDR1/2 kinazların aktivasyonunu sağlamaktadır (Yu and Guan, 2013). Yapılan çalışmalarla, hMOB1A/B proteinlerinin LATS1/2 ile etkileşim içinde olduğu ve NDR1/2 kinaz aktivitesini destekleyici profil sergilediği belirlenmiştir. hMOB2 proteini ise sadece NDR1/2 ile etkileşim içinde olduğu ve bu etkileşimin NDR1/2 kinaz aktivitesinin inhibisyonuyla gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu nedenle hMOB1A/B proteinleri NDR1/2 ko-aktivatörü, hMOB2 proteinleri ise NDR1/2 kinaz inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Bothos et al., 2005; Hergovich et al., 2006; Kohler et al., 2010). NDR1/2 kinazların hMOB2 proteini ile etkileşimi His157 amino asiti üzerinden gerçekleştiği söz konusu amino asitin mutant formu ile hMOB2 etkileşime girmediği saptanmıştır (Kohler et al., 2010). hMOB2-NDR1 protein-protein bölgesinin olaparib fenotipi üzerine olan katkısının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, hMOB2 defektif hücrelerdeki olaparib hassasiyeti yineleni fakat eksojen olarak hMOB2 wild-type veya hMOB2 H157A mutant formunun ifade edildiği kanser hücrelerinin olaparib tedavisine verdiği yanıtlar arasında anlamlı bir farkın gözlenmediği saptanmıştır (Şekil 4.15). Sonuç olarak, hMOB2'nin kanser hücrelerinin PARP inhibisyonuna karşı geliştirdiği hücrel yanıtı olan katkısının NDR1/2-bağımsız olduğu değerlendirilmiştir.

Hücrel mekanizmada DNA tek zincir kırık tamirinde rol oynayan PARP protein ailesi, 17 adet enzimden oluştuğu bilinmektedir (Ashworth et al., 2018; Sonnenblick et al., 2015). PARP proteini çoğunlukla PARP ailesine ait olan 113 kDA ağırlığından oluşan PARP1 adı

verilen polipeptid ile katalizör görevi görmektedir. PARP1, DNA’da meydana gelen tek veya çift zincir kırıklarında aşırı bir şekilde afiniteyle bağlanmaya yardımcı olan DNA bağlanma domaini ihtiva etmektedir. Reaksiyonda substrat olarak NAD⁺ görev alarak parçalanan nikotinamid ADP-ribozil kısmı hedef proteinin glutamat veya yan zincirlerine aktarılmaktadır (Bürkle et al., 2005). DNA’da meydana gelen tek zincir kırığı sonucunda, DNA’yı tamir etmek için proteinler, PARP enzimleri tarafından hasarın etrafına toplanmaktadır (Lord et al., 2015). Metabolizmada meydana gelen DNA çift zincir kırıklarının onarılmasında görev alan HR mekanizmasının defektif olduğu hücrelerde PARP inhibisyonuna karşı hassasiyet gösterdikleri saptanmıştır (Ciccia et al., 2010; Goodarzi and Jeggo, 2013).

Bireyselleştirilmiş kanser tedavileri noktasında PARP enzim inhibisyonu ile klinikte önemli başarılar elde edilmiştir. Çok sayıda küçük molekül PARP inhibitörleri (örn. olaparib, rucaparib, veliparib vd.) kullanılarak PARP enzim inhibisyonu ile monoterapi, radyoterapi ve/veya kemoterapi ile kombinasyonu şeklinde klinik öncesi ve klinik açıdan sonuçlar değerlendirilmektedir. Klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılan küçük molekül PARP inhibitörleri, olaparib, rucaparib, veliparib, pamiparib, fluzoparib ve talozoparib olarak sıralanabilmektedir. PARP inhibitörlerinden olaparib (Lynparza), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Dairesi (EMA) tarafından onay verilen ilk PARP inhibitörü olma özelliğini taşımaktadır. Söz konusu onaylar, 2014 yılında ileri evre kalıtsal BRCA-mutant yumartalık kanseri hastalarının tedavisine yönelik yapılan çalışma ile verilmiştir (Kaufman et al., 2015). Olaparib, 2018 yılında *BRCA*-mutant *HER2*-negatif meme kanseri hastaları, 2019 yılında *BRCA*-mutant metastatik pankreas kanseri hastaları ve 2020 yılında HR-defektif, metastatik ve kastrasyon-dirençli prostat kanseri hastalarının tedavilerinde kullanılmak üzere onay aldığı bilinmektedir (de Bono et al., 2020; Golan et al., 2019; Moore et al., 2018; Robson et al., 2019). Bir diğer PARP inhibitörlerinden Rucaparib (Rubraca) ise 2016 yılında ileri evre kalıtsal veya somatik *BRCA*-mutant yumurtalık kanseri hastalarının tedavisi için onay almıştır (Oza et al., 2017). Aynı zamanda Rucaparib, 2020 yılında *BRCA*-mutant metastatik kastrasyon-dirençli prostat kanseri hastalarının tedavileri için onay aldığı bilinmektedir (Abida et al., 2019). Niraparib (Zejula) ve talazoparib (Talzenna) ise kanser hastalarının tedavilerine yönelik onay alan diğer PARP inhibitörlerindendir (Ettl et al., 2018; González-Martín et al., 2019; Mirza et al., 2016; Moore et al., 2019). Pamiparib, 2021 yılında beyin tümörlerinin

tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onay aldığı bilinmektedir (Markham, 2021). Fluzoparib ise 2021 yılında yumurtalık kanseri hastalarının tedavisi için onay almıştır (L. Li et al., 2021). Veliparib (Baxter et al., 2020), molekülü için ise klinik araştırmaların devam ettiği bilinmektedir. Yapılan son çalışmalarda, PARP inhibitörlerinden talazoparibin PARP tuzaklama yeteneğinin en yüksek seviyede olduğu, veliparibin ise diğer inhibitörlere kıyasla daha düşük seviyede tuzaklama yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır (Pilié et al., 2019). Her ne kadar PARP inhibitörlerinin kullanımı klinik öncesi ve klinik sonrası tedavilerde iyi sonuçlar sağlamış olsa da ilaca karşı oluşturulan direnç nedeniyle klinikte tedavi başarısı olumsuz etkilenmektedir (Bitler et al., 2017; D'Andrea, 2018).

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, hMOB2'nin meme kanseri hücrelerinin konvansiyonel ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına olan yanıtındaki rolünün saptanması kapsamında hMOB2 ve PARP inhibitörlerinden olaparib, rucaparib ve veliparib kombinasyon tedavisinin meme kanseri hücre canlılığına, koloni sağ kalımına, apoptotik/otofajik protein ekspresyonlarına, hücre migrasyon yeteneğine, DNA hasar oluşumuna ve sitotoksitenin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Kristal viyole *in vitro* hücre canlılık analizi, memeli hücrelerinde sitotoksitenin belirlenmesi için kullanılan boya temelli bir yöntemdir (Itagaki et al., 1991). Yaptığımız çalışmada, RNA interferans yöntemi kullanılarak MCF-7 hücrelerinde hMOB2 protein ekspresyonu geçici olarak baskılanmıştır. MCF-7 mono tedavi ve hMOB2 baskılanan gruplar PARP inhibitörlerinden olaparib artan dozlarda (1, 2,5, 5 ve 10 μ M), rucaparib artan dozlarda (1, 2,5, 5 ve 10 μ M) ve veliparib artan dozlarda (12,5, 25, 50 ve 100 μ M) 72 saat tedavi edilmiştir. Olaparib molekülünün artan dozlarda MCF-7 hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Kontrole kıyasla grupların hücre canlılık yüzdeleri; 1 μ M olaparib için %85,3, 2,5 μ M için %73,2, 5 μ M için % 51,6 ve 10 μ M olaparib için %45,8 olarak hesaplanmıştır. hMOB2 defektif hücre gruplarının olaparib tedavisi sonucu hücre canlılık yüzdeleri mono gruplara göre daha az olması dikkat çekmektedir. Söz konusu bu azalma U2OS hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada (Gundogdu et al., 2021) olaparib tedavisi sonucunda ortaya çıkan hMOB2 hassasiyeti ile çalışmamızı destekler niteliktedir. Pierce ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, MCF-7 hücrelerinin olaparib tedavisi sonucunda IC50 değerini 5,8 μ g/mL

olarak saptamışlardır (Pierce et al., 2013). Yaptığımız kristal viyole hücre canlılık analizi neticesinde, MCF-7 hücre hattı olaparib tedavisi IC₅₀ değeri 5,46 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16, B). Önceki çalışmalar ile yaptığımız çalışma birbirini destekler niteliktedir. MCF-7 hücrelerinde rucaparib tedavisinin artan dozlarda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Kontrole kıyasla grupların hücre canlılık yüzdeleri; 1 µM rucaparib için %87,2, 2,5 µM için %77,8, 5 µM için % 60,7 ve 10 µM rucaparib için %33,3 olarak hesaplanmıştır. hMOB2 baskılanmasıyla birlikte hücrelerde oluşan PARP hassasiyeti (Gundogdu et al., 2021) rucaparib tedavi gruplarında da görülmektedir. Keung ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada, MCF-7 hücrelerinde rucaparib IC₅₀ değeri 10 µg/mL (Keung et al., 2020) olarak saptanırken bizde, kristal viyole hücre canlılık analizi MCF-7 hücre hattı rucaparib tedavisi IC₅₀ değeri 6,98 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17, B). Son olarak MCF-7 hücrelerinde veliparib tedavisinin artan dozlarda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Kontrole kıyasla grupların hücre canlılık yüzdeleri; 12,5 µM veliparib için %68,2, 25 µM için %50,9, 50 µM için % 36,4 ve 100 µM veliparib için %28,2 olarak hesaplanmıştır. Ávila-Arroyo ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, MCF-7 hücrelerinde veliparib IC₅₀ değerini 10 µM'dan yüksek şeklinde bulmuşlardır (Ávila-Arroyo et al., 2015). Yaptığımız çalışmada ise kristal viyole hücre canlılık analizi MCF-7 hücre hattı veliparib tedavisi IC₅₀ değeri 24,97 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18, B). Ávila-Arroyo ve ark. (2015) yaptıkları çalışmanın doğrudan IC₅₀ değeri vermeyip yaklaşık ifadeler kullanıyor olmaları neticesinde bulduğumuz sonuç literatüre yeni bir katkı sağlayacaktır.

Klonojenik sağ kalım analizleri, bir hücrenin kolonileşme sürecinin takibinin sağlandığı ve hücrelerin koloni yapabilme yeteneklerinin analizinin yapıldığı yöntemdir (Franken et al., 2006). Yaptığımız çalışmada, RNA interferans yöntemi kullanılarak MCF-7 hücrelerinde hMOB2 protein ekspresyonu geçici olarak baskılanmıştır. MCF-7 mono tedavi ve hMOB2 baskılanan gruplar PARP inhibitörlerinden olaparib artan dozlarda (1, 2,5, 5 µM), rucaparib artan dozlarda (1, 2,5, 5 µM) ve veliparib artan dozlarda (12,5, 25, 50 µM) 72 saat tedavi edilmiştir. Tedavilerin ardından yaklaşık 12 günlük periyotta hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri takip edilmiştir (Şekil 4.19). Yapılan analiz neticesinde, olaparib ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin doza bağlı bir şekilde koloni yapma yeteneğini engellediği istatistiksel olarak saptanmıştır. hMOB2 defektif hücrelerde koloni yapma

yetenekleri diğer gruplara göre daha fazla baskılandığı saptanmıştır. Hücrelerin koloni oluşturma yüzdeleri kontrol grubuna kıyasla (%100), siMOB2 %91, 5 μ M olaparib için %24 ve siMOB2 5 μ M olaparib tedavisi için %9 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.19,B). Rucaparib ile tedavi edilen grupta MCF-7 hücrelerinin doza bağlı bir şekilde koloni yapma yeteneğini engellediği tespit edilmiştir (Şekil 4.20). hMOB2 defektif hücrelerde PARP inhibitör hassasiyetinin devam ettiği gözlenmiştir. Koloni oluşturma yüzdeleri kontrol grubuna kıyasla (%100), siMOB2 %83, 5 μ M rucaparib için %15 ve siMOB2 5 μ M rucaparib tedavisi için %7.5 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.20, B). Son olarak veliparib ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde koloni yapma yetenekleri inhibe edilmiştir (Şekil 4.21). MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma yüzdeleri kontrol grubuna kıyasla (%100), siMOB2 %76, 50 μ M veliparib için %6 ve siMOB2 50 μ M veliparib tedavisi için %3 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.21, B). Gündoğdu ve ark. (2021) yapmış oldukları çalışmada, PARP inhibitörlerinden olaparib, rucaparib ve veliparibin U2OS hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerini inhibe ettikleri belirtilmiştir. Ayrıca hMOB2 defektif hücrelere uygulanan söz konusu tedavilerin kontrol hücrelerine kıyasla koloni yapma yetenekleri daha fazla baskılanmıştır (Gundogdu et al., 2021). Gündoğdu ve ark. (2021) yapmış oldukları çalışmada alınan sonuçlar yaptığımız çalışmayı desteklemektedir.

hMOB2 defektif MCF-7 hücrelerinde PARP inhibitörlerinden olaparib, rucaparib ve veliparib tedavilerinin apoptotik-otofajik protein ekspresyonları üzerine etkileri Western blot yöntemi ile araştırılmıştır. Western blot yöntemi ile hMOB2, p53, p21, Bax, Bcl-2, Cas-3, Cas-9, cPARP ve Beclin-1 protein ekspresyon profilleri analiz edilmiştir. p53 proteini, birçok genin regülasyonunda ve tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. Transkripsiyon faktörü olarak bilinen p53 proteini, DNA hasarı durumunda hasarın tamir edilmesi için hasarlı bölgeye gerekli tüm proteinlerin toplanmasını sağlamaktadır. DNA hasarının tamir edilemediği durumda ise hücrenin apoptosis mekanizması ile eliminasyonunu regüle etmektedir. Hücre döngüsünün p53 tarafından durdurulmasının ardından p21, kaspaz-8 ve DR5 tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu ile apoptosis süreci başlatılmaktadır (Gundogdu et al., 2021; Kulaberoglu and Hergovich, 2023). Yaptığımız Western blot analizinde, MCF-7 hücrelerinde olaparib ve rucaparib tedavilerinin sonucunda hMOB2 baskılanmış gruplarda p53 protein ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.32). hMOB2 defektif

hücrelerde söz konusu p53 miktarının artışı Gomez ve ark. (2015) yaptıkları çalışmayla benzerlik göstermektedir. Söz konusu çalışmada hMOB2 baskılanmasının DNA hasar birikimine yol açtığı ve artan ATM-CHK2-p53-p21 protein aktivitesiyle hücre döngüsünün G1/S noktasında durdurulduğu tespit edilmiştir (Gomez et al., 2015). hMOB2 defektif hücrelerde veliparib tedavisi sonucu p53 miktarının doza bağlı azaldığı diğer gruplarda ise anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.41). Apoptosis mekanizmasının kaspaz aktivasyonun p53 proteininden bağımsız bir şekilde gerçekleşebileceği (Marchini et al., 1999) ve PARP1 molekülünün kaspazlar tarafından kesilerek apoptosise yönlendirildiği yapılan çalışmalarla saptanmıştır (Chaitanya et al., 2010; Mashimo et al., 2021). Önceki yapılan çalışmalar ışığında, veliparib tedavisi sonucu elde ettiğimiz sonuçlar p53'ten bağımsız bir şekilde apoptosisin gerçekleşebileceğini göstermektedir. p21 proteini, p53'ün transfeksiyonel hedefi olup siklin bağımlı kinaz inhibitörü olarak rol oynamaktadır. p21, hücre döngüsünün durdurulmasını p53 protein aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleştirmektedir (Mansilla et al., 2020; Shamloo and Usluer 2019). p21 proteini, pro-kaspaz-3 ve apoptoz sinyal düzenleyici kinazlara bağlanarak apoptosisin engellenmesini düzenlemektedir. Bu önemli rolü p53 proteininden bağımsız bir şekilde ubiquitin aracılı proteazom sistemi yoluyla gerçekleştirmektedir (Li et al., 2018; Luo et al., 2022; Zhan et al., 2007). hMOB2 defektif MCF-7 hücrelerinde olaparib ve rucaparib artan dozlarda tedavileri neticesinde p21 protein ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Söz konusu bu artışların Gomez ve ark. (2015) yaptıkları çalışmayla benzerlik göstermektedir (Gomez et al., 2015). DNA hasarı durumunda p53 bağımlı p21 aktivasyonu hücre döngüsünün durdurulması ile sonuçlanmakta p21 inhibisyonu ise hücre proliferasyonunu tetiklemektedir (Li et al., 2018; Luo et al., 2022). hMOB2 efektif ve defektif MCF-7 hücrelerinde veliparib tedavisinde ise p21 miktarı kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.42). Bu azalma Li ve ark. (2018) ve Luo ve ark. (2022) yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Bcl-2 ailesi içsel apoptoz yolağının önemli bir düzenleyicisi olarak görev almaktadır. Bcl-2 ailesi üyeleri homoloji domainleri (BH) içererek apoptotik sürecin düzenleyici olarak pro-apoptotik proteinler (BAX, BAK vd.), anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl2A1, Bcl-2xL vd.) ve sadece BH3 domaini içeren (NOXA, PUMA, BAD vd.) proteinler olarak sınıflandırılır (Adams and Cory, 2018; Czabotar et al., 2014). Pro-apoptotik Bax proteini apoptosisi indüklerken anti-apoptotik Bcl-2 proteini ise apoptozisi baskılamaktadır. Ayrıca anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aşırı aktivasyonu

hücre sağ kalımını desteklediği gibi ilaç direncide oluşturmaktadır (Al-Bedeary et al., 2020; García-Aranda et al, 2018; Tzifi et al., 2012). Yapılan çalışmada olaparib ve rucaparib tedavileri sonucunda Bax protein ekspresyonları doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.25 ve Şekil 4.34). Veliparib tedavi gruplarında ise tüm gruplarda doza bağlı bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.43). Gündoğdu ve ark. (2021) yapmış oldukları çalışmada PARP inhibitörlerinde olaparib, rucaparib ve veliparib tedavilerinin U2OS hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdikleri ve bu etkinin hMOB2 defektif hücrelerde ise daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Gundogdu et al., 2021). Yaptığımız çalışmada olaparib ve rucaparib mono ve hMOB2 defektif hücrelerdeki Bax protein ekspresyon miktarının artışının hücresel toksisitenin artışıyla birlikte apoptosis mekanizması ile sonuçlandığı kanaatindeyiz. Böylelikle önceki yapılan çalışmanın yaptığımız çalışmayı destekler nitelikte olduğu anlaşılmaktadır. Veliparib tedavi gruplarındaki azalmanın meydana gelmesi Bax proteininden bağımsız bir şekilde farklı bir yolakla sitotoksitenin oluştuğu düşünülmektedir. Anti apoptotik özellikleriyle bilinen Bcl-2 protein ekspresyonlarına bakıldığında olaparib, rucaparib ve veliparib tedavileri sonucu hMOB2 defektif hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmektedir (Şekil 4.26, Şekil 4.35 ve Şekil 4.44). MCF-7 hücrelerinde olaparib, rucaparib ve veliparib tedavileri sonucunda hMOB2 efektif ve defektif hücre gruplarında Cas-3 protein ekspresyon sevipleri analiz edilmiştir. hMOB2 defektif hücre grubunda ve olaparib 1, 5 μ M gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Şekil 4.27). Cas-3 protein ekspresyonundaki söz konusu artış Vishwanath ve ark. (2022) yapmış oldukları çalışma ile benzerlik göstermektedir (Vishwanath et al., 2022). Rucaparib tedavisi sonucunda Cas-3 protein ekspresyonları kontrol grubu seviyelerinde seyir etmektedir (Şekil 4.36). Veliparib tedavi gruplarında ise Cas-3 ekspresyonu 12,5 μ M ve hMOB2 defektif gruplarda anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.45). Pro apoptotik fonksiyonları ile bilinen Cas-9 proteini, hMOB2 defektif MCF-7 hücrelerine uygulanan PARP inhibitör (olaparib, rucaparib ve veliparib) tedavileri sonucu ekspresyon miktarları analiz edilmiştir. hMOB2 defektif tüm olaparib, rucaparib ve veliparib gruplarda total Cas-9 miktarı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.28, Şekil 4.37 ve Şekil 4.46). PARP, DNA tek zincir kırıklarının tamirini regüle eden 17 adet üyesi bulunan enzim ailesidir. PARP aktivasyonu, hücresel proliferasyon ve DNA tek zincir kırık onarımı olmak üzere hücresel metabolizmada kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir (Fisher et al., 2007; Woodhouse and Dianov, 2008). PARP enzim ailesinin üyelerinden PARP1, apoptosis

aktivasyonunda rol oynayan kaspaz 3 ve kaspaz 7 tarafından kesilmektedir. 113 kDa ağırlığında olan PARP1 kesim işleminden sonra 24 ve 89 kDa'lık fragmanlara ayrılmaktadır. 89 kDa kesilmiş PARP (cleaved PARP) protein ekspresyon miktarı apoptosis sürecinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Chaitanya et al., 2010; Mashimo et al., 2021). Farklı dozlarda olaparib, rucaparib ve veliparib tedavileri sonucu cPARP protein ekspresyon seviyelerine bakıldığında tedavi gruplarının tümünde doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Şekil 4.29, Şekil 4.38 ve Şekil 4.48). TÜBİTAK tarafından desteklenen 120S774 nolu projemizde yapılan MCF-7 hücrelerinde olaparib tedavisi sonucu cPARP protein ekspresyon seviyeleri artış göstermiş olması yaptığımız çalışmayı destekler niteliktedir. Vishwanath ve ark. (2022) bir başka çalışmada ise MCF-7 hücrelerinde olaparib tedavisi sonucu cPARP protein ekspresyon miktarındaki artış çalışmamızı desteklemektedir (Vishwanath et al., 2022). Zhang ve ark. (2021) yapmış oldukları çalışmada, PI3K inhibitörü olarak bilinen BKM120 ve rucaparib tedavilerinin U251 ve U87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki sentetik letal etkileşim incelenmiştir (Zhang et al., 2021). Söz konusu çalışmada BKM120 ve rucaparib tedavilerinin cPARP protein ekspresyonu arttırdığı tespit edilmiş olup yaptığımız çalışma ile benzerlik göstermektedir. Hsu ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada, UMSSC-22A ve UMSSC-22B hücreleri kullanılarak linifanib (ABT-869) ve veliparib (ABT-888) tekli ve kombine tedavileri sonucunda cPARP ekspresyon miktarının anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Hsu et al., 2014). Hsu ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışma ile yapmış olduğumuz çalışma benzerlik göstermektedir. Otofaji, hücrenin açlık, stres gibi fizyolojik faktörlere maruz kalma durumlarında besin ihtiyacını karşılamak için kendi yapıtaşlarını sindirmesi durumudur. Otofaji mekanizmasında rol oynayan Beclin-1 ekspresyonunun otofajiyi indüklediği bilinmektedir (Levine and Kroemer, 2008). Yaptığımız çalışmada olaparib, rucaparib ve veliparib tedavilerinin Beclin-1 protein ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.31, Şekil 4.40 ve Şekil 4.49). Sonuç olarak, PARP inhibitörlerinden olaparib, rucaparib ve veliparib tedavilerinin hMOB2 efektif/defektif meme kanseri hücrelerinin sitotoksitesini arttırdığı ve MCF-7 hücrelerini apoptosise sürüklediği tespit edilmiştir.

DNA'da meydana gelen endojen ve/veya eksojen kaynaklı hasarların oluşturduğu genomik kararsızlık ve tümöröjenezi ortadan kaldırmak için hücre metabolizmasında DDR sistemi devreye girmektedir. Söz konusu hasarların DDR mekanizmasıyla onarılması

durumunda hücrelölüm, yaşlanma veya mutasyon birikimi gözlenmektedir. Kanser hücrelerinin farmakolojik olarak hedeflenmesi küçük molekülü inhibitör tedavilerini öne çıkartmaktadır. Küçük molekül inhibitörlerden PARP inhibitörleri kanser tedavi stratejilerinde başarılı sonuçlar almaktadır (Gundogdu et al., 2021). Yaptığımız çalışmada, hMOB2 defektif MCF-7 hücrelerinde PARP inhibitör tedavilerinin DNA fragmentasyonları saptanmıştır. Kontrole kıyasla tüm olaparib, rucaparib ve veliparib gruplarında farklı yoğunluklarda DNA fragmentasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.49, Şekil 4.50 ve Şekil 4.51). Ma ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada, MCF-7 hücrelerinde olaparib tedavisi sonucu DNA fragmentasyonunun kontrole kıyasla artmış olduğu tespit edilmiştir (Ma et al., 2019). Han ve ark. (2022) yapmış oldukları çalışmada ise HCT116 hücrelerinde 10 µM olaparib tedavisinin DNA fragmentasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Han et al., 2022). Tang ve ark. (2022) yaptıkları çalışmada SKOV3 hücrelerinde olaparib tedavisinin Annexin V analizleri sonucunda DNA fragmentasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Tang et al., 2022). Ihnen ve ark. (2013), Cho ve ark. (2021) ve Zhang ve ark. (2022) yapmış oldukları çalışmalarda, rucaparib konsantrasyonlarının Annexin V ve Comet Assay yöntemleri neticelerinde DNA fragmentasyonuna neden oldukları tespit edilmiştir (Cho et al., 2021; Ihnen et al., 2013; Zhang et al., 2021). Wilson ve ark. (2019) ve Caron ve ark. (2019) yaptıkları çalışmalarda sırasıyla A549 ve U2OS hücrelerinde artan veliparib konsantrasyonlarının DNA hasarına neden olduğu saptanmıştır (Caron et al., 2019; Wilson et al., 2019). Söz konusu çalışmalardan elde edilen tüm verilere bakıldığında yaptığımız çalışmayı destekler niteliktedir. Sonuç olarak, MCF-7 hücrelerinde artan dozlarda PARP inhibitör tedavileri DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır.

Nötral kırmızısı zayıf bir boya olup hücrel toksisitenin belirlenmesi için kullanılan boya temelli yöntemlerdendir (Ates et al., 2017). Yaptığımız çalışmada, hMOB2 baskılandığı gruplarda dahil olmak üzere olaparib tedavi grupları sırasıyla 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 µM şeklindedir. Yapılan analizler neticesinde, kontrol grubuna kıyasla doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir. Nötral kırmızısı yöntemi MCF-7 hücrelerinde olaparib tedavisi IC₅₀ değeri 7,24 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.52). hMOB2 baskılandığı gruplarda dahil olmak üzere rucaparib tedavi grupları sırasıyla 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 µM şeklinde olup kontrol grubuna kıyasla doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Nötral kırmızısı yöntemi MCF-7 hücrelerinde rucaparib tedavisi IC₅₀ değeri 7,58 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.53). Son olarak veliparib

tedavi grupları sırasıyla 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 μM şeklindedir. Yapılan analizler neticesinde, kontrol grubuna kıyasla doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir. Nötral kırmızısı yöntemi MCF-7 hücrelerinde veliparib tedavisi IC_{50} değeri 28,19 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.54). Yang ve ark. (2018) ve Quinonero ve ark. (2022) yapılan çalışmalarda artan olaparib konsantrasyonlarının hücresel sitotoksitesi arttırdığı belirlenmiştir (Quinonero et al., 2022; Yang et al., 2018). Mateos-Pujante ve ark. (2022) yaptıkları çalışmada, insan keratinosit (HaCaT) hücre hatlarında nötral kırmızısı yöntemi kullanılarak hücrelerin rucaparib tedavisi sonucu IC_{50} değeri 11 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Rucaparib konsantrasyonunun hücrelerin sitotoksitesini arttırdığı saptanmıştır (Mateos-Pujante et al., 2022). Bir başka çalışmada ise Yin ve ark. (2022), yapılan nötral kırmızısı yöntemi ile prostat kanseri hücrelerinde artan dozlarda veliparib tedavisinin hücresel toksisiteyi artırarak DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Yin et al., 2022). Önceki yapılan çalışmalarda alınan sonuçlar yaptığımız çalışmaları desteklemektedir. Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler hMOB2 efektif ve defektif MCF-7 hücrelerinde PARP inhibitör tedavileri hücresel sitotoksitesi arttırdığı saptanmıştır.

Yara iyileşme yöntemi, hücre migrasyonunun *in vitro* şartlar altında analiz edildiği yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Açılan yara neticesinde hücreler üzerindeki migrasyon yeteneklerinin ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır. Bu teknik için özellikle MCF-7 hücrelerinin model hücre hattı olabileceği çeşitli çalışmalarca önerilmektedir (Wang et al., 2019; Xie et al., 2015). Transfekte MCF-7 hücrelerine yara açıldıktan sonra farklı dozlarda olaparib (1, 2,5 ve 5 μM), rucaparib (1, 2,5 ve 5 μM) ve veliparib (12,5, 25 ve 50 μM) tedaviler uygulanmış olup hücrelerin yara kapanma kinetiği analiz edilmiştir. Söz konusu analiz için hücreler tedavi uygulandıktan hemen sonra 0., 6. ve 24. saat yara iyileşme süreçleri mikroskop altında incelenmiş ve analiz için resimleri çekilmiştir. Her grup kendi içerisindeki 0. saat ile mukayese edilmektedir. hMOB2 efektif-defektif hücrelerin 24 saatlik olaparib tedavisi sonucu yara iyileşme yüzdeleri; kontrol grubu için %68, 1 μM olaparib grubu için %55, 2,5 μM olaparib için %46,8, 5 μM olaparib için %41,8, siMOB2 grubu için %51,7, si1 μM olaparib için %42,5, si2,5 μM olaparib için %36,5 ve son olarak si5 μM olaparib grubu için %22,5 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.55). Yapılan analiz neticesinde, olaparib artan dozlarda tedavilerin MCF-7 meme kanseri hücre migrasyonu üzerine anlamlı ve etkili bir engelleyici etkisinin olduğu tespit edilmiş olup söz konusu

inhibisyonun hMOB2 defektif hücre gruplarında daha etkili olduğu saptanmıştır. hMOB2 efektif-defektif hücrelerin 24 saatlik rucaparib tedavisi sonucu yara iyileşme yüzdeleri; kontrol grubu için %64,5, 1 μ M rucaparib grubu için %62,4, 2,5 μ M rucaparib için %50,5, 5 μ M rucaparib için %36,4, siMOB2 grubu için %33, si1 μ M rucaparib için %28,5, si2,5 μ M rucaparib için %23,5 ve son olarak si5 μ M rucaparib grubu için %13,6 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.56). Yapılan analiz neticesinde, rucaparib artan dozlarda tedavilerin MCF-7 meme kanseri hücre migrasyonu üzerine anlamlı ve etkili bir engelleyici etkisinin olduğu tespit edilmiş olup söz konusu inhibisyonun hMOB2 defektif hücre gruplarında daha etkili olduğu saptanmıştır. Son olarak hMOB2 efektif-defektif hücrelerin 24 saatlik veliparib tedavisi sonucu yara iyileşme yüzdeleri; kontrol grubu için %95,5, 12,5 μ M veliparib grubu için %84,4, 25 μ M veliparib için %21,5, 50 μ M rucaparib için %18,7, siMOB2 grubu için %87,5, si12,5 μ M veliparib için %25,6, si25 μ M veliparib için %17,3 ve son olarak si50 μ M veliparib grubu için %2,2 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.57). Yapılan analiz neticesinde, rucaparib artan dozlarda tedavilerin MCF-7 meme kanseri hücre migrasyonu üzerine anlamlı ve etkili bir engelleyici etkisinin olduğu tespit edilmiş olup söz konusu inhibisyonun hMOB2 defektif hücre gruplarında daha etkili olduğu saptanmıştır. Yusoh ve ark. (2020 ve 2023) yaptıkları çalışmada, sırasıyla meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-231 ve MCF-7, akciğer kanseri hücre hatlarından A549 ve H1975 kullanarak olaparib ile tedavi edilmiştir. Bahsi geçen hücreler, 5 μ M olaparib ile tedavi edilerek yara iyileşme yöntemi uygulanmış olup hücrelerin migrasyon yeteneklerinin baskılanarak yara iyileşme sürecinin yavaşlatıldığı tespit edilmiştir (Yusoh et al., 2020, 2023). Olaparib tedavisi ile yara iyileşme yönteminin uygulandığı bir başka çalışmada ise ağız kanseri hücre hatları (HSC-2, Ca9-22 ve SAS) kullanılmıştır. Nakamura ve ark. (2022) yapmış olduğu bu çalışmada, olaparib tedavisi sonucu ilgili hücrelerin migrasyonu üzerine anlamlı ve etkili bir engelleyici etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Nakamura et al., 2022). Park ve ark. (2019) ve Dai ve ark. (2023) yapmış oldukları çalışmalarda, sırasıyla keloid fibroblast hücreleri ve A549 akciğer kanser hücrelerinin rucaparib tedavisi sonucu yara iyileşme analizleri gerçekleştirilmiştir. Söz konusu analizlerde rucaparib tedavisinin hücre migrasyonunu önemli derecede engellediği saptanmıştır (Dai et al., 2023; Park et al., 2019). Yapılan tüm çalışmalar dikkate alındığında yaptığımız çalışmayı destekler nitelikte olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular, hMOB2 susturulması ve PARP inhibitör tedavilerinin MCF-7 meme kanseri hücre migrasyonunu önemli ölçüde engellediğini ortaya çıkarmıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Gelişen teknoloji ile birlikte kanser hastalarının genomik, proteomik ve epigenetik profillerinin çıkartılması tedavi noktasında biyobelirteç olarak gösterildiği bilinmektedir. Bireyselleştirilmiş kanser tedavisine yönelik çalışmalarda DNA hasar yanıt sistemindeki proteinlerin işlevlerinin tanımlanması, hücre döngüsü ve metabolizmasının işlevlerinin anlaşılması son derece önem arz etmektedir. Kanser hücrelerinin karmaşık yapıları ve sağlıklı hücrelerden ayırt edici özellikleri göz önüne alındığında, kanser tedavi stratejilerinin hayati önemi ortaya çıkmaktadır. Kanser tedavisine yönelik yapılan yeni yaklaşımlar bireyselleştirilmiş kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Söz konusu tedavi yaklaşımları neticesinde kanser hücreleri yüksek derecede hedeflenmekte olup konvansiyonel tedavilere göre daha az yan etkiye neden olarak başarı oranını arttırmaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerinin cevap vermediği hasta profillerinde, kişiye özel olarak geliştirilen küçük molekül inhibitörler veya antikörlerin klinikteki başarıları dikkat çekmektedir. Yumurtalık ve meme kanserleri başta olmak üzere çeşitli kanser hastalarının tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmakta olan PARP inhibitörleri, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının son yıllardaki en başarılı örneklerinden biri olmuştur. Ancak, her ne kadar gerçekleştirilen prelinik ve erken evre klinik çalışmalar başarılı sonuçlar sağlamış olsa da tedavi yanıtının kısa süreli olması ve kombine tedavilerin şiddetli toksisite profilleri uzun süreli tedavide başarıyı sınırlandıran sorunlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, daha başarılı hasta stratifikasyonu için tedavi yanıtının tahmin edilmesinde kullanılacak daha fazla prediktif biyobelirtecin tanımlanması ve karakterize edilmesine ihtiyaç vardır. Kanser hastalarına yönelik geliştirilen genetik, epigenetik ve proteomik tedavi stratejilerinin standart kanser tedavilerine kıyasla önemli bir başarı elde ettiği aynı zamanda hastaların bireyselleştirilmiş kanser tedavilerine vereceği yanıtın takip edilebilir olması klinik başarının artmasına neden olmaktadır.

Doktora tez çalışmamızda, hücre döngüsü, DNA hasar/tamir sistemi ve programlı hücre ölümündeki çeşitli moleküler mekanizmalarda rol oynayan genlerin ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile ortaya çıkarılarak hMOB2 proteini ile muhtemel sentetik letal etkileşim içerisinde olup olmadığı, DNA hasarı durumunda RAD51 ve ATM gibi DDR bileşenleriyle

birlikte hMOB2 proteininin kromatin üzerine lokalize olup olmadığı, *in silico* olarak tahmin edilen hMOB2 post-translasyonel modifikasyonlarının biyolojik öneminin olup olmadığı, hMOB2'nin meme kanseri hücrelerinin konvansiyonel ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına yanıtının olup olmadığı (PARP inhibitör tedavileri) ve son olarak MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hMOB2 anti-kanser aktivite durumunun biyolojik olarak öneminin olup olmadığı araştırılmıştır.

DNA hasar tamir sisteminde ve programlı hücre ölüm mekanizmalarında rol oynadığı bilinen 84 genin mRNA profilleri incelenmiş olup hMOB2 proteini ile muhtemel sentetik letal etkileşim içerisinde olduğu düşünülen 20 genin mRNA ekspresyonunun anlamlı bir şekilde değiştiği dikkat çekmektedir. hMOB2 proteini post-translasyonel modifikasyonlarının 53BP1 ve γ H2AX proteinleri ile ko-lokalize oldukları RAD51 ve ATM proteinleri ile doğrudan etkileşim içinde olmadığı saptanmıştır. Son olarak hMOB2'nin meme kanseri hücrelerinin konvansiyonel ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına olan yanıtındaki rolünün saptanması kapsamında hMOB2 ve PARP inhibitörlerinden olaparib, rucaparib ve veliparib kombinasyon tedavisinin meme kanseri hücre canlılığını doz bağımlı olarak azalttığı, tedavilerin hücrelerin koloni yapma yeteneklerini engellediği, artan PARP inhibisyon tedavilerinin hücrel migrasyonu baskıladığı, hücrelerin apoptosise sürüklendiği ve aynı zamanda hMOB2 defektif hücrelerde hücrel sitotoksitenin daha fazla olduğu saptanmıştır. Gelecekteki kapsamlı çalışmalar, söz konusu hücrel faktörler ile hMOB2 proteinin arasında ilişkinin aydınlatılmasını sağlayarak hMOB2 defektif dolayısıyla HR yetersiz kanser hücrelerinin spesifik ve selektif ölümünü sağlayacak bileşenlerin tanımlanmasını sağlayacaktır. Sonuç olarak elde ettiğimiz tüm bulgular, önemli bir DDR regülatörü olarak hMOB2 ekspresyonunun; PARP inhibitör tedavilerinin yanıtının tahmin edilmesinde kullanılabilir potansiyel bir prediktif biyobelirteç adayı olabileceğine dair hipotezimizi desteklemektedir.

KAYNAKLAR

Abida, W., Campbell, D., Patnaik, A., Sautois, B., Shapiro, J., Vogelzang, N. J., ... and Chowdhury, S. (2019). Preliminary results from the TRITON2 study of rucaparib in patients (pts) with DNA damage repair (DDR)-deficient metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC): Updated analyses. *Annals of Oncology*, 30, v327-v328.

Adams, J. M. and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 61–66.

Adams, J. M. and Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 27–36.

Al-Bedeary, S., Getta, H. A. and Al-Sharafi, D. (2020). The hallmarks of cancer and their therapeutic targeting in current use and clinical trials. *Iraqi Journal of Hematology*, 9(1), 1.

Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis, J., Raff, M. and Roberts, K. (2008). Molecular cell biology. *New York: Garland Science*.

Anderson, L., Henderson, C. and Adachi, Y. (2001). Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1719–1729.

Ashworth, A. and Lord, C. J. (2018). Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors?. *Nature reviews Clinical oncology*, 15(9), 564-576.

Ates, G., Vanhaecke, T., Rogiers, V. and Rodrigues, R. M. (2017). Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*, 19-26.

Ávila-Arroyo, S., Nuñez, G. S., García-Fernández, L. F. and Galmarini, C. M. (2015). Synergistic effect of trabectedin and olaparib combination regimen in breast cancer cell lines. *Journal of Breast Cancer*, 18(4), 329.

Bakkenist, C. J. and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499–506.

Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. (2007). DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*, 26(56), 7773–7779.

Baxter, P. A., Su, J. M., Onar-Thomas, A., Billups, C. A., Li, X. N., Poussaint, T. Y., ... and Fouladi, M. (2020). A phase I/II study of veliparib (ABT-888) with radiation and temozolomide in newly diagnosed diffuse pontine glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *Neuro-oncology*, 22(6), 875-885.

Bitler, B. G., Watson, Z. L., Wheeler, L. J. and Behbakht, K. (2017). PARP inhibitors: clinical utility and possibilities of overcoming resistance. *Gynecologic oncology*, 147(3), 695-704.

Bothos, J., Tuttle, R. L., Ottey, M., Luca, F. C. and Halazonetis, T. D. (2005). Human LATS1 is a mitotic exit network kinase. *Cancer research*, 65(15), 6568-6575.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I. and Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263.

Brines, M. and Cerami, A. (2012). The receptor that tames the innate immune response. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 18(1), 486–496.

Bruin, M. A. C., Sonke, G. S., Beijnen, J. H. and Huitema, A. D. R. (2022). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PARP inhibitors in oncology. *Clinical Pharmacokinetics*, 61(12), 1649–1675.

Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., ... and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913–917.

Buisson, R., Dion-Côté, A.-M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A. A. Z., ... and Masson, J.-Y. (2010). Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10), 1247–1254.

Bürkle, A., Diefenbach, J., Brabeck, C. and Beneke, S. (2005). Ageing and PARP. *Pharmacological research*, 52(1), 93-99.

Carlton, J. G., Jones, H. and Eggert, U. S. (2020). Membrane and organelle dynamics during cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(3), 151–166.

Caron, M.-C., Sharma, A. K., O'Sullivan, J., Myler, L. R., Ferreira, M. T., Rodrigue, A., ... and Langelier, M.-F. (2019). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nature Communications*, 10(1), 2954.

Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J.

and Łos, M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61, 43–58.

Chaitanya, G. V., Alexander, J. S. and Babu, P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 8, 1–11.

Chambliss, A. B. and Chan, D. W. (2016). Precision medicine: From pharmacogenomics to pharmacoproteomics. *Clinical Proteomics*, 13(1).

Chaplin, A. K., Hardwick, S. W., Stavridi, A. K., Buehl, C. J., Goff, N. J., Ropars, V., ... and Meek, K. (2021). Cryo-EM of NHEJ supercomplexes provides insights into DNA repair. *Molecular Cell*, 81(16), 3400–3409.

Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. and Boulton, S. J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 47(4), 497–510.

Chen, J. (2016). The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(3), a026104.

Cho, H., Kim, Y.-B., Park, W. and No, J. H. (2021). Enhanced efficacy of combined therapy with checkpoint kinase 1 inhibitor and rucaparib via regulation of rad51 expression in BRCA wild-type epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 53(3), 819–828.

Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2), 179–204.

Cleary, J. M., Aguirre, A. J., Shapiro, G. I. and D'Andrea, A. D. (2020). Biomarker-Guided Development of DNA Repair Inhibitors. *Molecular Cell*, 18(78), 1070–1085.

Cotta-Ramusino, C., McDonald, E. R., Hurov, K., Sowa, M. E., Harper, J. W. and Elledge, S. J. (2011). A DNA damage response screen identifies RHINO, a 9-1-1 and topBP1 interacting protein required for ATR signaling. *Science*, 332(6035), 1313–1317.

Crabtree, J. S. (2019). Pharmacogenomics. In *Clinical Precision Medicine: A Primer*.

Crews, K. R., Hicks, J. K., Pui, C. H., Relling, M. V. and Evans, W. E. (2012). Pharmacogenomics and individualized medicine: translating science into practice. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(4), 467–475.

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. and Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49–63.

D'Alessandro, A. and Zolla, L. (2010). Pharmacoproteomics: A chess game on a protein field. In *Drug Discovery Today*.

D'Andrea, A. D. (2018). Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA repair*, 71, 172-176.

Dai, Y., Hu, C., Zhou, H., Liu, W., Lai, W., Xu, R., ... and Zhang, R. (2023). Rucaparib inhibits lung adenocarcinoma cell proliferation and migration via the SHCBP1/CDK1 pathway. *The FEBS Journal*, 290(24), 5720–5743.

Dalton, S. (2015). Linking the cell cycle to cell fate decisions. *Trends in Cell Biology*, 25(10), 592–600.

Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116 (2), 205-219.

de Bono, J., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., ... and Hussain, M. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(22), 2091–2102.

Deans, A. J. and West, S. C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 11(7), 467–480.

Deckbar, D., Jeggo, P. A. and Löbrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(4), 271–283.

Densham, R. M., Garvin, A. J., Stone, H. R., Strachan, J., Baldock, R. A., Daza-Martin, M., ... and Morris, J. R. (2016). Human BRCA1–BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(7), 647–655.

Dréan, A., Lord, C. J. and Ashworth, A. (2016). PARP inhibitor combination therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 108, 73–85.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.

Erdogan, M. K., Gecibesler, I. H., Yapar, Y., Gundogdu, R., Kirici, M., Behcet, L. and Taslimi, P. (2021). Fatty acid composition, enzyme inhibitory effect, antioxidant and anticancer activity of extract from *Saponaria prostrata* WILLD. subsp. *anatolica* HEDGE. *Bioorganic Chemistry*, 113, 105032.

Ettl, J., Quek, R. G. W., Lee, K. H., Rugo, H. S., Hurvitz, S., Gonçalves, A., ... and Litton, J. K. (2018). Quality of life with talazoparib versus physician's choice of chemotherapy in patients with advanced breast cancer and germline BRCA1/2 mutation: patient-reported outcomes from the EMBRACA phase III trial. *Annals of oncology*, 29(9), 1939-1947.

Fan, T.-J., Han, L.-H., Cong, R.-S. and Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Johnson, D. A., Richardson, T. B., ... and Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917–921.

Fisher, A. E. O., Hochegger, H., Takeda, S. and Caldecott, K. W. (2007). Poly (ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly (ADP-ribose) glycohydrolase. *Molecular and Cellular Biology*.

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. and Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.

Fu, M., Hu, Y., Lan, T., Guan, K.-L., Luo, T. and Luo, M. (2022). The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 376.

García-Aranda, M., Pérez-Ruiz, E. and Redondo, M. (2018). Bcl-2 inhibition to overcome resistance to chemo-and immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3950.

Georgakilas, A. G., Martin, O. A. and Bonner, W. M. (2017). p21: a two-faced genome guardian. *Trends in Molecular Medicine*, 23(4), 310–319.

Giovannini, S., Weller, M. C., Repmann, S., Moch, H. and Jiricny, J. (2019). Synthetic lethality between BRCA1 deficiency and poly(ADP-ribose) polymerase inhibition is modulated by processing of endogenous oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 47(17), 9132–9143.

Golan, T., Hammel, P., Reni, M., Van Cutsem, E., Macarulla, T., Hall, M. J., ... and Kindler, H. L. (2019). Maintenance Olaparib for Germline BRCA -Mutated Metastatic Pancreatic Cancer . *New England Journal of Medicine*, 381(4), 317–327.

Goldstein, M. and Kastan, M. B. (2015). The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 129–143.

Gomez, V., Gundogdu, R., Gomez, M., Hoa, L., Panchal, N., O'Driscoll, M. and Hergovich, A. (2015). Regulation of DNA damage responses and cell cycle progression by hMOB2. *Cellular Signalling*, 27(2), 326–339.

González-Martín, A., Pothuri, B., Vergote, I., DePont Christensen, R., Graybill, W., Mirza, M. R., ... and Monk, B. J. (2019). Niraparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 381(25), 2391-2402.

Goodarzi, A. A. and Jeggo, P. A. (2013). The Repair and Signaling Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Advances in Genetics*, 82, 1–45.

Gündoğdu, R. ve Çelik, V. (2009). RNA interferans (RNAi). Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi, 25(1), 34-47.

Gundogdu, R., Erdogan, M. K., Ditsiou, A., Spanswick, V., Garcia-Gomez, J. J., Hartley, J. A., ... and Gomez, V. (2021). hMOB2 deficiency impairs homologous recombination-mediated DNA repair and sensitises cancer cells to PARP inhibitors. *Cellular Signalling*, 87.

Gundogdu, R. and Hergovich, A. (2016). The possible crosstalk of MOB2 with NDR1/2 kinases in cell cycle and DNA damage signaling. *Journal of Cell Signaling*, 1.

Gundogdu, R. and Hergovich, A. (2019). MOB (Mps one Binder) Proteins in the Hippo Pathway and Cancer. *Cells 2019, Vol. 8, Page 569*, 8(6), 569.

Gundogdu, R., Hergovich, A. and Gómez, V. (2021). Cell cycle control and DNA-damage signaling in mammals. *In Genome Stability* pp. 237-255.

Gupta, A., Hunt, C. R., Chakraborty, S., Pandita, R. K., Yordy, J., Ramnarain, D. B., ... and Pandita, T. K. (2014). Role of 53BP1 in the regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Radiation Research*, 181(1), 1–8.

Gupta, S., Silveira, D. A. and Mombach, J. C. M. (2018). Modeling the role of microRNA-449a in the regulation of the G2/M cell cycle checkpoint in prostate LNCaP cells under ionizing radiation. *PloS One*, 13(7), e0200768.

Han, T., Tong, J., Wang, M., Gan, Y., Gao, B., Chen, J., ... and Zhou, X. (2022). Olaparib induces RPL5/RPL11-dependent p53 activation via nucleolar stress. *Frontiers in Oncology*, 12, 821366.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.

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

Hansen, R. J., Ludeman, S. M., Paikoff, S. J., Pegg, A. E. and Dolan, M. E. (2007). Role of MGMT in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity in cells and animals. *DNA Repair*, 6(8), 1145–1154.

Hergovich, A., Bichsel, S. J. and Hemmings, B. A. (2005). Human NDR Kinases Are Rapidly Activated by MOB Proteins through Recruitment to the Plasma Membrane and Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(18), 8259–8272.

Hergovich, A., Kohler, R. S., Schmitz, D., Vichalkovski, A., Cornils, H. and Hemmings, B. A. (2009). The MST1 and hMOB1 Tumor Suppressors Control Human Centrosome Duplication by Regulating NDR Kinase Phosphorylation. *Current Biology*, 19(20), 1692–1702.

Hergovich, A., Lamla, S., Nigg, E. A. and Hemmings, B. A. (2007). Centrosome-Associated NDR Kinase Regulates Centrosome Duplication. *Molecular Cell*, 25(4), 625–634.

Hergovich, A., Stegert, M. R., Schmitz, D. and Hemmings, B. A. (2006). NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(4), 253–264.

Hess, S. (2013). The emerging field of chemo and pharmacoproteomics. *PROTEOMICS—Clinical Applications*, 7(1-2), 171–180.

Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485.

Höpfner, M., Nitsche, R., Rohr, A., Harms, D., Schubert, S. and Fölsch, U. R. (2001). *Yersinia enterocolitica* Infection with Multiple Liver Abscesses Uncovering a Primary Hemochromatosis. *Taylor & Francis*, 36(2), 220–224.

Hsu, H.-W., de Necochea-Campion, R., Williams, V., Duerksen-Hughes, P. J., Simental Jr, A. A., Ferris, R. L., ... and Mirshahidi, S. (2014). Linifanib (ABT-869), enhances cytotoxicity with poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, veliparib (ABT-888), in head and neck carcinoma cells. *Oral Oncology*, 50(7), 662–669.

Huang, A., Garraway, L. A., Ashworth, A. and Weber, B. (2020). Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(1), 23–38.

Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the

Drosophila Homolog of YAP. *Cell*, 122(3), 421-434.

Ihnen, M., Zu Eulenburg, C., Kolarova, T., Qi, J. W., Manivong, K., Chalukya, M., ... and Meuter, A. (2013). Therapeutic potential of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor rucaparib for the treatment of sporadic human ovarian cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(6), 1002–1015.

Itagaki, H., Hagino, S., Kato, S., Kobayashi, T. and Umeda, M. (1991). An in vitro alternative to the draize eye-irritation test: Evaluation of the crystal violet staining method. *Toxicology in Vitro*, 5(2), 139–143.

Jackson, S. P. and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078.

Jackson, S. P. and Helleday, T. (2016). Drugging DNA repair. *Science*, 352(6290), 1178–1179.

Jasin, M. and Rothstein, R. (2013). Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a012740–a012740.

Jeppesen, D. K., Bohr, V. A. and Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, 94(2), 166–200.

Jonsson, P., Bandlamudi, C., Cheng, M. L., Srinivasan, P., Chavan, S. S., Friedman, N. D., ... and Taylor, B. S. (2019). Tumour lineage shapes BRCA-mediated phenotypes. *Nature*, 571(7766), 576-579.

Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M. and Bryant, P. J. (1995). The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & development*, 9(5), 534-546.

Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., Verstreken, P., Robin Hiesinger, P., Robin, P., ... and Halder, G. (2002). Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in Drosophila. *Biotechnology Commons*, 225.

Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R. K., Audeh, M. W., Friedlander, M., Balmaña, J., ... and Domchek, S. M. (2015). Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *Journal of clinical oncology*, 33(3), 244-250.

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257.

- Keung, M. Y., Wu, Y., Badar, F. and Vadgama, J. V. (2020). Response of breast cancer cells to PARP inhibitors is independent of BRCA status. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 940.
- Khanna, K. K. and Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247–254.
- Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galán, J. E., Janeway, C. A., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110(2), 191–202.
- Kohler, R. S., Schmitz, D., Cornils, H., Hemmings, B. A. and Hergovich, A. (2010). Differential NDR/LATS Interactions with the Human MOB Family Reveal a Negative Role for Human MOB2 in the Regulation of Human NDR Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 30(18), 4507–4520.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. and Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, 40(13), 5795–5818.
- Kulaberoglu, Y. and Hergovich, A. (2023). *Chapter 15 - The role of p53 / p21 / p16 in DNA damage signaling and DNA repair*. 26, 1–2.
- Kumar, N., Raja, S. and Van Houten, B. (2020). The involvement of nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 48(20), 11227–11243.
- Kuo, L. J. and Yang, L.-X. (2008). γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22(3), 305–309.
- Lans, H., Marteiijn, J. A. and Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics & Chromatin*, 5, 1–14.
- Lee, J.-H. and Paull, T. T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*, 304(5667), 93–96.
- Lee, T.-H. and Kang, T.-H. (2019). DNA oxidation and excision repair pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6092.
- Levine, B. and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27–42.
- Li, H., Peng, X., Wang, Y., Cao, S., Xiong, L., Fan, J., ... and Mao, H. (2016). Atg5-mediated autophagy deficiency in proximal tubules promotes cell cycle G2/M arrest and

renal fibrosis. *Autophagy*, 12(9), 1472–1486.

Li, L., Xiang, Y., Yang, G., Zhang, X., Yang, X., Yang, S. and Huang, J. (2021). Pharmacokinetic effects of proton pump inhibitors on the novel PARP inhibitor fluzoparib: a single-arm, fixed-sequence trial in male healthy volunteers. *Investigational New Drugs*, 39, 796–802.

Li, Y., Huang, J., Zeng, B., Yang, D., Sun, J., Yin, X., ... and Xiang, T. (2018). PSMD2 regulates breast cancer cell proliferation and cell cycle progression by modulating p21 and p27 proteasomal degradation. *Cancer Letters*, 430, 109–122.

Liang, C. C., Park, A. Y. and Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329–333.

Lindahl, T. and Barnes, D. E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 65, 127–133.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402–408.

Locatelli, F., Lucarelli, B. and Merli, P. (2014). Current and future approaches to treat graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 15(1), 23–36.

Lord, C. J., Tutt, A. N. J. and Ashworth, A. (2015). Synthetic lethality and cancer therapy: Lessons learned from the development of PARP inhibitors. *Annual Review of Medicine*, 66, 455–470.

Luo, D., Yu, C., Yu, J., Su, C., Li, S. and Liang, P. (2022). p53-mediated G1 arrest requires the induction of both p21 and Killin in human colon cancer cells. *Cell Cycle*, 21(2), 140–151.

Ma, X., Dang, C., Min, W., Diao, Y., Hui, W., Wang, X., Dai, Z., Wang, X. and Kang, H. (2019). Downregulation of APE1 potentiates breast cancer cells to olaparib by inhibiting PARP-1 expression. *Breast Cancer Research and Treatment*, 176, 109–117.

Majtnerová, P. and Roušar, T. (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 1469–1478.

Mansilla, S. F., De La Vega, M. B., Calzetta, N. L., Siri, S. O. and Gottifredi, V. (2020). CDK-independent and PCNA-dependent functions of p21 in DNA replication. *Genes*, 11(6), 593.

Mao, B., Zhang, Z. and Wang, G. (2015). BTG2: a rising star of tumor suppressors. *International Journal of Oncology*, 46(2), 459–464.

Marchini, S., Ciro', M. and Broggin, M. (1999). p53-Independent caspase-mediated apoptosis in human leukaemic cells is induced by a DNA minor groove binder with antineoplastic activity. *Apoptosis*, 4, 39–45.

Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. and Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 81–94.

Markham, A. (2021). Pamiparib: first approval. *Drugs*, 81(11), 1343–1348.

Mashimo, M., Onishi, M., Uno, A., Tanimichi, A., Nobeyama, A., Mori, M., ... and Kato, J. (2021). The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 296.

Mateos-Pujante, A., Jiménez, M. C. and Andreu, I. (2022). Evaluation of phototoxicity induced by the anticancer drug rucaparib. *Scientific Reports*, 12(1), 3434.

Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald III, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., ... and Lerenthal, Y. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316(5828), 1160–1166.

Matthew, J., Vishwakarma, V., Le, T. P., Agsunod, R. A. and Chung, S. (2024). Coordination of cell cycle and morphogenesis during organ formation. *Elife*, 13, e95830.
Medicine, J. H.-N. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *Mass Medical Soc*, 361(15), 1475–1485.

Meng, Z., Moroishi, T. and Guan, K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & development*, 30(1), 1-17.

Meyer, F., Becker, S., Classen, S., Parpys, A. C., Mansour, W. Y., Riepen, B., ... and Wikman, H. (2020). Prevention of DNA replication stress by CHK1 leads to chemoresistance despite a DNA repair defect in homologous recombination in breast cancer. *Cells*, 9(1), 238.

Micheau, O. and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181–190.

Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Mohammadzadeh, A., Yousefi, B., Mihanfar, A., Karimian, A. and Majidinia, M. (2019). 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer. *DNA Repair*, 73, 110–119.

Mirza, M. R., Monk, B. J., Herrstedt, J., Oza, A. M., Mahner, S., Redondo, A., ... and Matulonis, U. A. (2016). Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(22), 2154-2164.

Mo, J. S. (2017). The role of extracellular biophysical cues in modulating the Hippo-YAP pathway. *BMB reports*, 50(2), 71.

Moore, K., Colombo, N., Scambia, G., Kim, B.-G., Oaknin, A., Friedlander, M., ... and DiSilvestro, P. (2018). Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(26), 2495–2505.

Moore, K. N., Secord, A. A., Geller, M. A., Miller, D. S., Cloven, N., Fleming, G. F., ... and Monk, B. J. (2019). Niraparib monotherapy for late-line treatment of ovarian cancer (QUADRA): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 20(5), 636-648.

Morita, R., Nakane, S., Shimada, A., Inoue, M., Iino, H., Wakamatsu, T., ... and Kuramitsu, S. (2010). Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *Journal of nucleic acids*, 2010(1), 179594.

Murai, J., Huang, S. Y. N., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshov, J. H., ... and Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer research*, 72(21), 5588-5599.

Nakamura, N., Fujihara, H., Kawaguchi, K., Yamada, H., Nakayama, R., Yasukawa, M., ... and Masutani, M. (2022). Possible action of olaparib for preventing invasion of oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2527.

Nandal, S. and Burt, T. (2017). Integrating pharmacoproteomics into early-phase clinical development: state-of-the-art, challenges, and recommendations. *International journal of molecular sciences*, 18(2), 448.

Nandal, V. and Nair, P. R. (2017). Predictive modeling of ion migration induced degradation in perovskite solar cells. *ACS nano*, 11(11), 11505-11512.

Nickoloff, J. A., Jones, D., Lee, S. H., Williamson, E. A. and Hromas, R. (2017). Drugging the Cancers Addicted to DNA Repair. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(11).
O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, 60(4), 547–560.

Obenauer, J. C., Cantley, L. C. and Yaffe, M. B. (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3635–3641.

Ohkoshi, S., Yano, M. and Matsuda, Y. (2015). Oncogenic role of p21 in hepatocarcinogenesis suggests a new treatment strategy. *World Journal of Gastroenterology*, 21(42), 12150.

Oza, A. M., Tinker, A. V., Oaknin, A., Shapira-Frommer, R., McNeish, I. A., Swisher, E. M., ... and Kristeleit, R. S. (2017). Antitumor activity and safety of the PARP inhibitor rucaparib in patients with high-grade ovarian carcinoma and a germline or somatic BRCA1 or BRCA2 mutation: Integrated analysis of data from Study 10 and ARIEL2. *Gynecologic oncology*, 147(2), 267-275.

Panier, S. and Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 7–18.

Park, T. H., Kim, C. W., Choi, J. S., Park, Y. J., Chong, Y., Park, M. J. and Cho, Y. (2019). PARP1 inhibition as a novel therapeutic target for keloid disease. *Advances in Wound Care*, 8(5), 186–194.

Parker, C., Chambers, A. C., Flanagan, D. J., Ho, J. W. Y., Collard, T. J., Ngo, G., ... and Sansom, O. J. (2022). BCL-3 loss sensitises colorectal cancer cells to DNA damage by targeting homologous recombination. *DNA Repair*, 115, 103331.

Patterson-Fortin, J., Bose, A., Tsai, W.-C., Grochala, C., Nguyen, H., Zhou, J., ... and McQueen, K. (2022). Targeting DNA repair with combined inhibition of NHEJ and MMEJ induces synthetic lethality in TP53-mutant cancers. *Cancer Research*, 82(20), 3815–3829.

Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, 10(15), 886–895.

Pettitt, S. J., Krastev, D. B., Brandsma, I., Dréan, A., Song, F., Aleksandrov, R., ... and Lord, C. J. (2018). Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nature Communications*, 9(1), 1849.

Pierce, A., McGowan, P. M., Cotter, M., Mullooly, M., O'Donovan, N., Rani, S., O'Driscoll, L., Crown, J. and Duffy, M. J. (2013). Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines. *Cancer Biology & Therapy*, 14(6), 537–545.

Pilié, P. G., Gay, C. M., Byers, L. A., O'Connor, M. J. and Yap, T. A. (2019). PARP inhibitors: Extending benefit beyond BRCA-mutant cancers. *Clinical Cancer Research*, 25(13), 3759–3771.

Quinonero, F., Mesas, C., Munoz-Gamez, J. A., Jimenez-Luna, C., Perazzoli, G., Prados, J., ... and Ortiz, R. (2022). PARP1 inhibition by Olaparib reduces the lethality of pancreatic cancer cells and increases their sensitivity to Gemcitabine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155, 113669.

Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T. and Chen, J. (2001). Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage–signaling pathways. *The Journal of Cell Biology*, 153(3), 613–620.

Richie, C. T., Peterson, C., Lu, T., Hittelman, W. N., Carpenter, P. B. and Legerski, R. J. (2002). hSnm1 colocalizes and physically associates with 53BP1 before and after DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*.

Robson, M. E., Tung, N., Conte, P., Im, S. A., Senkus, E., Xu, B., ... and Domchek, S. M. (2019). OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician’s choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 30(4), 558–566.

Roden, D. M., McLeod, H. L., Relling, M. V., Williams, M. S., Mensah, G. A., Peterson, J. F. and Van Driest, S. L. (2019). *Pharmacogenomics In The Lancet*, 394.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K. and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39–85.

Savas, P., Teo, Z. L., Lefevre, C., Flensburg, C., Caramia, F., Alsop, K., ... and Silva, M. J. (2016). The subclonal architecture of metastatic breast cancer: results from a prospective community-based rapid autopsy program “CASCADE”. *PLoS Medicine*, 13(12), e1002204.

Shamloo, B. and Usluer, S. (2019). p21 in cancer research. *Cancers*, 11(8), 1178.

Sherr, C. J. and Bartek, J. (2017). Cell cycle–targeted cancer therapies. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1), 41–57.

Simhadri, S., Vincelli, G., Huo, Y., Misenko, S., Foo, T. K., Ahlskog, J., ... and Bunting, S. F. (2019). PALB2 connects BRCA1 and BRCA2 in the G2/M checkpoint response. *Oncogene*, 38(10), 1585–1596.

Slupphaug, G., Kavli, B., and Krokan, H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1–2), 231–251.

Sonnenblick, A., De Azambuja, E., Azim Jr, H. A. and Piccart, M. (2015). An update on

PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. *Nature reviews Clinical oncology*, 12(1), 27-41.

Sun, P., Wu, H., Huang, J., Xu, Y., Yang, F., Zhang, Q. and Xu, X. (2018). Porcine epidemic diarrhea virus through p53-dependent pathway causes cell cycle arrest in the G0/G1 phase. *Virus Research*, 253, 1–11.

Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.-G., Geley, S., ... and Kroemer, G. (1997). The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95-and ceramide-induced apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(1), 25–37.

Syed, A. and Tainer, J. A. (2018). The MRE11–RAD50–NBS1 complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 263–294.

Tang, S., Shen, Y., Wei, X., Shen, Z., Lu, W. and Xu, J. (2022). Olaparib synergizes with arsenic trioxide by promoting apoptosis and ferroptosis in platinum-resistant ovarian cancer. *Cell Death & Disease*, 13(9), 826.

Tashiro, S., Walter, J., Shinohara, A., Kamada, N. and Cremer, T. (2000). Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *The Journal of Cell Biology*, 150(2), 283–292.

Tisi, R., Vertemara, J., Zampella, G. and Longhese, M. P. (2020). Functional and structural insights into the MRX/MRN complex, a key player in recognition and repair of DNA double-strand breaks. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1137–1152.

Toy, Y., Gundogdu, R., Sever, A. ve Erdogan, M. K. (2022). Defektif Homolog Rekombinasyon DNA Tamiri ve PARP İnhibisyonu Arasındaki Sentetik Letal Etkileşim. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 12(4), 2459–2475.

Tsimberidou, A. M., Fountzilas, E., Nikanjam, M. and Kurzrock, R. (2020). Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer treatment reviews*, 86, 102019.

Tung, N. M. and Garber, J. E. (2018). BRCA 1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. *British journal of cancer*, 119(2), 141-152.

Tzifi, F., Economopoulou, C., Gourgiotis, D., Ardavanis, A., Papageorgiou, S. and Scorilas, A. (2012). The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Advances in Hematology*, 2012.

Ullah, A., Prottoy, N. I., Araf, Y., Hossain, S., Sarkar, B. and Saha, A. (2019). Molecular docking and pharmacological property analysis of phytochemicals from *Clitoria ternatea* as potent inhibitors of cell cycle checkpoint proteins in the cyclin/CDK pathway in cancer cells. *Computational Molecular Bioscience*, 9(3), 81–94.

Vilenchik, M. M. and Knudson, A. G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12871–12876.

Vishwanath, D., Girimanchanaika, S. S., Dukanya, D., Rangappa, S., Yang, J.-R., Pandey, V., ... and Basappa, B. (2022). Design and activity of novel oxadiazole based compounds that target poly (ADP-ribose) polymerase. *Molecules*, 27(3), 703.

Vogler, M. (2012). BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 67–74.

Wahl, G. M., Linke, S. P., Paulson, T. G. and Huang, L. C. (1997). Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surveys*, 29, 183–219.

Wang, X., Decker, C. C., Zechner, L., Krstin, S. and Wink, M. (2019). In vitro wound healing of tumor cells: inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 20, 1–12.

Ward, I. M., Minn, K., Van Deursen, J. and Chen, J. (2003). p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Molecular and Cellular Biology*.

Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323–330.

Weinstein, N., Ortiz-Gutiérrez, E., Muñoz, S., Rosenblueth, D. A., Álvarez-Buylla, E. R. and Mendoza, L. (2015). A model of the regulatory network involved in the control of the cell cycle and cell differentiation in the *Caenorhabditis elegans* vulva. *BMC Bioinformatics*, 16, 1–21.

Wenzel, E. S. and Singh, A. T. K. (2018). Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *In Vivo*, 32(1), 1–5.

Wheatley, S. P. and Altieri, D. C. (2019). Survivin at a glance. *Journal of Cell Science*, 132(7), jcs223826.

Wheeler, H. E., Maitland, M. L., Dolan, M. E., Cox, N. J. and Ratain, M. J. (2013). Cancer pharmacogenomics: strategies and challenges. *Nature Reviews Genetics*, 14(1), 23–34.

Whirl-Carrillo, M., McDonagh, E. M., Hebert, J. M., Gong, L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., ... and Klein, T. E. (2012). Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(4), 414-417.

Wilson, A., Menon, V., Khan, Z., Alam, A., Litovchick, L. and Yakovlev, V. (2019). Nitric oxide-donor/PARP-inhibitor combination: A new approach for sensitization to ionizing radiation. *Redox Biology*, 24, 101-169.

Woodhouse, B. C., and Dianov, G. L. (2008). Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair*, 7(7), 1077–1086.

Xie, M., Vesuna, F., Botlagunta, M., Bol, G. M., Irving, A., Bergman, Y., ... and Raman, V. (2015). NZ51, a ring-expanded nucleoside analog, inhibits motility and viability of breast cancer cells by targeting the RNA helicase DDX3. *Oncotarget*, 6(30), 29901.

Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R. A. and Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase. *Development*, 121(4), 1053-1063.

Yang, L., Yang, G., Ding, Y., Huang, Y., Liu, S., Zhou, L., ... and Hu, G. (2018). Combined treatment with PI3K inhibitor BKM120 and PARP inhibitor olaparib is effective in inhibiting the gastric cancer cells with ARID1A deficiency. *Oncology Reports*, 40(1), 479–487.

Yata, K., Lloyd, J., Maslen, S., Bleuyard, J.-Y., Skehel, M., Smerdon, S. J. and Esashi, F. (2012). Plk1 and CK2 act in concert to regulate Rad51 during DNA double strand break repair. *Molecular Cell*, 45(3), 371–383.

Yin, H., Qu, J., Peng, Q., and Gan, R. (2019). Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Medical Microbiology and Immunology*, 208, 573–583.

Yin, L., Liu, Y., Peng, Y., Peng, Y., Yu, X., Gao, Y., ... and He, L. (2022). Correction to: PARP inhibitor veliparib and HDAC inhibitor SAHA synergistically co-target the UHRF1/. BRCA1 DNA damage repair complex in prostate cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1), 72.

Yu, F.X. and Guan, K.L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & Development*, 27(4), 355–371.

Yu, F. X., Zhao, B. and Guan, K. L. (2015). Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. *Cell*, 163(4), 811-828.

Yu, L., Zhu, G., Zhang, Z., Yu, Y., Zeng, L., Xu, Z., ... and Pathak, J. L. (2023). Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and

therapeutic application potentials. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 218.

Yuniati, L., Scheijen, B., van der Meer, L. T., and van Leeuwen, F. N. (2019). Tumor suppressors BTG1 and BTG2: Beyond growth control. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5379–5389.

Yusoh, N. A., Chia, S. L., Saad, N., Ahmad, H., and Gill, M. R. (2023). Synergy of ruthenium metallo-intercalator, [Ru (dppz) 2 (PIP)] 2+, with PARP inhibitor Olaparib in non-small cell lung cancer cells. *Scientific Reports*, 13(1), 1456.

Yusoh, N. A., Leong, S. W., Chia, S. L., Harun, S. N., Rahman, M. B. A., Vallis, K. A., ... and Ahmad, H. (2020). Metallointercalator [Ru (dppz) 2 (PIP)] 2+ renders BRCA wild-type triple-negative breast cancer cells hypersensitive to PARP inhibition. *ACS Chemical Biology*, 15(2), 378–387.

Zhan, J., Easton, J. B., Huang, S., Mishra, A., Xiao, L., Lacy, E. R., ... and Kriwacki, R. W. (2007). Negative regulation of ASK1 by p21Cip1 involves a small domain that includes Serine 98 that is phosphorylated by ASK1 in vivo. *Molecular and Cellular Biology*.

Zhang, S., Peng, X., Li, X., Liu, H., Zhao, B., Elkabets, M., ... and Liu, Y. (2021). BKM120 sensitizes glioblastoma to the PARP inhibitor rucaparib by suppressing homologous recombination repair. *Cell Death & Disease*, 12(6), 546.