



**CRİSPR/CAS9 İLE FOXA1 GENİ KNOCK-OUT EDİLEN PROSTAT
KANSERİ HÜCRELERİNDE ANTİ-KANSEROJEN AJANLARIN
PI3K/AKT/MTOR SİNYAL YOLAĞINA ETKİLERİ**

Gülşah ALBAYRAK

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2017

Gülşah ALBAYRAK tarafından hazırlanan Crispr/Cas9 İle Foxa1 Geni Knock-Out Edilen Prostat Kanseri Hücrelerinde Anti-Kanserojen Ajanların PI3K/AKT/MTOR Sinyal Yolağına Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç.Dr.Ece KONAÇ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

.....

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS / DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gülşah ALBAYRAK

10/01/2017

CRİSPR/CAS9 İLE FOXA1 GENİ KNOCK-OUT EDİLEN PROSTAT KANSERİ
HÜCRELERİNDE ANTİ-KANSEROJEN AJANLARIN PI3K/AKT/MTOR SİNYAL
YOLAĞINA ETKİLERİ

Doktora Tezi

Gülşah ALBAYRAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2017

ÖZET

Prostat kanseri, akciğer kanserinin ardından erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür. Tedavide ilaca yönelik yeni hedeflerin belirlenmesi ile prostat kanserinin tedavisindeki başarı oranının artışı sağlanabilecektir. Metformin, FDA onaylı, kemoterapi ilaçlarına kıyasla ucuz, antikanser etkili anti-diyabetik bir ilaçtır. Memantin ise Alzheimer'ın tedavisinde kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır. Kanser tedavisinde tümör hücre metabolizmasından Glukoz ve Glutamin metabolizması hedeflemek için Metformin (IC50:2,5mM) ve Memantin (IC50:0,25mM) uygulanan androjene duyarlı LnCaP hücreleri prostat kanseri patogeneğinde rol oynayan PI3K/AKT/mTOR yolağında önemli hücresel süreçlerde görevli genlerin(CASP-3, BCL-2, BAX, Survivin, GSK-3, CCND1, c-MYC, B-Catenin, CDK4, HIF1A, VEGF-A, Fibronektin, İntegrin ve GAPDH) protein ekspresyonlarına olan etkileri western blotlama ile incelenmiş olup, hastalığın tedavisinde kullanılabilecek yeni, ilaç uygulanabilir hedeflerin belirlenmesi üzerine çalışılmıştır. Ayrıca prostat kanseri moleküler alt tiplerinden önemli bir kategoriye oluşturan FOXA1 geninin fonksiyonunu anlamaya yönelik olarak, bu gen etkili bir gen susturma yöntemi olan Crispr/Cas9 sistemi kullanılarak inaktif hale getirilmiştir. Çalışmamızda Memantin'in Bax-aracılı apoptozu indükleyerek (0,25mM) anti-neoplastik aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. FOXA-1 geninin knock-out edilmesi ile hücre döngüsünün kontrolünde görevli CCND1 protein ekspresyonunda azalma görülmüştür. FOXA1 ve CCND1 arasındaki bu etkileşim nedeniyle FOXA1'in prostat kanseri tedavisinde hedef bir gen olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Pre-klinik sonuçlarımız Memantin'in "yeniden konumlandırılmış" bir ilaç olarak kanser tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir. Kanser tedavisinde glukoz metabolizmasının yanı sıra glutamin metabolizmasının hedeflenmesi de potansiyel bir tedavi yaklaşımı olarak ön plana çıkmaktadır.

Bilim Kodu : 1055.1

Anahtar Kelimeler : Crispr/Cas9, Metformin, Memantin, Prostat kanseri

Sayfa Adedi : 77

Danışman : Doç.Dr.Ece KONAÇ

EFFECTS OF ANTICANCER AGENTS IN PI3K/AKT/MTOR SIGNALLING
PATHWAY ON PROSTATE CANCER CELLS THAT FOXA1 GENE KNOCKED OUT
VIA CRISPR/CAS9

Ph. D. Thesis

Gülşah ALBAYRAK

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

February 2017

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common cancer type after lung cancer among men. Increased success rate in prostate cancer treatment can be achieved by identifying new druggable targets. Metformin is an FDA approved anti-diabetic drug cheaper than other chemotherapeutic agents which was shown to have anti-cancer effects. Memantine is an FDA approved Alzheimer's drug. In order to target glucose and glutamine metabolism we applied Metformin (IC50:2,5mM) and Memantine (IC50:0,25mM) on androgen-dependent LNCaP prostate cancer cells. Then we investigated the protein expression levels of genes(CASP-3, BCL-2, BAX, Survivin, GSK-3, CCND1, c-MYC, B-Catenin, CDK4, HIF1A, VEGF-A, Fibronectin, Integrin ve GAPDH) that are involved in PI3K/AKT/mTOR signalling pathway which has role in prostate cancer pathogenicity. The aim of this study is to find new, druggable targets in prostate cancer treatment. Beyond that, FOXA1 gene which constitutes an important category of prostate cancer molecular sub-types was knocked-out via an efficient gene silencing method Crispr/Cas9 in order to understand the gene's function. We identified that Memantine exerts anti-neoplastic activity (0,25mM) by triggering Bax-dependent pathway of apoptosis. Cell cycle regulator CCND1 protein expression levels were decreased in FOXA1 knocked-out cells. That's why FOXA1 might be projected as a target molecule in prostate cancer treatment. Our pre-clinic results indicate that Memantine might be used as a new repositioned drug in cancer treatment. Beyond targeting glucose metabolism, glutamine metabolism also holds great promise for a potential treatment option.

Science Code : 1055.1

Key Words : Crispr/Cas9, Metformin, Memantine, Prostate cancer

Page Number : 77

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Ece KONAÇ

TEŞEKKÜR

Doktora; oldukça uzun ve yorucu bir yolculuk, ODTÜ’de başlayıp Gazi Üniversitesinde noktaladığım doktora eğitimimde bana bağımsız araştırma yapma yetisi kazandıran, yurtdışına gitmemde beni hep destekleyen, beni doktora sonrası akademik hayata hazırlayan, her konuda yardımını hiç esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Ece KONAÇ’a çok teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitemde yer alan Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ’ye ve Prof. Dr. Cenk Y. BİLEN’e tezimdaki katkıları nedeniyle teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince beni hep destekleyen Tıbbi Biyoloji AD.’deki asistan arkadaşlarıma ayrı ayrı çok teşekkür ederim. İyi ki varsınız, ileride birlikte nice çalışmalar yapmak dileğiyle..

Deneysel aşamalarda takıldığım noktalarda ve manevi olarak desteklerini hep hissettiğim sevgili arkadaşlarım, Yrd.Doç.Dr.Nuray VAROL, Yrd.Doç.Dr. Gamze TURNA, Yrd.Doç. Dr. Şerif ŞENTÜRK ve Arş.Gör. Adnan YARAMIŞ’a ne kadar teşekkür etsem az kalır.

Crispr tekniğini öğrenmemdeki katkıları nedeniyle Prof. Dr. Nick HASTIE, Derya ÖZDEMİR ve Anagha KRISHNA’ya ve gerek bu tekniği tezimde kullanmamda verdiği ilham, gerek pek çok şeyi birlikte tartışıp öğrendiğim canım arkadaşım Rıdvan Arda DEMİRCİ’ye çok teşekkür ederim.

Tezim süresince aldığım TÜBİTAK 2211 C-Öncelikli alanlar tez bursu için TÜBİTAK’a ve University of Edinburgh’da yaptığım araştırmada beni destekleyen Avrupa Birliği Jean MONNET burs programına teşekkürü borç bilirim.

Son olarak da en büyük teşekkürü beni her zaman koşulsuz bir şekilde maddi ve manevi olarak destekleyen sevgili aileme etmek istiyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.2. Prostat Kanseri Patogeneğinde PI3K/AKT/mTOR Yolağı.....	4
2.3. İlaç Yeniden Konumlandırma.....	6
2.4. Kanser Tedavisinde Hücre Metabolizmasının Hedeflenmesi ve Warburg Etkisi.....	9
2.5. Kanser Tedavisinde Mitokondrilerin Hedeflenmesi	11
2.6. Genom Düzenleme:Crispr/Cas9	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Kullanılan Cihazlar	17
3.2. Kullanılan Kimyasallar	17
3.3. Kullanılan Kitler	19
3.4. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı.....	19
3.5. Kullanılan Yöntemler	24

	Sayfa
3.5.1. Hücre kültürü.....	24
3.1.2. Hücelere ilaç uygulaması ve hücre canlılığının belirlenmesi	26
3.5.3. Etkin ilaç dozu verilen hücrelerden protein izolasyonu	27
3.5.4. BCA kiti ile protein miktar tayini	27
3.5.5. Western Blot yöntemi ile protein düzeylerinin belirlenmesi.....	27
3.5.6. Agaroz Jel Elektroforezi ile plazmid DNA'sının kontrolü/Plazmid DNA'sının %1'lik jele yüklenmesi.....	28
3.5.7. Plazmid DNA'sının kontrolü.....	28
3.5.8. Crispr ile FOXA1 geninin knock-out edilmesi.....	28
3.5.9. Plazmidin LB Broth'da çoğaltılması	30
3.5.10. Overnight sıvı kültürü yapılan plazmid inokülasyonu	30
3.5.11. Plazmid DNA'sının İzolasyonu.....	31
3.5.12. Oligo-gRNA design.....	33
3.5.13. CRISPR/Cas9 aşamaları.....	36
3.5.14. LNCaP Hücre hattı transfeksiyonu.....	37
3.5.15. Limitleyici dilüsyonla monoklonal hücre popülasyonunun izolasyonu.....	38
3.5.16. Dot Blotlama	39
4. BULGULAR	41
4.1. MTT Sonuçlarının değerlendirilmesi	41
4.1.1. Etkin metformin dozunun Belirlenmesi.....	41
4.1.2. Etkin memantin dozunun Belirlenmesi	42
4.2. Plazmid'in Agaroz Jel Elektroforezi ile Konfirmasyonu	43
4.3. Transformasyon Sonrası Overnight Kültürü Yapılan LB-Ampisilin Plate.....	44

Sayfa

4.4. Dot Blot ve Western Blot ile Limitleyici Dilisyon Sonrası FOXA-1 Knock-Out Hücre Klonunun Seçilmesi.....	44
4.5. Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	45
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	77



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. PX330 vektör bilgileri.....	32
Çizelge 3.2. PX330 Restriksiyon enzimi ile klonlama bilgileri.....	32
Çizelge 3.3. sgRNA design’ında kullanılan araçlar ve internet siteleri.....	34
Çizelge 3.4. PCR’da kullanılan tepkime bileşenleri.....	36
Çizelge 3.5. Annealing PCR koşulları.....	36
Çizelge 3.6. Plasmid Safe DNA Uygulamasında kullanılan bileşenler.....	36
Çizelge 3.7. Plasmid Safe Uygulamasındaki Reaksiyon koşulları.....	37

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. FOXA1'in protein-protein etkileşim ağı	4
Şekil 2.2. Prostat kanseri patogenezindeki sinyal yolları.....	5
Şekil 2.3. Geleneksel İlaç Keşif Çalışmaları-İlaç Yeniden Konumlandırma Zaman Çizelgesi	7
Şekil 2.4. Crispr ile oluşan Çift Zincir Kırıklarının Tamir Mekanizmaları	15
Şekil 3.1. PX330 Plazmid kesim bölgesi	32
Şekil 3.2. PX330 Genom Haritası.....	33
Şekil 3.3. Oligo g-RNA dizileri	35
Şekil 3.4. FOXA1 geninin 1.eksonundan gRNA design edilen ilgili gen bölgesi.....	35
Şekil 3.5. Knock-out hatların protein dot-blot ile identifikasyonu	39
Şekil 4.1. LNCaP hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 2,5 – 15 mM konsantrasyon Aralığında Metformin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları	42
Şekil 4.2. LNCaP hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 0,25-5 mM konsantrasyon aralığında Memantin'in 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı.....	43
Şekil 5.1. FOXA1 proteininin ekspresyonu değişen diğer proteinlerle olan etkileşim haritası (String: Protein-Protein etkileşim veritabanı).....	66

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Plazmid DNA'sının %1'lik agaroz jelde yürütülmesi.....	46
Resim 4.2. 80-100 µl transformasyon ürünü içeren LB-Ampisilin platelerin overnight inkübasyon sonrası tek koloni oluşturmaı	46
Resim 4.3. FOXA1 knock-out yapılmasının dot blot ile protein düzeyinde konfirmasyonu	46
Resim 4.4. FOXA1 knock-out yapılmasının western blot ile protein düzeyinde konfirmasyonu	46
Resim 4.5. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte CASP3 protein ifadenmesine etkisi	46
Resim 4.6. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte CASP9 protein ifadenmesine etkisi	47
Resim 4.7. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte BCL-2 protein ifadenmesine etkisi	47
Resim 4.8. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte BAX protein ifadenmesine etkisi.....	48
Resim 4.9. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte SURVIVIN protein ifadenmesine etkisi	48
Resim 4.10. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte B-Catenin protein ifadenmesine etkisi	49
Resim 4.11. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte C-MYC protein ifadenmesine etkisi	49
Resim 4.12. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte GSK-3B protein ifadenmesine etkisi	50

Resim	Sayfa
Resim 4.13. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte HIF1-A protein ifadenmesine etkisi.....	50
Resim 4.14. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte VEGF-A protein ifadenmesine etkisi.....	51
Resim 4.15. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte CCND-1 protein ifadenmesine etkisi.....	51
Resim 4.16. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte CDK-4 protein ifadenmesine etkisi.....	52
Resim 4.17. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte Fibronectin protein ifadenmesine etkisi.....	52
Resim 4.18. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte İntegrin protein ifadenmesine etkisi.....	53
Resim 4.19. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte FAK protein ifadenmesine etkisi	54
Resim 4.20. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte GAPDH protein ifadenmesine etkisi.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

M	Molar
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
g	Gram
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
cm²	Santimetrekare
°C	Santigrat
dk	Dakika
%	Yüzde
V	Volt
mA	Miliamper
kb	Kilobaz
ng	Nanogram
bp	Baz çifti

Kısaltmalar

Açıklamalar

4E-BP1	4E binding protein 1
AR	Androjen Reseptörü
AR&GE	Araştırma-Geliştirme
ATP	Adenozin Trifosfat
BAD	Bcl-xL/Bcl-2 ilişkili Ölüm Promotörü

Kısaltmalar**Açıklamalar**

BCA	Biçinkonik Asit Yöntemi
BSA	Bovine Serum Albumin
CASP	Kaspaz
CDKs	Siklin Bağımlı Kinazlar
CRISPR	Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
DSB	Çift Zincir Kırığı
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FBS	Fetal Bovin Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FOXA1	Forkhead box A1
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz
gRNA	Guide Ribonükleik Asit
HDR	Homoloji Yönelimli Tamir
HIF-1α	Hipoksi İndüklenebilir T.F 1 alfa
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
IGFR	İnsulin-Benzeri Büyüme Faktör Reseptörü
LB	Luria-Bertani Broth
LNCap	İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
MDM2	Murine Double Minute
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mtDNA	Mitokondriyel DNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NHEJ	Homolog Olmayan Uç Birleşmesi
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3K	Fosfatidil inositol-3-OH kinaz

Kısaltmalar**Açıklamalar**

PIP3	Fosfatidil inositol-3,4,5 trifosfat
PIN	Prostatik İntraepitelyal Neoplazi
PMSF	Fenilmetil Sulfonil Fluorid
PSA	Prostat Spesifik Antijen
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RNA	Ribonikleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TALEN	Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleaz
TBE	Tris-Borik asit-Edta
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
ZFN	Zinc Finger Nükleaz

1. GİRİŞ

Metformin, FDA onaylı, kemoterapi ilaçlarına kıyasla ucuz, antikanser etkili anti-diyabetik bir ilaçtır. Son yıllarda yapılan ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları kapsamında Metformin'in kanser tedavisinde kullanımı ön plana çıkmaktadır. İlaç yeniden konumlandırma çalışmaları kapsamında LNCap hücre hattına etkisi incelenen bir diğer ajan ise Memantin'dir. Memantin, Alzheimer'ın tedavisinde kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır. Bu iki ilacın, prostat kanseri patogenezinde önemli rol oynayan PI3K/AKT/mTOR yolağında görevli genlerin, protein ekspresyonlarına olan etkileri incelenmiş olup, prostat kanserinin tedavisinde kullanılabilecek, ilaç uygulanabilir hedeflerin belirlenmesi üzerine çalışılmıştır.

FOXA1 geni, glukoz homeostasisi gibi kanser hücreleri için çok önemli bir metabolik süreçte görevli, prostat kanserinde ekspresyonu deregüle olan bir genidir. Bu genin sessizleştirilmesinde kullandığımız Crispr/Cas9 sistemi daha önce kullanılan genom düzenleme tekniklerine kıyasla uygulanabilirlik kolaylığı ve maliyet azlığıyla giderek daha popüler hale gelmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, FOXA1 geni prostat kanserinin 7 moleküler alt tipinden birisi olarak belirlenmiştir. FOXA1 geninin androjene duyarlı hücrelerdeki fonksiyonunu incelemek ve PI3K/AKT/mTOR yolağındaki etkilerini incelemek amacıyla bu gen inaktif hale getirilerek PI3K/AKT/mTOR yolağında önemli hücresel süreçlerde görevli genlerin protein ekspresyonları üzerine etkisi araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında, prostat kanseri moleküler alt tiplerinden önemli bir bölümünü oluşturan FOXA-1 geni inaktif hale getirilerek-primer prostat kanserindeki durumun in-vitro olarak modellenmesi ve Metformin, Memantin uygulanmasının prostat kanseri hücreleri üzerinde PI3K/AKT/mTOR yolağında görevli anahtar genlerin protein ekspresyonu seviyelerine etkisi incelenmiştir. Genin inaktif hale getirilmesinde ise son yılların en önemli buluşları arasında gösterilen CRISPR sistemi kullanılmıştır. CRISPR Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats = Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar; öncelikle bakteri ve arkelerde tanımlanmıştır ve doğal bir adaptif bağışıklık sistemi olarak görev yaptığı bulunmuştur (Sternberg vd. 2015). Cas9 gibi DNA'yı invitro ortamda da kesebilen enzim kombinasyonu, guideRNA ile yönlendirilerek DNA'nın istenilen bölgesinden çift zincirde kesim yapmaya olanak sağlamıştır. Böylece Crispr/Cas9 sistemi istenilen gen bölgesinin kesilerek knock-out edilmesi-inaktif hale getirilmesinde de etkin olarak kullanılmaktadır (Sander ve diğerleri, 2014).

Tip 2 diyabet hastalığının tedavisinde kullanılan ve bazı kanser türlerinin tedavisindeki kullanımına yönelik pre-klinik ve klinik çalışmaları devam eden Metformin'in prostat kanseri hücreleri üzerinde kaspaz'lar aracılığıyla apoptozun içsel yolağı üzerinden etki göstererek, kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü ortaya konmuştur (Kılıçcıoğlu ve diğerleri, 2015). Bu bulgular ışığında yeni genom editing tekniklerinden CRISPR kullanılarak prostat kanseri progresyonunda önemli rol oynayan FOXA1 geninin susturulması ve ardından Metformin ve Memantin'in PI3K/AKT/mTOR yolağında, hücre döngüsünün önemli süreçlerinde görevli çeşitli proteinlerin ekspresyon seviyelerine etkileri araştırılmıştır.

Protein Ekspresyonu incelenen genler:

Apoptozda görevli CASP-3,BCL-2,BAX, SURVIVIN

Glukoz metabolizması üzerine etkileri için GSK-3

Kanserle ilişkili proliferasyondaki görevleri için CCND1,c-MYC, B-Catenin

mTORC1-MEK/ERK yolağının önemli bir noktasında bulunan hücre döngüsünde görevli CDK4

Angiogenesis için: HIF1A, VEGF-A;

Ayrıca hücre yapısal proteinlerinden Fibronectin, İntegrin'in ve housekeeping gen GAPDH ekspresyonları da incelenmiştir. Son yıllarda önemi giderek artan ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları kapsamında Metformin ve Memantin'in prostat kanseri tedavisindeki potansiyel kullanımı pre-klinik olarak araştırılmıştır.

Bu tez çalışması ile yanıtı aranan diğer bir önemli soru ise, Metformin'in hangi hasta profili üzerinde (örneğin mutant FOXA1 geni bulunan) daha etkili olarak kullanılabileceği sorusudur. FOXA1 gen knock-out edilmesinin klinik olarak değerlendirilmesiyle, bu genin prostat kanserinde hasta stratifikasyonunda kullanılabileme potansiyeli araştırılmıştır.

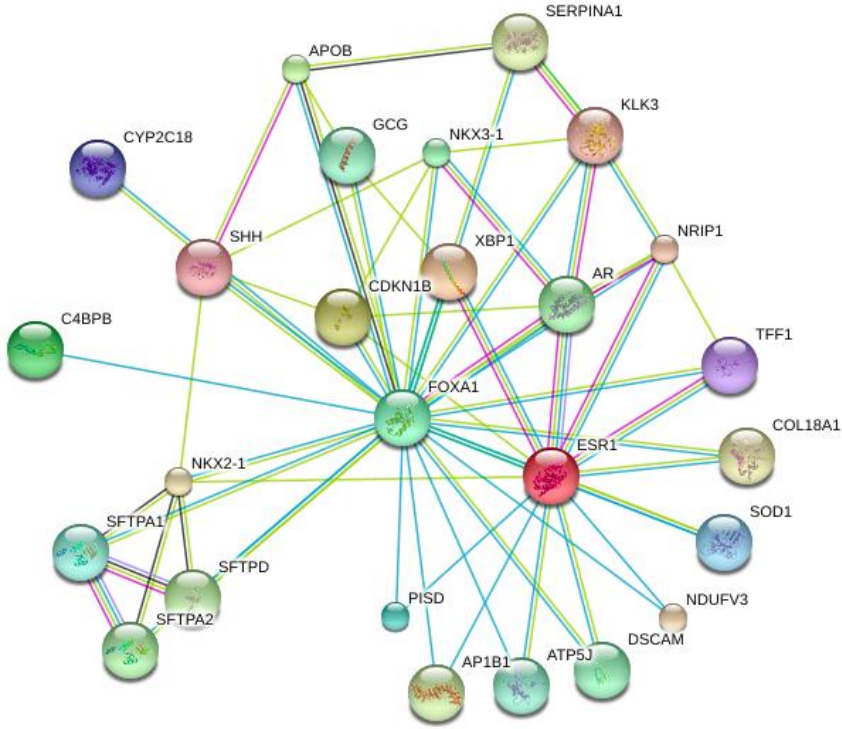
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden birisidir ve endüstrileşmiş toplumlarda kanser-ilişkili ölümlerin en başında gelmektedir (Watson ve diğerleri, 2014). Kanserin daha etkin, hastaya özgü tedavisinin yapılmasında giderek daha fazla sayıda moleküler ve genetik profillemeye çalışmaları kullanılmaktadır. Hasta örneklerinin ayrıntılı moleküler ve genetik karakterizasyonunun yapılması ile kanser moleküler alt tipleri belirlenebilmekte ve kişiye özgü kanser tedavisi mümkün hale gelmektedir.

Kanser Genom Atlası Araştırma grubunca yapılan bir çalışmada primer prostat kanserinin moleküler taksonomisi ortaya konmuştur. Bu çalışmada 333 primer prostat karsinomunun ayrıntılı moleküler karakterizasyonunun yapılması ile birlikte prostat kanseri moleküler olarak 7 alt kategoriye ayrılmıştır. Bu alt kategorileri ETS füzyonları ve SPOP, FOXA1 ve IDH1 genlerindeki mutasyonlar oluşturmaktadır. Bu moleküler alt tiplerde AR (Androjen Reseptör) aktivitesi geniş bir çeşitlilik göstermekle birlikte en yüksek AR bağımlı transkript seviyesi SPOP ve FOXA1 mutant tümörlerde görülmüştür. (Cancer Genome Atlas Research Network-CGARN 2015). Ayrıca Barbieri ve arkadaşlarının çalışmasında da SPOP, FOXA1 ve MED12 mutasyonlarının prostat kanseri gelişimde önemli rolü olduğu ortaya konmuştur (Barbieri ve diğerleri, 2012).

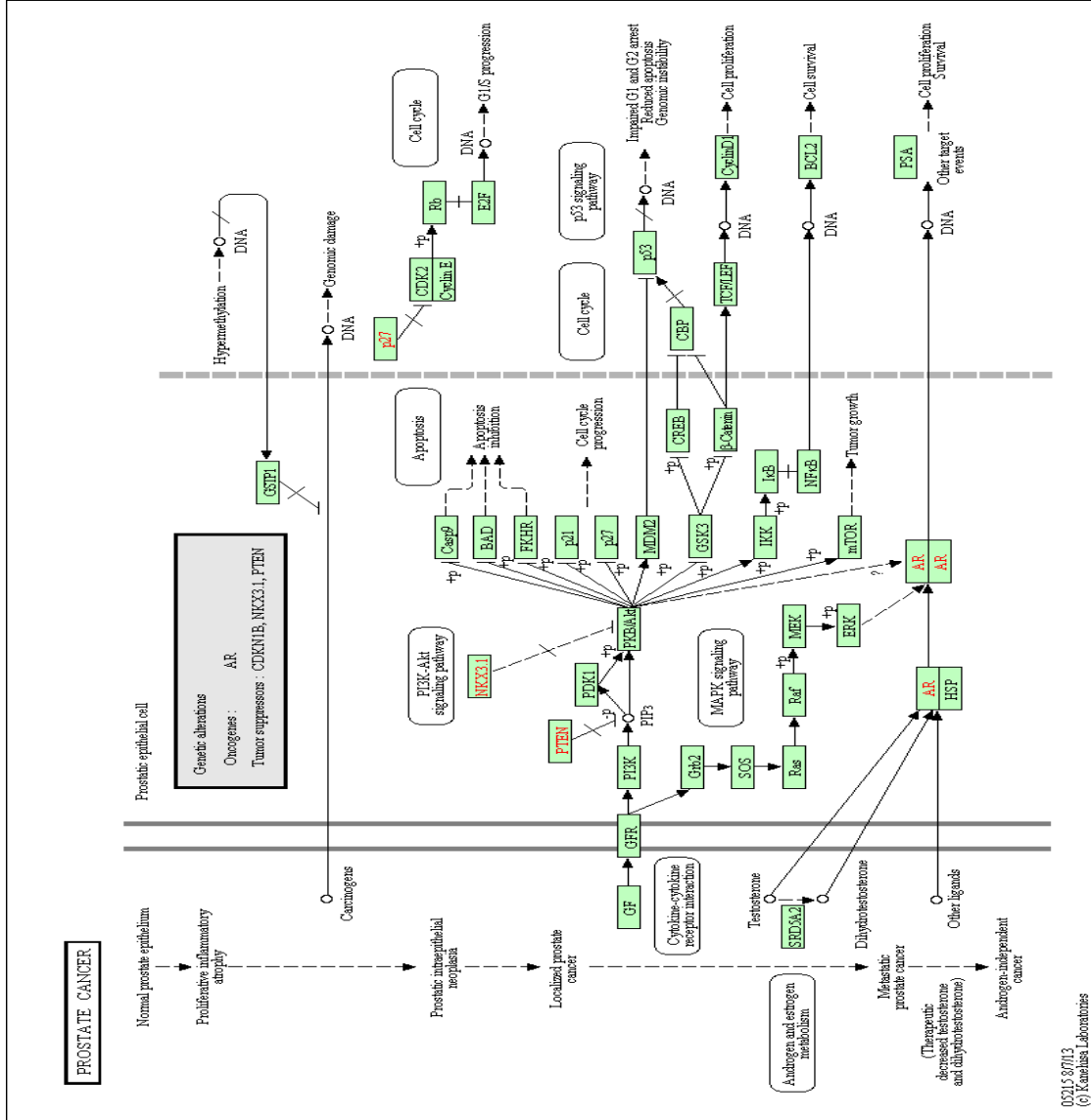
Şekil 2.1 'de FOXA1'in AR ile olan etkileşimi görülmektedir. FOXA1 epitel farklılaşması ve pankreas, prostat, meme gibi organların gelişiminde önemli rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür (Jin ve diğerleri, 2013). Mutant FOXA1 androjen sinyallemesini baskılamakta ve tümör gelişimini artırmaktadır (Grasso ve diğerleri, 2012). FOXA1 hücre proliferasyonu ve hücre göçü gibi farklı onkogenik süreçleri AR-bağımlı ve AR-bağımsız olarak düzenlemektedir. FOXA1 mRNA ve protein ekspresyonları androjene duyarlı LNCaP hücrelerinde daha yüksektir. FOXA1 ekspresyonunun benign prostat doku örnekleriyle karşılaştırıldığında lokalize prostat kanserinde önemli derecede up-regüle olduğu bulunmuştur (Jin ve diğerleri, 2013). Prostat kanseri progresyonunda önemli rolü olan AR sinyal yolağı ayrıca PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ile de etkileşim içerisindedir (Edlind ve diğerleri, 2014). Bu nedenle bu sinyal yolağında rol oynayan genlerin protein düzeyinde ekspresyonları incelenmiştir.



Şekil 2.1 FOXA1'in protein-protein etkileşim ağı (<http://string-db.org/>)

2.2. Prostat Kanseri Patogenezinde PI3K/AKT/mTOR Yolağı

PI3K yolağı prostat kanseri progresyonunda rol alan önemli bir yolaktır. Taylor ve ark.'nın yaptıkları çalışmada PI3K sinyal yolağı, primer prostat kanserlerinin %42'sinde, metastatik vakalarının ise %100'ünde değişmiş olduğunu bulunmuştur (Taylor ve diğerleri, 2010). Bu bulgular, PI3K sinyal yolağında görevli genlerdeki artan mutasyon yükünün metastaza katkı yapabileceğini düşündürmektedir. Şekil 2.2'de görüldüğü üzere PI3K-AR yolaklarının kesişiminde görev yapan genler henüz bilinmemektedir. FOXA1 transkripsiyon faktörü ve etkileşimde olduğu diğer genler bu yolda görevli olabilecek aday bir genleri oluşturmaktadır.



Şekil 2.2. Prostat kanseri patogenezindeki sinyal yolları (KEGG Pathways)

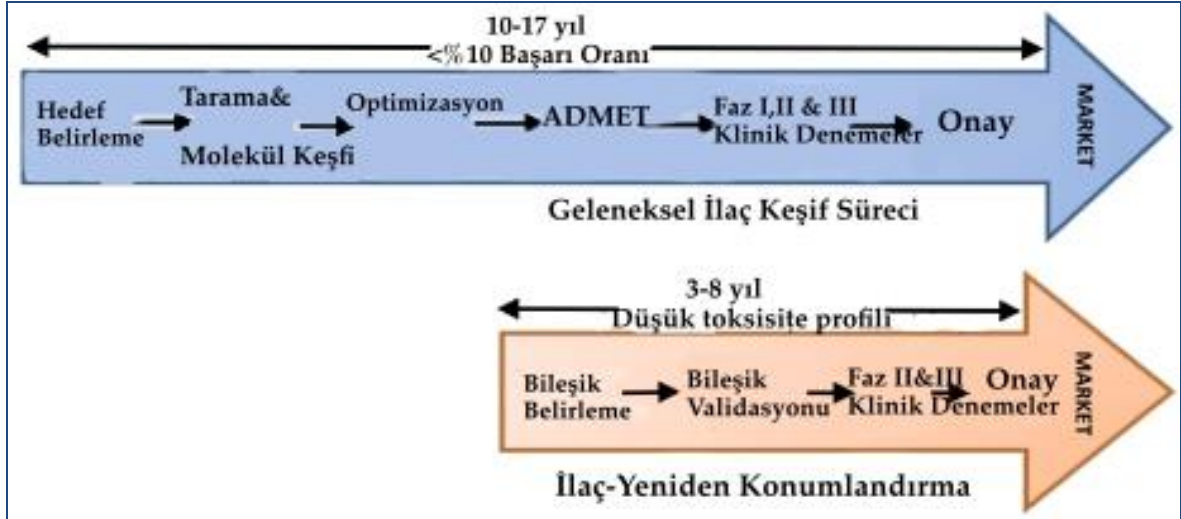
mTOR, hücre kütle ve büyüklüğünde artışa, bununla birlikte hızlı proliferasyona yol açan ribozom biyogenezi ve protein translasyonu gibi önemli süreçleri upregüle ederek, hücrenin sentetik kabiliyetini teşvik etmektedir. mTOR'un en iyi karakterize edilmiş downstream efektörleri, Ribozomal protein S6 kinazlar (S6K) ve 4E-BP1 dir (Tsang ve diğerleri, 2007). Her bir kinazın yaklaşık olarak 20 substratı stimüle ettiği tahmin edilmektedir. mTOR pek çok farklı hücresel süreçte görev almasına rağmen sadece 2 proteinin substratı olduğu belirlenebilmiştir. mTOR'un substratlarını belirlemek için daha fazla sayıda çalışma yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır (Tsang ve diğerleri, 2007). İki farklı mTOR kompleksi tanımlanmıştır: mTORC1 ve mTORC2. mTORC1 kompleksi; büyüme faktörleri, beslenme, hipoksi ve ATP seviyelerinin düzenlenmesi ile görevli iken, mTORC2; AKT'yi, Protein kinaz C α (PKC) fosforilasyonunu ve hücre iskeletinin

organizasyonunu düzenlemektedir. Son zamanlarda, PKB/AKT aktivitesinde Rapamisin gibi mTOR inhibitörlerinin görevi tanımlanmıştır. Bunun yanında mTORC1 inhibisyonunun MAPK aktivasyonuna neden olduğu bulunmuştur. Hem PI3K hem MAPK yolağının aktivasyonu kanser sinyal iletiminin karmaşık yapısına dikkat çekmektedir. İkili MTOR1 ve MAPK inhibitörlerinin keşfine ihtiyaç bulunmaktadır (Maddalena ve diğerleri, 2009).

mTORC1 sinyali Hipoksi-uyarımli faktör 1- α (HIF1A) transkripsiyonunu ve translasyonunu artırır. Bu yolla yeni kan damarlarının oluşumunu ve tümörün oksijenlenmesini arttıran Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)'nin transkripsiyonunu arttırır. Buna ek olarak HIF1A, glikolitik akış kontrolünü sağlayan glukoz transporter ve heksokinaz gen ekspresyonlarını düzenleyerek, kanser hücrelerinin olası enerji kaynaklarını etkilemektedir (Lisi ve diğerleri, 2014).

2.3. İlaç Yeniden Konumlandırma

Biyofarmasötik endüstrisindeki ana problemlerden birisi de, artan farma AR&GE harcamaları ve araştırmadan elde edilen çıktılarının dengesiz olmasıdır. Şirketlerin yapıya-dayalı ilaç tasarımı, akıllı ilaç tasarımı, kombinatorial kimya, yüksek çıktılı tarama ve genomik gibi yeni ilaç keşif çalışmalarına büyük oranlarda yatırım yapmalarına rağmen üretimdeki bu boşluk halen devam etmektedir. Üretimdeki bu problem, dünya genelindeki fiyat baskısı, jenerik ilaçlar beraberinde gelen zorluklar vb. nedenlerle ilaç üreticilerini var olan ilaçların yeni terapötik kullanımları gibi daha yaratıcı çözümler bulmaya yöneltmektedir. Bilinen bir ilacın orjinal medikal endikasyonu dışında farklı bir kullanımının bulunması sürecine; ilaç yeniden yönlendirme, ilaç yeniden konumlandırma, ilaç yeniden amaçlandırma veya ilaç yeniden profillemeye gibi isimler verilmektedir (Ashburn ve Thor, 2004).



Şekil 2.3. Geleneksel İlaç Keşif Çalışmaları-İlaç Yeniden Konumlandırma Zaman Çizelgesi (Chakraborty ve Trivedi, 2015).

Metformin, Diabetes mellitus, Tip 2 diyabetin tedavisinde sıklıkla kullanılan Galega officinalis bitkisinde bulunan bir guanidin türevidir (Würth ve diğerleri, 2013). Metformin diyabetin tedavisinde dünya genelinde yaklaşık 100 milyon kişi tarafından kullanılmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada Metformin kullanan hastalarda, kullanmayanlara kıyasla kanser oranlarının azaldığı gözlenmiştir (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002). Metformin'in etki mekanizması protein sentezinin kontrolü ve hücre proliferasyonunda görev alan Adenozin Monofosfat-aktive protein kinazlar/mTOR sinyal yolağının düzenlenmesini içerir. Metformin'in kanser gelişiminde ve tümör progresyonu üzerine inhibe edici etkisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak bu etkinin sistemik glukoz ve insülin seviyelerinin düşürülmesinin indüklenmesiyle bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Würth ve diğerleri, 2013). Metformin'in tümör başlatıcı prosesi inhibe edebileceğinden şüphe edilmektedir. Metformin'in kesin moleküler hedefi tam olarak bilinmemekle birlikte bir çok metabolik- metabolik olmayan süreci etkilediği gösterilmiştir (Jones ve diğerleri., 2012).

Metformin, insülin seviyesini düşürdüğü, büyüme faktörlerinin sinyallerini baskıladığı ve metabolizmayı değiştirdiğinden antikanser ilaç özellikleri taşımaktadır. Hücre büyümesi ve proliferasyonunda ve de enerji metabolizmasında önemli rolleri nedeniyle antidiyabetik ve metabolizma değiştirici ilaçlar kanser için önleyici ve terapötik değer taşımaktadır (Quinn ve diğerleri, 2013). Metformin'in AMPK bağımlı ve bağımlı olmayan etki mekanizması vardır. Metformin, mitokondriyal kompleks I'in direkt inhibisyonu yoluyla hücresel

solunumu inhibe eder. Metformin, kanser riskini, glukoz seviyesini, IGF1'i ve insülin sinyallemesini azaltarak düşürür ve tümör hücreleri için kalori kısıtlaması etkisine benzeyen, istenmeyen bir mikro çevre yaratır. Metformin inflamasyonu azaltabilir ve hücrel immün sistemin bileşenlerini değiştirebilir. Metformin ayrıca pro-inflamatuar sitokinlerden IL-6 ve IL-8'in seviyesini düşürmektedir. Metformin'in kanser tedavisinde iyi bir uygulama şekli olarak, sitotoksik-kemoterapötik ilaçlarla birlikte kombine olarak düşük dozlarda uygulanması önerilmektedir (Quinn ve diğerleri, 2013).

Metformin ayrıca hastalarda insülin duyarlılığını arttırarak ve insülin direncini azaltarak insülin reseptör ekspresyonu ve tirozin kinaz aktivitesi üzerine de dolaylı olarak etki yapmaktadır. Kronik olarak yüksek plazma insülin seviyesi, insülinin mitojenik etkisi ve tümör hücrelerindeki insülin reseptörlerinin yüksek ekspresyon seviyeleri nedeniyle tümörojenik etkiye sebep olabilir. Ben Sahra ve arkadaşlarının. Metformin'in insan prostat kanseri hücreleri üzerinde hücre döngüsünün 2 ana düzenleyicisi olan Siklin D1 ve RB proteinlerinin ekspresyonunu inhibe ederek hücre döngüsü tutuklamasına neden olduğunu göstermiştir. Bu yolağın upregülasyonu p53 ve p21 tarafından yürütülerek, siklin bağımlı kinazların azaltılması ve G1 hücre döngüsünü durdurması ile antiproliferatif etki ile sonuçlanmıştır. Metformin'in glikolizi bozarak, hücreyi mitokondriyal solunum aracılı oksidatif stresin yaratacağı erken yaşlanma etkisinden koruduğu düşünülmektedir (Riedmaier ve diğerleri, 2013).

Metformin'in göğüs, kolon, akciğer, prostat ve pankreas tümör hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi gösterilmiştir. Metformin'in neoplastik patolojiler üzerine etkisini araştıran faz 1, 2, 3 klinik çalışmalar devam etmektedir (Rattan ve diğerleri, 2012). Metformin'in en ilgi çekici etkisinin kanser kök hücre subpopülasyonları üzerinde güçlü antiproliferatif etkisi olduğu düşünülmektedir (Sambuceti ve diğerleri, 2013). Metformin, oral olarak kullanıldığında Kan beyin bariyerini geçebilmekte ve MSS üzerinde etkisini direk olarak gösterebilmektedir. Düşük toksisite profili, FDA onaylı durumu ve etkinliği nedeniyle Metformin ön plana çıkmaktadır (Würth ve diğerleri, 2013; Quinn ve diğerleri, 2013; Riedmaier ve diğerleri, 2013).

2.4. Kanserin Tedavisinde Hücre Metabolizmasının Hedeflenmesi ve Warburg Etkisi

Otto Warburg'un aerobik glikoliz üzerindeki çalışmalarının önderliğinde glukoz; kanser hücre metabolizmasının merkezine yerleştirilmiştir. Ancak yapılan son çalışmalarda glutamin'in de kanser hücre metabolizmasındaki rolü araştırılmaya başlanmıştır (Altman ve diğerleri, 2016).

Glutamin, diğer amino asitlere kıyasla çoğalan hücrelerin metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Tümörler fazla miktarda glutamin tüketirler. Glutamin metabolizması protein, lipid ve nükleik asitlerin biyosentezi için gerekli ATP üretiminde rol oynayarak kanser hücrelerinin sürekli olarak bölünmesine katkı sağlar. Bunun yanı sıra glutamin redoks homeostasisini düzenlemekte ve sinyal iletim yollarının aktivitesini etkileyebilmektedir (Daye ve diğerleri, 2012).

Kanser hücresi glutamin ve glukoz metabolizması üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla Metformin ve Memantin ilaçları seçilmiştir. Memantin, Alzheimer ilacı olarak FDA onayı alan bir NMDA reseptör antagonistidir.

Çoğalan tümör hücreleri, normal hücresel süreçlerde kullanılmak üzere olan ATP ihtiyaçlarının yanında, hızlı hücre bölünmesini destekleyecek enerji üretimine de ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte hücreler, anormal tümör mikroçevresinin karakteristik özelliklerinden stresli metabolik koşullarda hücre proliferasyonunu bloklayan kontrol noktalarından kaçma özelliği kazanmışlardır. Tümör hücreleri, tümör progresyonunun gerektirdiği ihtiyaçları karşılamak üzere metabolik yolları yeniden programlar. Tümör hücrelerinde görülen en iyi karakterize edilen moleküler fenotip ATP üretiminin normal oksijenli konsantrasyonlarda bile oksidatif fosforilasyondan glikoliz'e kaydığı Warburg etkisidir. Bunun sonucunda normal hücrelerin aksine, transforme olmuş hücreler glukoz'u mitokondride oksidatif fosforilasyonla metabolize etmek yerine aerobik glikolizden sağladıkları fazla miktardaki enerjiyi laktat'a çevirirler (Cairns ve diğerleri, 2011).

Warburg'un hipotezi ile birlikte tümör metabolizmasının daha iyi anlaşılması sağlanmıştır. Tümörlerde artan glukoz metabolizması ATP ve anabolik metabolitlerin hızlı bir şekilde üretilmesinin bir göstergesidir (Frezza ve diğerleri, 2009).

Otto Warburg tarafından ortaya konan kanser hücrelerinin artan oranlarda aerobik glikoliz'leri ayrıca Pozitron Emisyon Tomografisi (PET)'nde tümörlerin görüntülenmesinin temelini oluşturmuştur (Wolf, 2014).

Hanahan ve Weinberg (2000) kanser hücresinin temel fenotipik özelliklerini şu şekilde tanımlamışlardır;

- Büyüme sinyallerinin sürekliliği
- Büyümeyi baskılayıcı faktörlerden kurtulmak
- Replikatif ölümsüzlük
- Tümör gelişimini artıran inflamasyon
- Hücresel enerjetiklerin düzensizliği
- Anjiyogenezin indüklenmesi
- Genom kararsızlığı ve mutasyon
- Hücre ölümüne karşı direnç geliştirilmesi
- İnvazyon ve metastazın aktive olması

Normal hücreler ile karşılaştırıldığında kanser hücrelerinin glukoz, yağ asit sentezi, serin ve glutamin metabolizmasında kanser gelişimine katkı sağlayacak şekilde bozulmalar görülmektedir (Singh ve diğerleri, 2015). Çoğalan kanser hücrelerinin enerji kaynağı olarak glutamin'e olan bağımlılıkları da kanser hücrelerinin önemli özelliklerinden birisidir. Glutamin sitoplazmada glutaminaz tarafından glutamata dönüştürülür ve Sitrik asit döngüsünde ara metabolit α -ketoglutarat'a dönüştürüldüğü mitokondriye taşınır. Bu ara metabolitler çeşitli makromoleküllerin sentezi için gerekli substrat kaynağını oluştururlar. Ayrıca Glutamat, reaktif oksijen türlerine karşı koruma sağlayan hücre içi primer anti-oksidan mekanizmalarında görevli önemli bir substrattır. Yapılan araştırmalarda glutaminin mTOR ve ERK yolları gibi hücre büyümesini içeren pek çok sinyal yolağında c-Myc regülasyonu aracılığı ile glutamin alım ve degradasyonunda görev yaptığı belirlenmiştir (Verschoor ve diğerleri, 2013; Michalak ve diğerleri, 2015).

P53 tümör supressör geni, DNA hasarı, hipoksi, onkogen aktivasyonu gibi durumlarda hücre döngüsü tutuklanmasına neden olarak hücreyi apoptoza götürür. P53 normalde nükleusda bulunurken sitozole transloke olur ve translasyondan sonra MDM2 ile bağlanır. Bu bağlanma p53'ün aktivasyonunu inhibe eder. Stres sinyallerinin alınmasının ardından

p53, serin 15 bölgesinden fosforilasyona uğrar, ardından p21, Bax, PUMA, NOXA veya PTEN gibi downstream faktörleri aktive eder. P53 ayrıca GLUT1 ve GLUT4'ü baskılayarak PI3K (fosfatidilinositol-3 kinaz)-AKT (protein kinaz B) and mTOR yolaklarını inhibe eder (Chen ve diğerleri, 2015).

2.5. Kanser Tedavisinde Mitokondrilerin Hedeflenmesi

Yaşamın sürdürülmesi ve ölüm indükleyici yolakların kesişiminde mitokondri bulunmaktadır (Indran ve diğerleri, 2011). Mitokondrilerin hücrenin enerji birimi olması ve apoptozdaki merkez düzenleyici rolü, onu etkin bir terapötik hedef haline getirmektedir (Agnihotri ve diğerleri, 2015).

Endokrin, kardiyolojik ve nörolojik hastalıkların tedavisinde klinikte kullanılan pek çok ilaç mitokondri fonksiyonlarını da etkilemektedir. Metformin'de mitokondride kompleks I üzerinde etki göstermektedir. Alzheimer'ın tedavisinde kullanılan N-metil-D-aspartat reseptörü Memantin de mitokondriyal kompleks I aktivitesini artırırken, kompleks IV'ün aktivitesini azaltmaktadır (Mitrakas ve diğerleri, 2014).

Metformin ve Memantin'in kanser tedavisinde hücreleri kemoterapi ve radyoterapiye hassaslaştırma etkiside dikkat çekmektedir. Mitrakas ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Metformin'in bu etkisi gösterilmiştir. Mitokondriyal fonksiyonları üzerindeki en güçlü etkiyi Metformin ve amiodaron göstermiştir (Mitrakas ve diğerleri, 2014).

Kanser hücreleri ve normal hücrelerin glukoz metabolizmasındaki farklılıklar kansere karşı yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için kullanılabilir. Yeni bir antineoplastik bir ajanın geliştirilmesindeki temel; tümör hücrelerini apoptozla seçici olarak öldürürken, normal hücrelere zarar verilmemesidir (Agnihotri ve diğerleri, 2015).

Tümörlerde apoptoz, nekroz ve otofaji gibi farklı hücre ölüm şekilleri malign hücrelerin öldürülmesi için tetiklenmiş olabilir. Apoptoz, evrimsel olarak korunmuş olan ve embriyonik gelişim, doku homeostasis'i gibi genetik olarak düzenlenen kritik süreçlerde ve tümör hücre biyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Gogvadze ve diğerleri, 2009). Hücre ölümünden kaçış, kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden birisidir. Kanser hücreleri apoptozdan kaçmak için p53 fonksiyonunda bozulmalar, anti-apoptotik faktörlerin

salınmasında artış, pro-apoptotik faktörlerin down regülasyonu gibi farklı stratejiler kullanmaktadır (Chen ve diğerleri, 2015).

Hücrel ölüm şekillerinden apoptoz içsel ve dışsal yollarla uyarılabilmektedir. Ayrıca içsel-dışsal yolk kendi arasında bir etkileşim halindedir. Dışsal yolkta mitokondriler görev yapmakta, ancak içsel yolkta hem kaspazlar hem de mitokondri rol oynamaktadır. Kaspazlar, sistin-bağımlı aspartik asite özgü proteaz ailesidir ve proteazlarla hücrenin apoptoz ile dağıtılmasında görev alırlar (Fogg ve diğerleri, 2011).

Apotozun indüklenmesi için dış mitokondriyal membrandaki pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesi son derece önemlidir. Pek çok tümörde ise anti ve pro-apoptotik moleküller arasındaki bu dengenin anti-apoptotik yönde kaydığı ve mitokondriyal apoptoz yolağının bastırıldığı görülmektedir (Gogvadze ve diğerleri, 2008).

Mitokondriyal DNA'da koruyucu histon proteinleri yoktur ve limitli bir DNA tamir mekanizmasına sahiptir. ROT'leri ise mitokondrinin yüksek mutasyon oranına katkı sağlamaktadır. Mitokondriyal DNA mutasyon oranınının, çekirdek DNA'sından en az iki kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (Fogg ve diğerleri, 2011).

Mitokondriyal DNA (mtDNA); DNA ile etkileşen pekçok anti-kanser ilacın önemli bir hedefidir ve mitokondriler bu ilaçların etkinliğini belirlemektedir (Wen ve diğerleri, 2013). mtDNA taşımayan hücrelerde apoptoz işaretleri görülmemektedir, bu da hücre ölümünün mitokondriyal ATP sentaz ve mitokondriyal solunum zincir aktivitesinin direk etkisi olduğunu göstermektedir. Mitokondriyal solunum zincirinin inhibe edilmesi hücreyi diğer apoptotik stimülasyonlara da yatkın hale getirmektedir (Gogvadze ve diğerleri, 2009).

Sitokrom c'nin salınması ve kaspaz aktivasyonu, Bax'ın sitozolden mitokondriye translokasyonu ile gerçekleşmektedir (Gogvadze ve diğerleri, 2009). Mitokondriyal aktivite hücrel enerji metabolizmasını kontrol etmesinin yanı sıra mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin de üretimini teşvik etmektedir. Bu ROT'leri tümör hücrelerinin ölüm sinyallerine daha duyarlı olmasına neden olabilmektedir. Apoptotik düzenleyiciler ve mitokondriyal enerji metabolizması arasındaki bu ilişki yeni anti-kanser ajanların keşfedilmesinde göz önünde bulundurulmalıdır (Gogvadze ve diğerleri, 2009).

Apoptozun içsel yolağı tümör oluşumunun engellenmesi için önemli bir koruyucu mekanizmadır. DNA'sı hasarlı olan ve deregüle onkogen aktivasyonu gösteren hücrelerin eliminasyonu sağlanır. Bu iç koruyucu mekanizmada meydana gelen bozukluklar, normalde ölmesi gereken hücrelerin sürekli çoğalmasına neden olur ve tümörögenез için zemin hazırlanmış olur. İçsel apoptoz yolağındaki defektler tümör metastazında ve kemo-dirençte önemli rol oynamaktadır (Kitada ve diğerleri, 2002, Kirkin ve diğerleri, 2004). Kanser tedavisinde apoptoz mekanizmaları hedeflenmektedir. İçsel apoptoz yolağında anti-apoptotik proteinlerin fazla ekspresyonu ya da pro-apoptotik proteinlerin fonksiyon kayıplarının olduğu iki temel mekanizma bulunmaktadır. Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerinin fazla ekspresyonu bazı hematopoietik hastalıkların yanında prostat, kolorektal, akciğer ve gastrik kanserler gibi solid tümörlerde de görülmüştür. 2016 yılında FDA tarafından onaylanan Bcl-2 inhibitörü Venetoklax Kronik Lenfositik Lösemi'nin tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır (Roberts ve diğerleri, 2016).

Hastalığın altında yatan moleküler sürücü mutasyonların keşfedilmesi ile birlikte daha etkili, hedefe yönelik tedaviler mümkün hale gelebilecektir (Lee ve diğerleri, 2012). Mitokondri ve kanser kelimelerinin birleşmesinden oluşan bir grup bileşik mitokan olarak tanımlanmakta ve mitokondileri hedefleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır (Gogvadze ve diğerleri, 2010).

2.6. Genom Düzenleme-Crispr/Cas9

DNA'nın in vitro ortamda sentezlenebilmesi ve üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılabilmesi geride bırakılan yıllarda pek çok bilimsel gelişmeye zemin hazırlamıştır. Bu gelişmeler DNA'nın çift zincirli yapısının keşfedilmesiyle başlamış polimeraz, ligaz, endonükleaz gibi enzimlerin keşfedilmesi ve PCR'ın bulunması ile devam etmiştir. Genom dizileme teknolojilerinin de gelişimiyle pek çok organizmanın tüm genom dizisi ortaya çıkarılmıştır (Doudna ve Charpentier, 2014).

Araştırmacılar hücreleri daha önce olmadığı şekilde manipüle edebilme fırsatına kavuşmuşlardır. Bu gelişme prokaryotik adaptif immün sistemi olan Kümelenmiş Düzenli Kısa Aralıklı Palindromik Tekrarlar (CRISPR)'ın keşfedilmesi sayesinde mümkün hale gelebilmiştir (Sternberg ve Doudna, 2015). Hedefe yönelik olarak yapılabilen genom

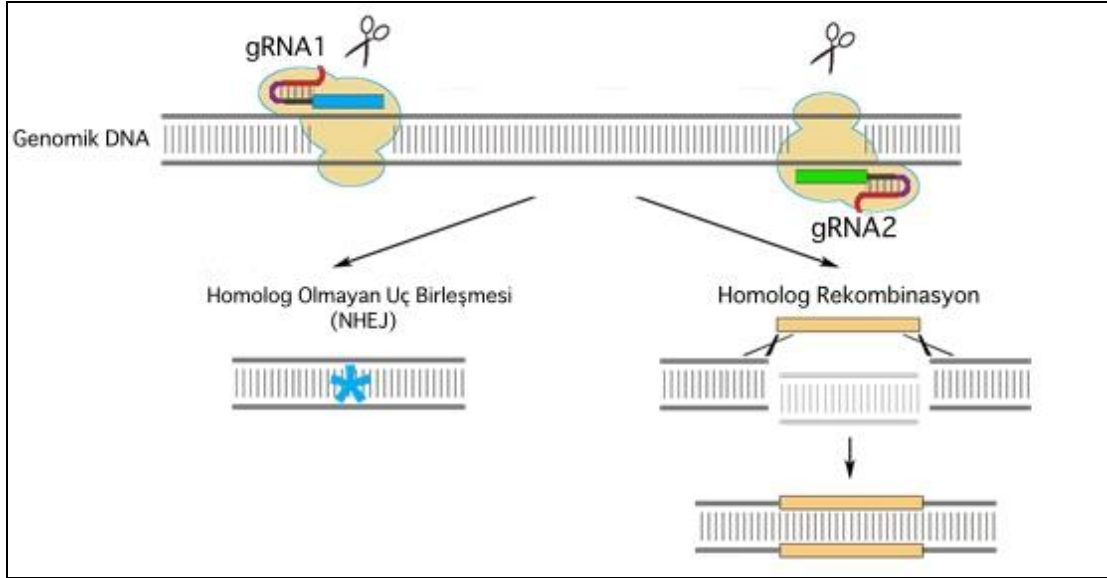
modifikasyonları ve model organizmaların tasarlanması gibi pek çok biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamada kullanılabilmektedir (Pyzocha ve diğerleri, 2014).

Crispr ile genom modifikasyonları yapmak için iki temel yapıya gereksinim bulunmaktadır. Bunlar Cas9 proteini ve guide RNA (gRNA)'dır. gRNA Cas9 nükleaz ile bir kompleks oluşturduğunda, gRNA'nın spesifik olarak hedeflediği gen bölgesinde DNA çift zincir kırığı oluşmaktadır (Romanienko vd., 2016). Oluşan bu çift zincir kırıkları; Hataya-eğilimli homolog olmayan uç birleşmeleri (NHEJ) veya Homoloji yönelimli tamir (HDR) ile tamir edilmektedir. Bu nükleazlar yeni hücre hatlarının oluşturulması, transgenik organizmaların-hastalık modellerinin oluşturulmasında, gen tedavisi gibi temel biyoloji, biyoteknoloji ve tıp alanında kullanılmaktadır (Pyzocha ve diğerleri, 2014).

Crispr'dan önce kullanılan genom düzenleme metodlarından ZFN (Zinc Finger Nükleaz'lar) ve TALENs (Transkripsiyon Aktivatör-benzeri Efektör Nükleaz)'e kıyasla; Crispr kullanım kolaylığı ve daha ucuz olması ile dikkat çekmiştir (Sternberg ve Doudna, 2015).

ZFN ve TALENs sistemleri endonükleaz katalitik domain'lerin DNA bağlanma proteinleriyle bağlanması esasına dayanırken, Cas9; küçük RNA'ların hedef DNA bölgesine yönlendirdiği Watson-Crick baz eşleşmesi prensibine dayanır ve bu nedenle Crispr sisteminde daha spesifik, etkili, pek çok hücre tipi ve organizmada kullanılabilen, birden fazla modifikasyon yapılabilir (Ran ve diğerleri, 2013).

Cas9 ile hedef bölgede oluşturulan çift zincir kırıkları, homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ) yolu ile tamir edilirken insersiyon/delesyon (indel) mutasyonları şeklinde çeşitli izler bırakmaktadır. NHEJ, kodlayan eksonlarda çerçeve kayması mutasyonları ya da premature stop kodonlarının oluşmasına neden olacağından gen knock-out uygulamalarında kullanılabilmektedir. Birden fazla Çift zincir kırığı (DSB) ise genomda daha büyük delesyonlara neden olabilmektedir (Ran ve diğerleri, 2013).Çerçeve kayması knock-out mutasyonları ters genetik yaklaşımı ile genin fonksiyonu çalışmalarını mümkün hale getirmektedir (Sander ve Joung, 2014).



Şekil 2.4. Crispr ile oluşan Çift Zincir Kırıklarının Tamir Mekanizmaları (Rivera ve Jacks, 2015).

Kanser, onkogen ve tümör supresör genlerde pek çok genetik ve epigenetik değişikliğin meydana geldiği bir hastalıktır. Bu nedenle normal ve kanser hücrelerinin genomlarını modifiye etmeye olanak sağlayarak hastalığın modellenmesini sağlayacak deneysel tekniklere ihtiyaç bulunmaktadır (Rivera ve Jacks, 2015).

Genom mühendisliği teknolojilerindeki gelişmelerle programlanabilir DNA-hedefleyici platformlarla epigenetik regülasyonun üzerinde kontrol sağlayabilen Zinc-finger nükleaz, TALENs ve Crispr-dCas9 genom düzenleme sistemleri hedef genomik bölgelerdeki epigenetik düzenlemeler yapmak amacıyla da kullanılabilir (Thakore ve diğerleri, 2015).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Hettich marka soğutmalı masa üstü santrifüj (Mikro 22 model)
- Çalkalamalı İnkübatör
- Vorteks(Biosan)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, MDF-U333, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, MDF-U53865, Japonya)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (Spectramax M3, Molecular Devices)
- Danlaf marka VFES120 model laminar flow kabini
- Sanyo marka karbondioksitli etüv (MCO-18AIC model)
- Western Blotlama Sistemi(BioRad)
- Zeiss marka İnvert mikroskop (ID03)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic 100 Imaging System)
- Jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 2200 Pro-Carestream Health)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Buzdolabı(Arçelik)
- Mikropipetler; 10µl, 100µl, 1000µl (Axygen)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071)
- Spin vorteks (Biosan)
- Ph metre (WTW 422)
- Hassas terazi (AND-ER-182A)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- Otomatik ısı döngü cihazı (Perkin Elmer)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

- ATP P0756S (NEB Lot 0121510 10mM)
- T7 Endonuclease I M0302S (NEB Lot 0041512)
- T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK) EK0031 (Thermo Lot 00358219)
- Quick Ligation Kit M2200S (NEB Lot 1171602)
- 10X T4 DNA Ligase Buffer B69 (Thermo Lot 00337693)

- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Lot 00315952)
- 25mM MgCl₂ R0971 (Thermo Lot 00335508)
- dNTP Mix, 10mM each, molecular biology grade R0191 (Thermo Lot 00331309)
- Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase E3101K (Epicentre Lot 0020022900)
- FOXA1 Antibody PA5-27157 (Thermo)
- FastDigest BpiI FD1014 (Thermo Lot 00352850)
- One Shot Stbl3 Chemically Competent E.coli C7373-03 (Invitrogen)
- Lipofectamin 3000 (Invitrogen)
- Quick-Load Purple DNA Ladder (NEB)
- ColorPlus Prestained Protein Ladder (NEB)
- OPTIMEM (Gibco)
- SOC Media (NZY Tech)
- PX330 Plasmid (Addgene)
- Besiyeri RPMI 1640 (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (Thermo)
- Penisilin/Streptomisin antibiyotik (Thermo)
- L-Glutamin (Thermo)
- Trypsin (Thermo)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Ambresco)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Roche)
- Etanol (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- Hücre Lizis Solusyonu (Roche)
- PBS (Gibco)
- Amonyum Persülfat (Sigma)
- Temed (Sigma)
- Tris base (Sigma)
- Yağsız süt tozu (CST)
- Metformin (Sigma)
- Memantin (Sigma)
- Tween-20 (Sigma)
- Caspase-3 (PI-PA516335-Thermo)
- Bcl-2 (PI-PA520068-Thermo)
- Bax (PI-PA511378) -Thermo)

- HIF-1 alfa (PI-PA116601) -Thermo)
- VEGF (PI-PA516754) -Thermo)
- FAK (PI-PA517591) -Thermo)
- GSK3 (PI-PA529251-Thermo)
- CCND1 (PI-PA524173-Thermo)
- C-MYC (PI-PA1981-Thermo)
- CDK4 (PI-PA527827-Thermo)
- B-Actin (PI-PA1183-Thermo)
- Seconder antibody (PI-3146-Thermo)

3.3. Kullanılan Kitler

- Plazmid DNA İzolasyon Kiti (Thermo)
- BCA Protein Tayin Kiti (Thermo)

3.4. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

0,5 M EDTA (Etilendiamintetraasetikası) pH 8.0

186,1 g EDTA tartılarak cam bir şişe içerisine alındı. Üzerine 800 ml distile su eklendi ve manyetik karıştırıcıyla çözdürüldü. NaOH çözeltisi kullanılarak pH'sı 8,0'a ayarlandı ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120 C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Stok Solüsyonu

108 g Tris baz, 55 g Borik asit cam şişe içerisine tartıldı. Üzerine 40ml. 0,5 M EDTA (pH 8,0) ve 800 ml. steril distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözeltinin son hacmi 1 litreye tamamlandı ve 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

1X TBE

100 ml 10X TBE stok solüsyonu bir mezür içine alınarak üzerine 900 ml steril distile su eklendi.

%1'lik Agaroz Jel Hazırlanması

0,6 g agaroz tartılarak erlen içerisine konuldu. Üzerine son hacim 60 ml olacak şekilde 1X TBE tamponu ilave edilde ve mikrodalga fırında agaroz'un çözülmesi sağlandı. Çözünmüş agaroz içine 1 µl etidyum bromid eklendi. Hazırlanan jel, yatay mini jel kalıbı içerisine döküldü ve yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirildi ve jel donmaya bırakıldı. Jel katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkarılarak, jel örneklerin yüklenmesi için uygun hale getirildi.

%10'luk RPMI 1640 besiyerinin hazırlanışı

500 ml' lik besiyeri içerisinden 50 ml çekildi. Ardından sırası ile 50 ml FBS, 5 ml 200 mM'lık L-Glutamin, 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi. FBS, önceden 0,2µm'lik filtreden geçirilerek solüsyonun homojen olması sağlandı.

%1'lik RPMI 1640 besiyerinin hazırlanışı

500 ml' lik besiyeri içerisinden 5 ml çekildi. Ardından sırası ile 5 ml FBS, 5 ml 200 mM'lık L-Glutamin, 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

Hücre lizis solüsyonunun hazırlanışı

10X konsantrasyon değerindeki solüsyondan 1ml alınarak distile su ile 10 ml'e tamamlandı. Böylece 1X'lik çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu.

PMSF solüsyonu

0,3484 g PMSF hassas terazide tartıldı ve 10 ml izopropanol içerisinde çözüldü.

%10'luk SDS hazırlanışı

1g Sodyumdodesilsülfat tartılarak 10 ml. distile su içerisinde çözüldü. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Akrilamid/Bisakrilamid solüsyonu

14,5 g akrilamid ve 0,5 g bisakrilamid tartılarak 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. Böylece akrilamidin son konsantrasyonu %29, bisakrilamidin ise %1 oldu. Amber renkli şişe içerisinde saklandı.

1,5 M Tris buffer (pH:8,8) (150 ml)

27,23 g Tris base tartıldıktan sonra 80 ml suda çözüldü. Ardından pH metre ile pH 8,8'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim distile su ile 150 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklandı.

0,5 M Tris buffer (pH:6,8) (100 ml)

6 g Tris base tartıldıktan sonra 60 ml suda çözdürüldü. pH değeri 6,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklandı.

10X Running buffer (1000 ml)

30,3 g Tris base, 144 g glisin ve 10 ml %10'luk SDS 500 ml distile su içerisinde çözüldü. Ardından toplam hacim 1000 ml'e distile su ile tamamlandı. 1X'inin pH'sı 8,3'e ayarlandı.

10x Tris-Glisin stok solüsyonu

30,3 g tris base ve 144 g glisin tartılarak 1000 ml distile suda çözüldü.

Transfer buffer

100 ml 10X konsantrasyondaki Tris glisin stoğundan, ve 200 ml Metanol'den alınarak 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı. 1X'inin pH'sı 8,35'e ayarlandı.

Amonyum persülfat (APS) solüsyonu

100 mg APS, 1 ml suda çözülerek hazırlandı. APS her çalışma öncesinde yeniden taze olarak hazırlandı.

10X TBS solüsyonu

12,1 g Tris base ve 40 g NaCl tartılıp 500 ml suda çözüldü. 1X'inin pH'sı 7,4'e ayarlandı.

1X TBT-T solüsyonu

10X TBS'den 100 ml alınarak 1000 ml olacak şekilde üzeri distile su ile tamamlandı. Ardından 800µl Tween-20 ilave edildi. pH 7,4'e ayarlandı.

Primer antikor dilüsyon solüsyonu

10X konsantrasyondaki TBS 1X'e dilüe edildi. Ardından 10 ml alındı. Daha sonra %5 lik 0,5 g BSA ve %0,05'lik 5 µl sodyum azid çözeltisi ile karıştırıldı. Bu solüsyon ile primer antikor 1:1000 oranında dilüe edildi.

Sekonder antikor dilüsyon solüsyonu

1X TBS, %0,1 Tween20 ve yağsız süt tozu karıştırılarak hazırlanmıştır.

Membran bloklama solüsyonu

10 ml 1X TBS içerisinde %1 Tween20, ve %5 lik 0,5 g süttozu karıştırıldı.

Tris-Glisin SDS-Poliakrilamid Jel Konsantrasyonları

%6'lık Jel (Seperating Jel)

H₂O	5,3ml
%30 Akrilamid	2,0ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2,5ml
%10 SDS	100µl
%10 APS	100µl
TEMED	8µl

%10'luk Jel (Separating Jel)

H₂O	4,0ml
%30 Akrilamid	3,3ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2,5ml
%10 SDS	100µl
%10 APS	100µl
TEMED	4µl

%15'lik Jel (Separating Jel)

H₂O	2,3ml
%30 Akrilamid	5,0ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2,5
%10 SDS	100µl
%10 APS	100µl
TEMED	4µl

Üst Jel (Stacking)

H₂O	4,0ml
%30	1,0ml
Akrilamid	
1.5 M Tris	2,5
(pH 8.8)	
%10 SDS	50µl
%10 APS	50µl
TEMED	5µl

Hücre Dondurma Medium

100ml FBS içerisine 8,6 ml DMSO eklenerek şişenin kapağı değiştirilir. Ters düz edilerek 10 ml'lik falkon tüpleri alikotlanır ve -20°C'de saklanır.

3.5. Kullanılan Yöntemler**3.5.1. Hücre kültürü**

Bu çalışmada kullanılan LNCaP (Yabanıl tip p53) androjene duyarlı insan prostat kanseri hücre hattı Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji AD. Öğretim üyesi Prof.Dr. Levent Türkeri'den temin edilmiştir. LNCaP hücre kültürü, %10 inaktive edilmiş FBS, 200 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ile desteklenmiş RPMI besiyerinde %95'lik nem ve %5 CO₂'li, ortamda 37°C'de kültüre edilerek çoğaltıldı. LNCaP hücreleri, Metformin ve Memantin ile inkübe edilerek 48. saatteki etkin dozları belirlendi. İlaçlar apirojenik distile su içerisinde çözöldü.

Hücrelerin Çözölmesi, Pasajlanması ve Dondurulması

-80 °C'de saklanan hücreler oda sıcaklığına çıkarıldıkları andan itibaren dondurma medium'undaki DMSO'nun toksik etkisinden hemen kurtarılmak üzerine 3 ml. besiyeri ilave edilerek 2500 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Ardından 25cm² flasklara 5ml büyüme ortamı içerisinde ekilmiştir. Hücrelerin medium'u 2-3 günde bir yeni besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler konfluent olduklarında 1:4 ya da 1:5 oranında seyreltilerek pasajlanmıştır.

Deney basamakları aşağıda belirtildiği şekildedir,

1. Flaskın içerisindeki besiyeri atılır.
2. Flask steril PBS ile yıkanır.
3. Flasklara; 25cm² flask için 1-2mL, 75cm² flask için 3-5mL önceden 37°Cye ısıtılmış Tripsin/EDTA ilave edilir.
4. Flask 37°C inkübatörde 5 dakika bekletilir.
5. Flask yüzeyinden ayrılan hücreler 15 ml lik falkon tüplere aktarılır.
6. Tripsin inaktivasyonu için tüplere 5'er ml besiyeri ilave edilir.
7. Tüpler 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edilir.
8. Süpernatant atılır.
9. Hücre pelleti istenen miktarda besiyeri içerisinde süspanse edilir.
10. Hücre süspansiyonu sayılabilir, seyreltilerek flasklara ya da plaklara pasajlanabilir veya dondurulabilir.
11. Hücrelere dondurma medium'u eklenir ve pipetlenerek homojen hale getirilir.
12. -20°Cde bir saat bekletildikten sonra kryo tüpler kısa süreli kullanım için - 80°Cye, uzun süre saklanacaksa sıvı nitrojene kaldırılır.

Trypan Blue Canlılık Testi

Hücre ayırma, dondurma ya da çözme gibi potansiyel travmatik işlemlerin ardından canlı kalan hücrelerin oranını ölçmek için kullanılır. Canlılık testleri membran bütünlüğünün bozularak hücrenin, canlıyken geçirgen olmadığı bir boyayı alması esasına dayanmaktadır. Deneysel aşamalar aşağıda belirtilen şekildedir.

1-Hücre süspansiyonu 1:1 oranında % 0,4 trypan blue çözeltisi ile karıştırılır (100 µL hücre süspansiyonu+100 µL trypan blue). Hücreler trypan blue eklendikten sonra 1-2 dakika içerisinde sayılmalıdır. Aksi takdirde canlılıklarını kaybedip trypan blue geçirgen hale gelirler.

2-Boyalı ve boyasız hücrelerin tümü sayılır.

3-Boyanmayan hücrelerin yüzde oranı hesaplanır. Bu sayı hücre canlılığını ifade etmektedir.

Hücre Sayma-Hemositometre

Bir hücre süspansiyonunun konsantrasyonu hücreler optik olarak düz bir yüzeye konularak mikroskop altında sayılır. Tanımlanmış, derinliği belirli bir alan içindeki hücreler sayılır ve hücre konsantrasyonu hesaplanır.

Deneysel aşamalar aşağıda belirtilen şekildedir.

1-Hemositometrenin yüzeyi %70'lik EtOH ile temizlenir ve lamelin kenarları hafifçe ıslatılarak hemositometre yüzeyine yapışması sağlanır.

2-Hücre süspansiyonunun homojen olması sağlanır ve 10 µL örnek pipetle çekilir.

3-Hücre süspansiyonu hemositometreye aktarılır ve lamelin altına kapiller hareket yoluyla çekilmesi sağlanır.

4-Mikroskop 10X objektifte grid çizgilerine odaklanır. Hemositometrede görülen en büyük alan üç paralel çizgi ile sınırlanır. Bu alan 1 mm²'dir.

5-1 mm²'lik alan grid çizgileri kullanılarak sayılır. Hemositometrenin diğer bölmeside sayılır.

6-İki sayımın ortalaması alınır ve örneğin konsantrasyonu $c=n/v$ denklemi ile hesaplanır. c = hücre konsantrasyonu (hücre/ml), n =sayılan hücreler, v = sayılan hacim (ml).

3.5.2. Hücrelere ilaç uygulaması ve hücre canlılığının belirlenmesi

LNCaP hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10⁴ hücre/ kuyu olacak şekilde ekildi, bir gece %1'lik RPMI besiyerinde inkübe edilerek hücrelerin yapışmasını takiben besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra Metformin ve Memantin ayrı ayrı çeşitli konsantrasyonları ile hazırlanmış %10'luk RPMI besiyerinde 48 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonucunda her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu eklenerek hücreler 37°C'de 4 saat daha inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözünmesi için 100 µL DMSO eklenerek 30 dk inkübe edildi. Renk değişimi, mikropłaka okuyucusunda 570 nm dalga boyu ile belirlendi. Kimyasal ajanlar ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi.

3.5.3. Etkin ilaç dozu verilen hücrelerden protein izolasyonu

Metformin ve Memantin'in belirli dozları ile belirli sürelerde inkübe edilen LNCaP hücrelerine, 48 saatlik inkübasyon sürelerinin dolmasının ardından protein izolasyonu için; Hücrelerden ilaçlı besiyerleri uzaklaştırıldı ve soğuk PBS ile yıkandı. Ardından hücreler üzerindeki PBS çekilerek 1mM PMSF içeren 1X Hücre Lizis Buffer'dan 500 µl kondu. Hücreler buz üzerinde 5 dk inkübasyonunun ardından scraper ile kazınarak yerlerinden kaldırıldı ve ependorf tüplere alındı. Hücreler buz üzerinde insülin enjektörü ile 10-15 kez sonike edildikten sonra 13500 rpm'de +4 °C'de 15 dk santrifüjden sonra süpernatant yeni tüplere alındı. Proteinler tek kullanımlık alikotlandıktan sonra -80°C'ye kaldırıldı.

3.5.4. BCA kiti ile protein miktar tayini

LNCaP hücrelerine belirli dozlarda ilaç uygulanmasından sonra izole edilen proteinlerin miktarlarının tayini BCA protein ölçüm kiti ile belirlenen basamaklara göre gerçekleştirilmiştir. Bovine serum albumin (BSA) ile 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,025 ve 0 µg/ml konsantrasyonlarda saf su kullanılarak standart hazırlandı. Protein örnekleri ve 96 well plate'in her birine 25'er µl protein eklendi. Protein ölçüm kitinin içerisinde bulunan Reaktif B:A oranı 1:50 olacak şekilde hazırlandı. Bu reaktif karışımından her bir kuyuya 200'er µl eklendi. 37°C lik inkübatörde 30 dakika inkübasyondan sonra mikropate ELISA okuyucuda 563 nm dalga boyunda okutulmuş ve çıkan sonuca göre excel programında standart eğri çizilerek protein miktar hesaplamaları yapıldı.

3.5.5. Western Blot yöntemi ile protein düzeylerinin belirlenmesi

Elektroforezle molekül ağırlığına, büyüklüğüne ve yüküne göre ayrılmış kompleks bir karışım içinde hedeflenen bir proteini özgün bir şekilde saptamak için kullanılan en genel yöntem western blotting yöntemidir.

İlk aşamada, BCA kiti ile miktarları ve standart grafikleri belirlenen proteinler yükleme için hazırlandı. Bu proteinlerle aynı miktarda üzerlerine 2X konsantrasyon değerinde sample buffer'ları eklendi. Böylece protein örnekleri 1:1 oranında dilüe edilerek çalışma konsantrasyonları elde edildi. X konsantrasyonunda sample buffer da eklendikten sonra

protein örnekleri denatürasyon için 95°C'ye ayarlı ısıtıcı blokta 5 dk bekletildi ve örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra yükleme aşamasına geçildi. Akrilamid ve bisakrilamid polimerleşmesi ile, üst jel olan stacking ve alt jel olan seperating jellerin önceden hazırlanıp donması ile yükleme jeli oluşturuldu. Jele yüklenen protein örnekleri, 1X running buffer eklenmesi ile 150 V ve 250 mA de 90 dk boyunca yürütüldü.

Proteinler jel üzerinde moleküler ağırlıklarına göre yürütüldükten sonra güç kaynağı kapatıldı ve jel alındı. Jelin ıslak transfer yöntemi ile PVDF membrana transferleri gerçekleştirildi. Transfer kaseti tank içerisine dikey olarak konularak transfer buffer'ın eklenmesinin ardından 100 V ve 250 mA'de 75dk. boyunca transfer edildi. Aktarım aşamasından sonra membran aranan proteine özgü primer ve sekonder antikorlarla muamele edildi. Dilüe edilen primer antikorlar ile bir gece +4°C de, sekonder antikorla ise 1 saatlik inkübasyon gerçekleştirildi. Son aşamada ise membranın ECL Chemiluminescent HRP Western substrat ile Gel Logic 2200 Pro cihazı kullanılarak görüntülenmesi gerçekleştirildi.

3.5.6. Agaroz Jel Elektroforezi ile plazmid DNA'sının kontrolü/plazmid DNA'sının %1'lik jele yüklenmesi

%1'lik jel hazırlandıktan sonra jel tankı 1X TBE tamponu ile jelin üzerini örtecek şekilde konuldu. 2 µl plasmid DNA'sı 2 µl örnek yükleme tampunu ile karıştırılarak pipetaj yapıldı ve 4 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi. İzole edilen plazmid DNA'sı DNA ladder ile birlikte 100 V akımda 1 saat yürütüldü.

3.5.7. Plasmid DNA'sının kontrolü

Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, jel görüntüleme sisteminde UV ışık altında görüntülendi.

3.5.8. Crispr ile FOXA1 geninin knock-out edilmesi

PX330 Plasmid

Knock-out çalışmalarında kullanılan pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9

Plazmid'i kar amaçlı olmayan bir plazmid deposu olan addgene'den temin edilmiştir.

(<https://www.addgene.org>).

Plazmid'in temin edilmesinin ardından LB Agar'lı plateler üzerinde çoğaltılmıştır.

500ml. LB Agar için, (~25 Agar plate)

1- Aşağıdaki kimyasallar tartılarak LB Agar hazırlanır.

5g NaCl

5g Trypton

2.5g Yeast Extract

7.5g Agar

500ml. dH₂O eklenir ve son hacim 1lt.'ye tamamlanır.

2-Tüm kimyasalların çözünmesi için karıştırılır. Çözünmeyen ve toz halinde kalan kimyasallar otoklavlama sırasında karamelize olmasına neden olur. Ardından üzeri alüminyum folyo ve otoklav bandı ile kapatılarak; 20 dakika otoklav-sıvı ayarlarında otoklavlanır.

3-Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 55 °C'ye kadar soğuması beklenir. (Bu işlem su banyosunda veya oda sıcaklığında bir süre bekletilerek yapılabilir.

4-Plate'leri dökerken, bünsen beki yada ateş yakınında çalışarak benç alanının steril olması sağlanır.

5-Solüsyona çalışma için uygun olan antibiyotik eklenir ve karıştırılır. (1000X'lik antibiyotik stoğuyla çalışılıyor ise 500 µL eklenir.)

6- ~20mL LB agar polistiren petrilere dökülür. Petrilerin kapakları kapatılır ve Agar'ın katılaşması için 30-60 dk. beklenir ve petriler ters çevrilir. Gerekli etiketlemeler yapılarak, parafilm'le kaplanır ve kullanılıncaya kadar 4°C.'ye kaldırılır.

3.5.9. Plazmidin LB Broth’da çoğaltılması

Antibiyotik Konsantrasyonları

Sık Kullanılan Antibiyotikler	Tavsiye Edilen Konsantrasyonları
Ampisilin	100 µg/mL
Bleosin	5 µg/mL
Karbenisilin	100 µg/mL
Kloramfenikol	25 µg/mL
Kumermicin	25 µg/mL
Gentamisin	10 µg/mL
Kanamisin	50 µg/mL
Spektinomisin	50 µg/mL
Tetrasiklin	10 µg/mL

FOXA-1 geninin knock-out edilmesinde Ran ve ark.(2013)’nın metodu kullanılmıştır.

3.5.10. Overnight sıvı kültürü yapılan plazmid inokülasyonu

1- Sıvı LB hazırlanır, 400 ml.lik LB için aşağıda belirtilen kimyasallar 500ml.lik cam şişe içerisine tartılır.

-4g NaCl

-4g Trypton

-2g Yeast Extract

-400 ml.’ye kadar dH₂O

2- Cam şişenin kapağı gevşek bırakılarak otoklavlanır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenir ve içerisine yukarıda belirtilen uygun miktarda antibiyotik eklenir.

3-Steril bir pipet ucu veya bir kürdan yardımıyla LB agar üzerindeki tek koloni alınarak sıvı LB+Antibiyotik karışımına inoküle edilir.

4-İnoküle kültür’ün üzeri pamuk ve alüminyum folyo ile kaplanarak 12-18 saat 37°C’de çalkalamalı inkübatörde bırakılır.

5-Overnight inkübasyonun ardından büyüme için kontrol edilir. Kültürdeki bulanıklık ile bakteri çoğalması kontrol edilir. (Negatif kontrol olarak hiç bir inokülasyon yapılmamış LB media+Antibiyotik kullanılabilir. Overnight inkübasyonun ardından kültür renginde bir

değişiklik olmamalıdır.) Bu aşamanın ardından bakteriyal kültürden plazmid DNA'sı izole edilir.

3.5.11. Plazmid DNA'sının izolasyonu

Plazmid DNA'sının izole edilmesi için bakteriyal hücre ve plazmid DNA'sının ayrılması gerekmektedir. Bu nedenle host bakteriyal hücrenin proteinleri, RNA'sı ve kromozomal DNA'sının parçalanması ve ayrılması gerekmektedir. Bu işlem mini-prep. olarak adlandırılır. Mini-prep'in yanı sıra midi, maxi ve mega- prep. protokolleri de bulunmaktadır. Aralarındaki fark ise başlangıçta kullanılan sıvı kültür hacmi ve deney sonunda izole edilen plazmid DNA'sı miktarındaki farktır.

Plazmid DNA'sının izolasyonu GeneJet Plazmid DNA İzolasyon kiti kullanılarak kısaca aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır.

-Bütün pürifikasyon aşamaları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

-Santifüj aşamaları ise $>12000 \times g$ rotor tipine göre 10 000-14 000rpm devir hızı olan santrifüjlerde yapılmalıdır.

Yüksek kopya sayılı plazmid'ler için 1-5 ml. LB E.coli sıvı kültürü, düşük kopya sayılı plazmid'ler için ise 10ml. sıvı kültür kullanılır.

1-Öncelikle bakteriyal kültür harvest edilir. 8000rpm.de 2dk., oda sıcaklığında santrifüj edilir ve süpernatant atılır.

2-Pellet edilmiş hücrelere:

-250 µl Resüspansiyon Solüsyonu eklenir ve vortekslenir.

-250 µl Lizis Solüsyonu eklenir ve tüp 4-6 kez alt-üst edilir.

-350 µl Nötralizasyon Solüsyonu eklenir ve tüp 4-6 kez alt-üst edilir.

5dk. santrifüj edilir.

3-Süpernatant kolona transfer edilerek 1 dakika santrifüj edilir.

4-Kolon 5000 µl. Yıkama Solüsyonu ile 1dk. santrifüj edilerek yıkanır ve alt tüpte kalan sıvı atılır. Bu aşama 2 kere tekrar edilir. Boş kolon 1 dk. santrifüj edilir.

5-Kolon yeni bir tüpe transfer edilir 50 µl Elüsyon Buffer eklenerek 2 dakika inkübe edilir.

Ardından 2 dakika santrifüj edilerek alt tüpte kalan sıvı alınır.

Plazmid Bilgileri

Çizelge 3.1. PX330 vektör bilgileri
PX330

Vektör backbone: pUC orjinli vektör

Vektör tipi: Memeli Ekspresyon, CRISPR

Bakteriyal Direnç: Ampisilin

Büyüme Sıcaklığı: 37°C

Büyüme Suşu: Stbl3

Kopya Sayısı: High Copy

Çizelge 3.2. PX330 Restriksiyon enzimi ile klonlama bilgileri

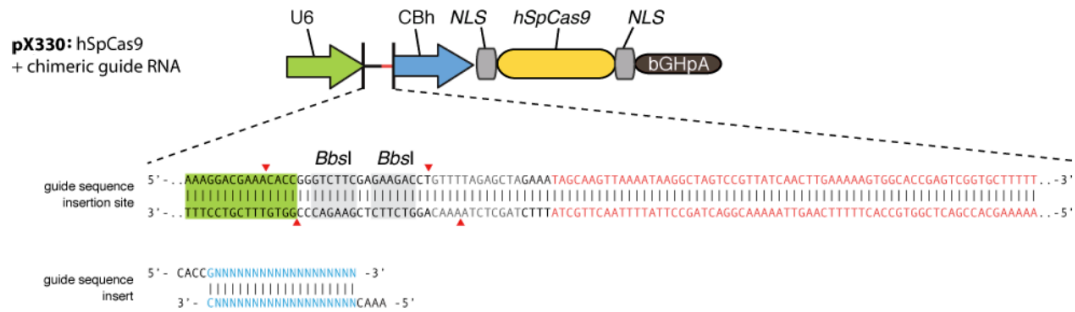
Restriksiyon Enzimi ile Klonlama Metodu

5' cloning site AgeI (not destroyed)

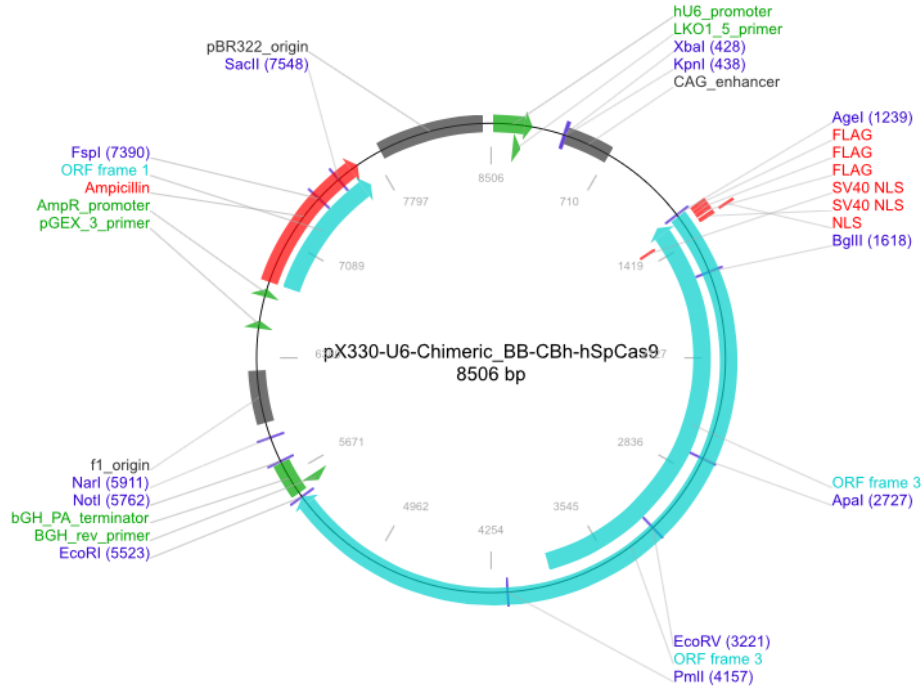
3' cloning site EcoRI (not destroyed)

5' sequencing primer agggatggttggttggtggg

3' sequencing primer CCAATCCTCCCCCTTGCTGT



Şekil 3.1. PX330 Plazmid kesim bölgesi (<https://www.addgene.org>).



Şekil 3.2. PX330 Genom Haritası (<https://www.addgene.org>).

3.5.12. Oligo-gRNA Design

Modifiye edilmesi istenen genin hedef bölgelerine yönlendirilmek üzere kullanılan sgRNA'nın tasarımında kullanılmak üzere pek çok farklı program bulunmaktadır. Bunlardan bazıları çizelge 3.3'de belirtilen şekildedir:

Çizelge 3.3. sgRNA design'ında kullanılan araçlar ve internet siteleri

1- Optimized CRISPR Design	http://crispr.mit.edu
2- sgRNA Scorer	https://crispr.med.harvard.edu/sgRNAScorer/
3- sgRNA Designer	http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design
4- ChopChop web tool	https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/index.php
5- E-CRISP	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/
6- WTSI Genome Editing (WGE) portal	http://www.sanger.ac.uk/htgt/wge/
7- CRISPR Finder	http://www.sanger.ac.uk/htgt/wge/find_crisprs
8- CRISPR Scan	http://www.crisprscan.org
9- RepeatMasker	http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker
10-WatCut	http://watcut.uwaterloo.ca/template.php
11-Tide	https://tide.nki.nl
12- ZifIt	http://zifit.partners.org/ZiFiT/
13-CRISPOR	http://crispor.tefor.net
14-Breaking-Cas	http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/

Bu tez çalışmasında kullanılan sgRNA'lar <http://crispr.mit.edu> adresi kullanılarak yapılmıştır.

3.5.13. CRISPR/Cas9 aşamaları

1-Annealing

Çizelge 3.4. PCR’da kullanılan tepkime bileşenleri

Top oligo 1 µl

Bottom oligo 1 µl

T4 ligase buffer 1 µl

T4 PNK 1 µl

dH₂O 6 µl

Çizelge 3.5. Annealing PCR koşulları

37 °C 30 dakika

95°C 5 dakika

25°C 5 dakika

2-Crispr vektörüne klonlama-Ligation

3-Plasmid Safe DNA Uygulaması

Çizelge 3.6. Plasmid Safe DNA Uygulamasında kullanılan bileşenler

Plasmid safe dnas buffer 1.5 µl

PCR ürünü 11 µl

ATP 1.5 µl

Plasmid safe nuclease 1 µl

Çizelge 3.7. Plasmid Safe Uygulamasındaki Reaksiyon koşulları

37 °C	30 dakika
--------------	------------------

70°C	30 dakika
-------------	------------------

4-Transformasyon:

Isı şoku yöntemiyle yapılmıştır.

-Stbl3 kompetan E.coli hücresi 20 µl

-Ligasyon ürünü 2 µl

10 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 42°C sıcak su banyosunda 30 saniye bekletilerek ardından 5 dakika tekrar buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra 100 µl SOC media eklenerek; bütün karışım ampisilin'li LB agar'lı plate'ler üzerine L çubuk yardımıyla ekilmiş ve 37°C etüvde overnight inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından plate'den tek kolonilerden 3 koloni seçilerek; 5ml.LB ve Ampisilin içeren sıvı besiyerine aktarılarak, izolat 37°C'de çalkalamalı inkübatörde overnight kültür edilmiş ve ertesi gün plasmid DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.5.14. LNCaP hücre hattı transfeksiyonu

Maxi-prep ile Crispr ürünü plasmid DNA'sı izole edildikten sonra hücre hattının transfeksiyonu aşamasına geçilmiştir. 6 well plate üzerine kuyu başına 8×10^5 sayısında LNCaP hücreleri RPMI ve gerekli diğer maddelerle kuyulara aktarılmıştır. Transfeksiyon için; Öncelikle CRISPR ürünü (2 µl) ve OPTIMEM besiyeri (198 µl) karışımı ve Lipofectamin (9 µl)-OPTIMEM(191 µl) karışımı ayrı ayrı vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılarak ardından bu iki ayrı karışım birleştirilerek vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 6'lık well plate'deki hücreler üzerine eklenerek 37°C' de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Ertesi gün hücreler, inverted mikroskop altında tek hücre düşürülünceye kadar çeşitli dilüsyonlarda 96'lık plate lere ekim yapılmıştır. Limitleyici dilüsyon ile ayrılan hücreler %70 confluent olunca sırasıyla 24'lük, 12'lik ve 6'lık well plate'lere ekilmiştir. Knock-out'un en etkili olduğu hücre popülasyonundan diğer deneysel aşamalara devam edilmesi

için, bu hücrelerden protein izole edilerek, BCA ile protein miktar tayini yapılmış ve ardından dot-blot ve western blot ile FOXA1 protein ekspresyonunun en az görüldüğü hücre klonu seçilmiştir ve diğer deneysel aşamalara bu klonla devam edilmiştir.

Bu genomu editlenmiş hücre hattı üzerinden; optimal dozunu belirlenen Metformin ve Memantin verilerek, ilgili proteinlerin ekspresyonlarının belirlenmesi için Western blotting yapılmıştır.

3.5.15. Limitleyici dilüsyonla monoklonal hücre popülasyonunun izolasyonu

Lentiviral bir vektörle hücre hattının transfeksiyonunun ardından heterojen poliklonal bir hücre popülasyonu elde edilmiş olur. Bu heterojen hücre havuzundaki selektif baskı zamanla daha az ekspresse olan klonların seçilmesine neden olabilir. Limitleyici dilüsyonla monoklonal hücre hattının elde edilmesi daha stabil transgenik ekspresyon sağlayabilmektedir. Monoklonal hücre popülasyonlarının elde edilmesinde kullanılan diğer metodlar ise tek hücre sorting-ayırımı ve tek hücrelerin klonlama silindirleri ile ayrılmasıdır.

Protokolün diğer aşamaları ise aşağıda belirtilmiştir:

1-Hücreler tripsinlenerek kaldırılır ve 3000 rpm’de 5 dk. Santrifüj edilir. Hücrelerin kümelenmesini engellemek üzere hücreler 0.45 µm’luk steril filtreden geçirilir yada serolojik pipetle hızlı pipetaj yapılır. Homojen hücre solüsyonunun hemositometre yada diğer hücre sayım yöntemleri ile konsantrasyonu belirlenir.

2-Hücreler homojen solüsyondan, koşullandırılmış medium’a mL başına 5 hücre olacak şekilde yeni bir solüsyona alınır. Ekilecek her 96 kuyulu plate için bu solüsyondan yaklaşık 10mL olması gerekmektedir.

3- Hazırlanan solüsyondan kuyu başına 100 µL olacak şekilde 96’lık plate’e ekim yapılır ve bu şekilde kuyu başına ortalama 0,5 hücre ekilmiş olur. Kuyu başına 0,5 hücrenin ekilmesiyle birlikte bazı kuyulara tek hücre ekilmiş olur ve kuyulara bir hücreden fazla hücre düşmüş olması ihtimali azaltılmış olur.

4-Hücreler 7-14 gün boyunca inkübatörde bırakılır ve 7.günden itibaren plate’ler taranarak

kolonilere bakılır. Herhangi bir koloni olmaması halinde yukarıdaki basamaklar tekrarlanır.

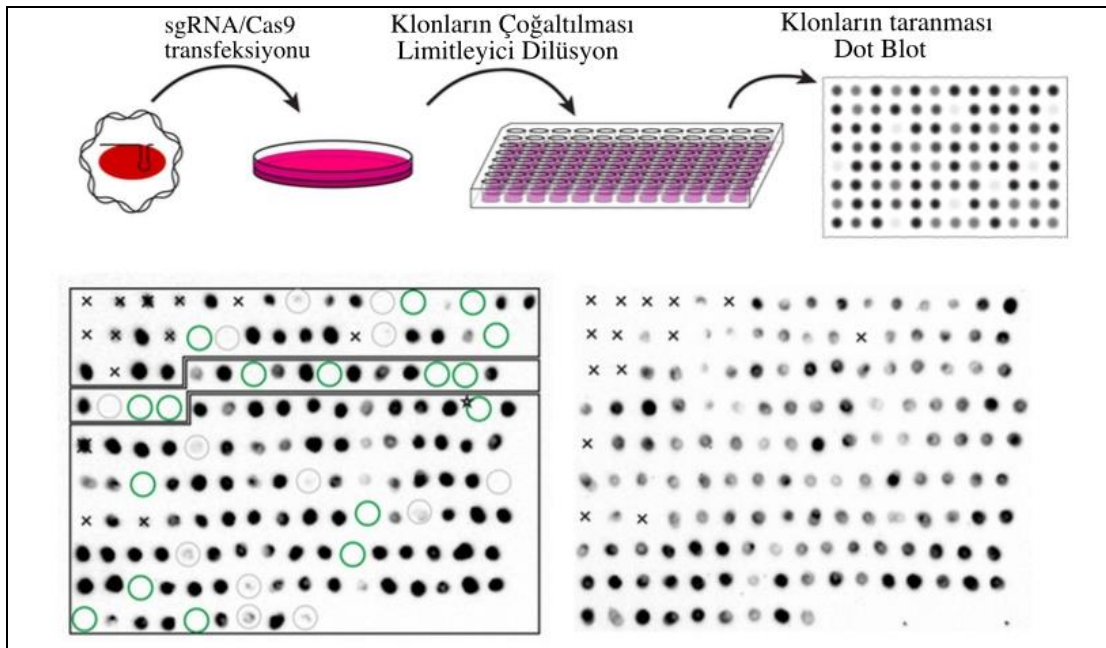
5- Bütün plate taranarak içerisinde bir tane hücre klonu olan kuyular belirlenir. İçerisinde bir hücreden daha fazla sayıda hücre düşen kuyularda birden fazla klon olacaktır. Bu kuyular çalışmadan çıkarılır.

6-Hücreler çoğaldıktan ve konfluent hale geldikten sonra tripsinlenerek daha büyük plate'lere geçirilir. Sırasıyla 24-12-6'lık kuyulara aktarılır.

Monoklonal hücre hatları başarılı bir şekilde çoğaltıldıktan sonra, Transgenik ekspresyon ve diğer fenotiplerin taranması gerekmektedir. Bu noktada Western blotlama en düşük ekspresyona sahip hücre klonu arasından diğer deneysel aşamalara devam edilmiştir.

3.5.16. Dot Blotlama

Limitleyici Dilüsyonun ardından Dot-blot ve Western blotlama ile en düşük gen ekspresyonuna sahip hücre klonlarının seçilmesi işlemine geçilmiştir.



Şekil 3.5. Knock-out hatların protein dot-blot ile identifikasyonu. Transfeksiyonun ardından hücreler Limitleyici dilüsyonla 96'lık plate'e ekilmiş, ardından klonlar izole edilerek büyümeleri sağlanmıştır. Klonal popülasyonlar izole edilen protein lizatı PVDF membran üzerine blotlanarak, FOXA1 ekspresyonları kontrol edilmiştir. (Estep ve ve diğerleri, 2016)

Protokolün diğerk aşamaları ise aşağıda belirtilmiştir.

1-Yüklenecek örnekler parafilm üzerinde sample buffer ile karıştırılır.

2-PVDF membran kurşun kalemle eşit parçalara bölünür.

3-Membran 15 sn.%100 Metanolde ıslatılır ve ardından 2 dakila distile su ve 5 dakika TBS-T ile yıkanır.

4-Kuru Whatman filtre kağıdı üzerinde ön ıslatma yapılmış membran konularak örnekler yüklenir.

5-Yaklaşık 1.5 saat boyunca oda sıcaklığında kurutulur.

6-1 Saat boyunca %1 BSA ile bloklama yapılır ve ardından membran 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanır.

7-Primer antibody ile 1 saat boyunca oda sıcaklığına muamele edilir. Ardından membran 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanır.

8-Membran 30 dakika boyunca Sekonder antibody ile inkübe edilir, ardından 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanır.

9-Membran, Western HRP Chemiluminiscent görüntüleme solüsyonu ile 5dk. İnkübasyonunun ardından görüntülenir.

4. BULGULAR

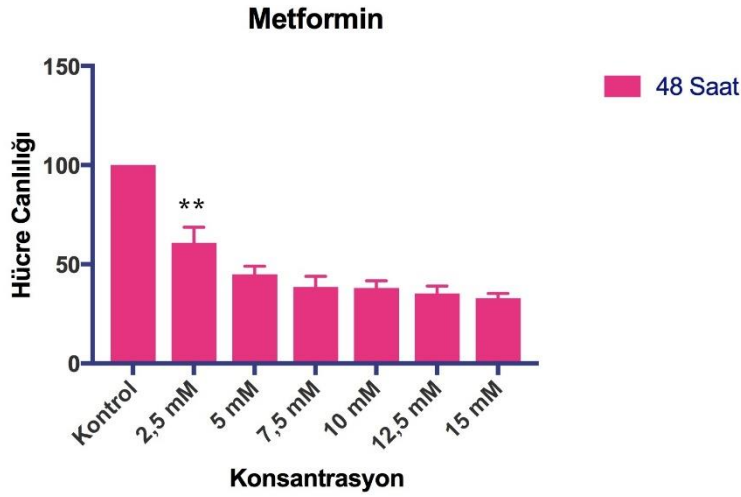
4.1. MTT Sonuçlarının Değerlendirilmesi

MTT testinin protokolü ilk kez Mossman tarafından 1983 yılında belirlenmiştir. Bu yöntem sağlıklı hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır (Mosmann vd, 1983). Bu reaksiyon bir mitokondriyal enzim olan suksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması ile soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşür. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır (Fotokis ve diğerleri, 2006).

4.1.1. Etkin Metformin dozunun belirlenmesi

96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde LNCaP hücreleri ekilerek, 2,5 mM – 15 mM doz aralığında farklı Metformin konsantrasyonları 48 saat süre ile inkübe edildi.

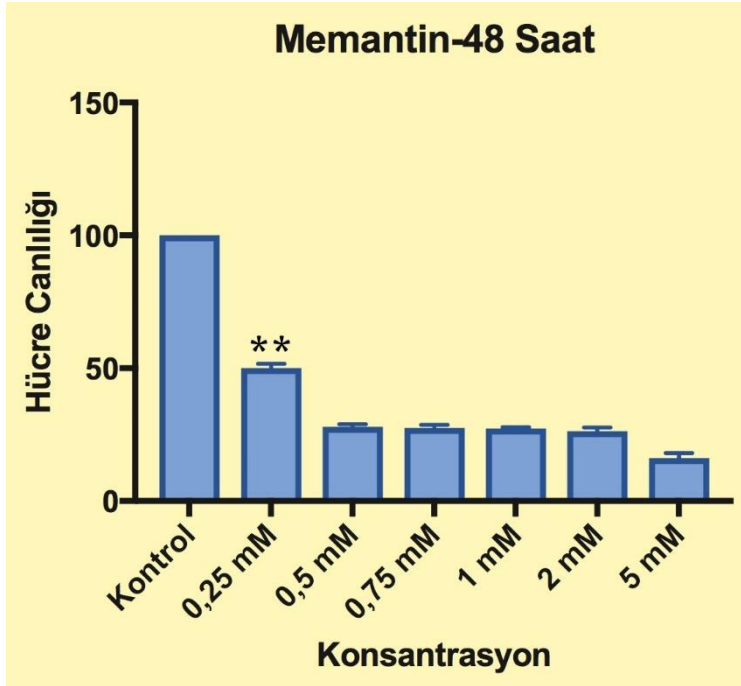
Şekil 4.1’de LNCaP hücrelerinin Metformin ile belirtilen dozlarda sırası ile 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda hücre canlılıkları üzerine olan etkileri gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre 48. saatteki hücrelerin yarısını öldürdüğü doz olan IC_{50} değeri 2,5mM olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. LNCaP hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 2,5 – 15 mM konsantrasyon aralığında Metformin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları (Graphpad Prism 7 programı kullanılarak belirlenmiştir).

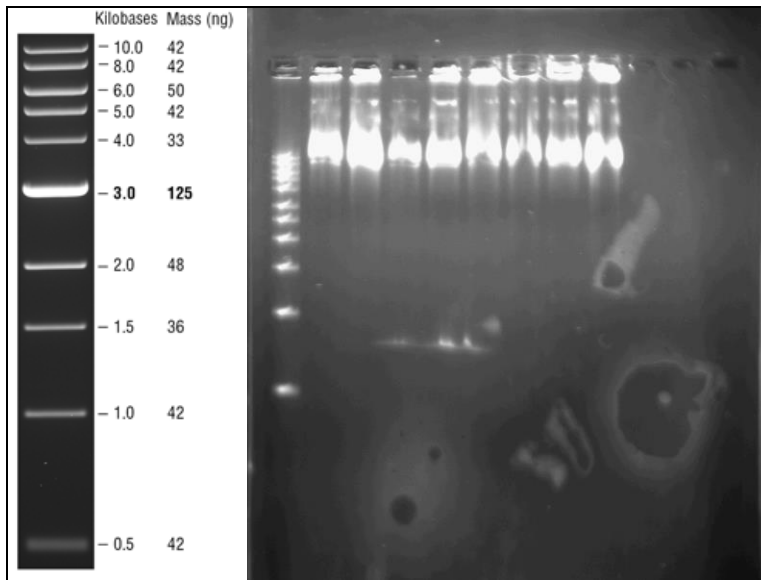
4.1.2. Etkin Memantin dozunun belirlenmesi

LNCaP hücrelerinde Memantin'in etkin dozunun belirlenmesi için 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde LNCaP hücreleri ekilerek 0,25 mM – 5 mM doz aralığında farklı Memantin konsantrasyonları 48 saat süre ile inkübe edildi. Sonuçlarımıza göre 48. saatteki hücrelerin yarısını öldürdüğü doz olan IC_{50} değeri 0,25mM olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. LNCaP hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 0,25-5 mM konsantrasyon aralığında Memantin'in 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı (Graphpad Prism 7 programı kullanılarak belirlenmiştir).

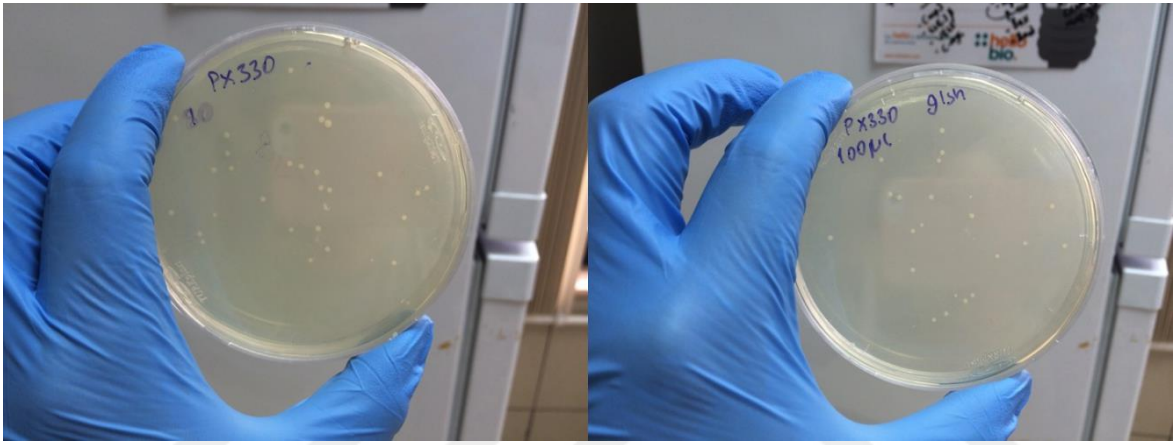
4.2. Plazmid'in Agaroz Jel Elektroforezi ile Konfirmasyonu



Resim 4.1. Plazmid DNA'sının %1'lik agaroz jelde yürütülmesi

4.3. Transformasyon Sonrası Overnight Kültürü Yapılan LB-Ampisilin Plate

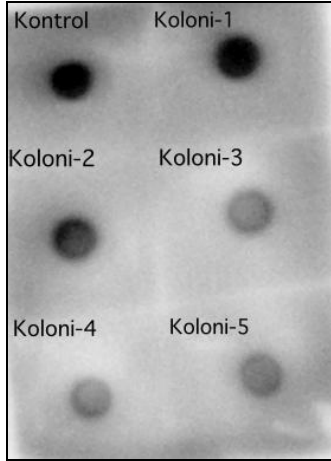
Isı şoku yöntemi ile transforme edilen PCR ürünü ve Stbl3 suşu kompetan *E.coli* 10 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra, 42°C sıcak su banyosunda 30 saniye bekletilecek ardından 5 dakika tekrar buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra 100 µl SOC media eklenerek; bütün karışım ampisilin'li LB agar'lı plate'ler üzerine L çubuk yardımıyla ekilmiş ve 37°C etüvde overnight inkübasyona bırakılmıştır.



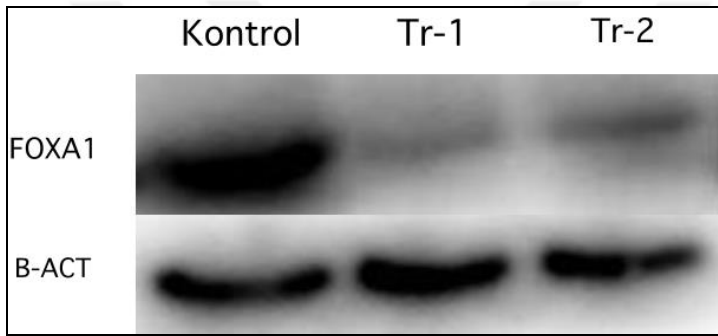
Resim 4.2. 80-100 µl transformasyon ürünü içeren LB-Ampisilin platelerin overnight inkübasyon sonrası tek koloni oluşturmaları

4.4. Dot Blot ve Western Blot ile Limitleyici Dilisyon Sonrası FOXA-1 Knock-Out Hücre Klonunun Seçilmesi

Lipofektamin 3000 kullanılarak transfekte edilen LNCap hücreleri, limitleyici dilüsyon ile tek koloni halinde seçildikten sonra sırasıyla 24,12 ve 6 kuyulu plate'e ekim yapıldıktan sonra, protein izolasyonu yapılmış ve ardından önce dot blot ile daha sonrada western blot ile FOXA1 gen knock-out'u protein düzeyinde doğrulanmıştır.



Resim 4.3. FOXA1 knock-out yapılmasının dot blot ile protein düzeyinde confirmasyonu



Resim 4.4. FOXA1 knock-out yapılmasının western blot ile protein düzeyinde confirmasyonu

4.5. Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

LNCaP hücre hattındaki protein ifadenme profilleri

Protein ekspresyonu incelenen genler:

Apoptozda görevli CASP-3, BCL-2, BAX, SURVIVIN

Glukoz metabolizması üzerine etkileri için GSK-3

Kanserle ilişkili proliferasyondaki görevleri için CCND1, c-MYC, B-Catenin

mTORC1-MEK/ERK yolağının önemli bir noktasında bulunan hücre döngüsünde görevli CDK4

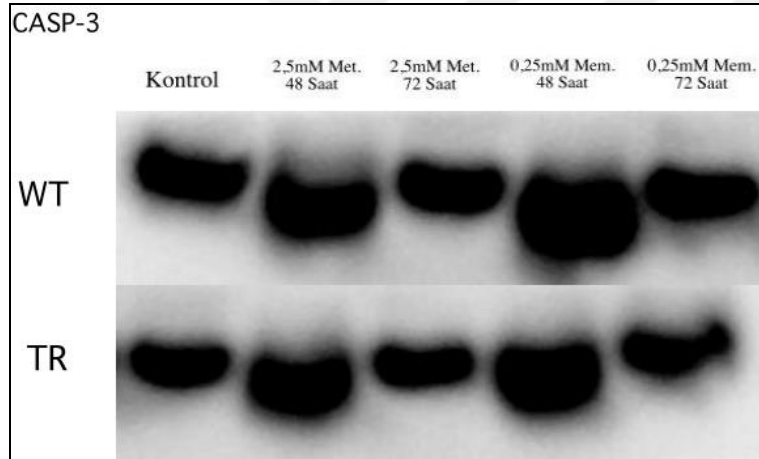
Angiogenesis için: HIF1A, VEGF-A;

Ayrıca Fibronektin ve İntegrin protein ekspresyonları western blotlama ile incelenmiştir.

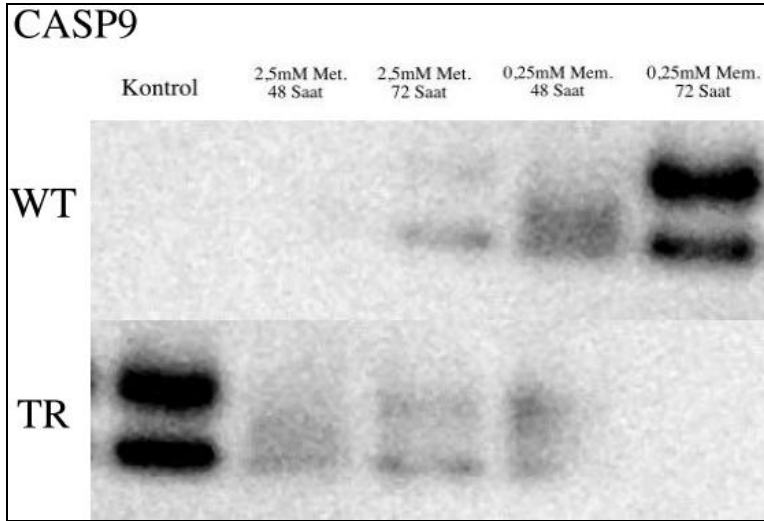
Çalışma tasarımı:

1. Untreated kontrol LNCaP
2. LNCaP + Metformin-48 Saat
3. LNCaP + Metformin-72 Saat
4. LNCaP + Memantin-48 Saat
5. LNCaP + Memantin-72 Saat
6. LNCaP (Foxa1 knock-out)-Untreated
7. LNCaP (Foxa1 knock-out)+Metformin-48 Saat
8. LNCaP (Foxa1 knock-out)+Metformin-72 Saat
9. LNCaP (Foxa1 knock-out)+Memantin-48 Saat
10. LNCaP (Foxa1 knock-out)+Memantin-72 Saat

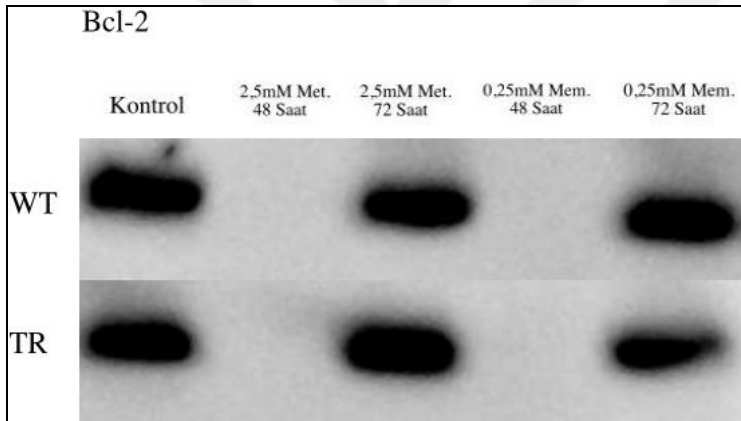
Çalışmamızda öncelikle apoptotik yolda görevli genlerin Casp-3, Bcl-2, Survivin, Bax protein ifadelerindeki değişimler incelenmiştir.



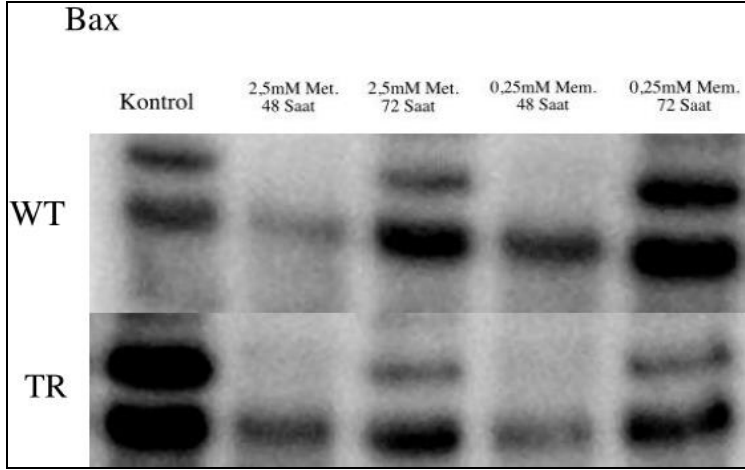
Resim 4.5. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte CASP3 protein ifadenmesine etkisi



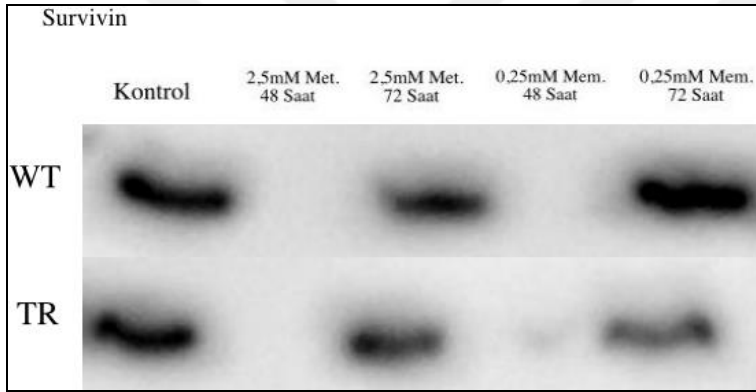
Resim 4.6. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte CASP9 protein ifadenmesine etkisi



Resim 4.7. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte BCL-2 protein ifadenmesine etkisi



Resim 4.8. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte BAX protein ifadenmesine etkisi

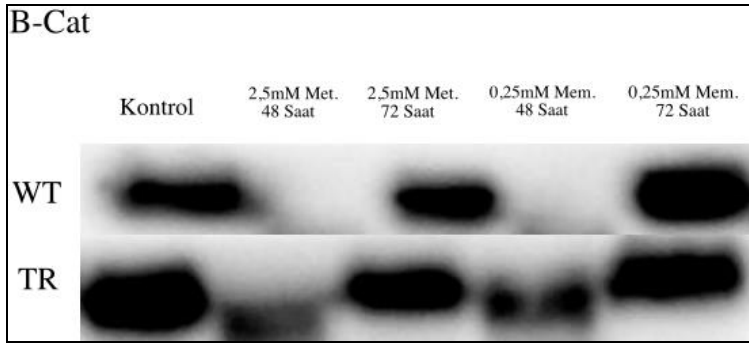


Resim 4.9. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte SURVIVIN protein ifadenmesine etkisi

Metformin ve Memantin'in 48.saatte anti-apoptotik Bcl-2 ve Survivin ekspresyonlarını baskıladığı, Casp-3 protein ekspresyonunda 48.saatte artış görüldüğü bu nedenle hücreyi kaspaz aracılı apoptoza yönlendirdiği görülmektedir. Ancak 72.saatte Bcl-2, Survivin ve Casp-3 seviyesinin tekrar kontrole yakın bir ifadenme yaptığı görülmektedir (Resim 4.7. ve Resim 4.9.)Çalışmamızda 48.saatte hücre apoptozunun Casp-3 tarafından indüklendiği, anti-apoptotik Bcl-2'nin protein ekspresyonunun ise baskılandığı görülmüştür. Yaptığımız bu çalışmada Bax/Bcl-2 oranındaki artışa bağlı olarak apoptozun tetiklendiği belirlenmiştir. Metformin ve Memantin'in Bcl-2 antiapoptotik proteininin ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu ve pro-apoptotik Bax'ın ekspresyonunda artışa yol açtığı belirlenmiştir.

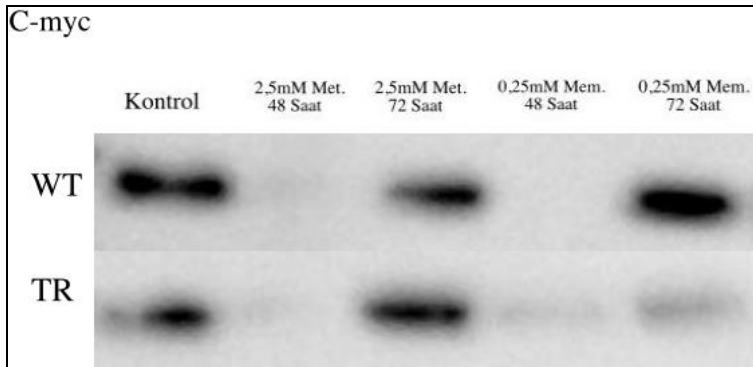
Metformin ve Memantin'in hücrelerde Bax-aracılı mitokondriyel apoptozu indüklediği ve bu etkinin 72.saatte de artarak devam ettiği belirlenmiştir (Resim 4.8.).

FOXA1 geninin knock-out edilmesi ise hücrelerden Casp-3, Bcl-2, Survivin ekspresyonları üzerinde wild type'a göre herhangi bir değişiklik yaratmazken, Bax ve Casp-9 proteinlerinin ekspresyonlarını arttırmıştır.



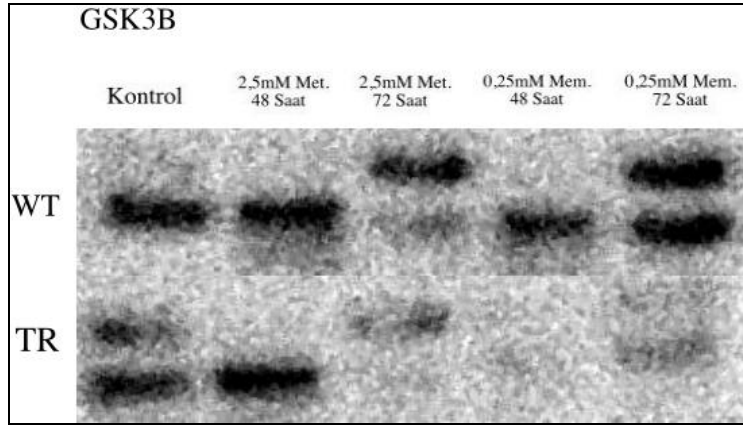
Resim 4.10. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte B-Catenin protein ifadenmesine etkisi

B-Catenin protein ekspresyonu Metformin ve Memantin ilaç uygulaması ile 48.saatte azalmakta ancak 72.saatte tekrar artış göstermektedir. FOXA1 geninin knock-out edilmesi ile birlikte 48.saatte görülen inhibisyon etkisinin azaldığı gözlenmektedir (Resim 4.10.).



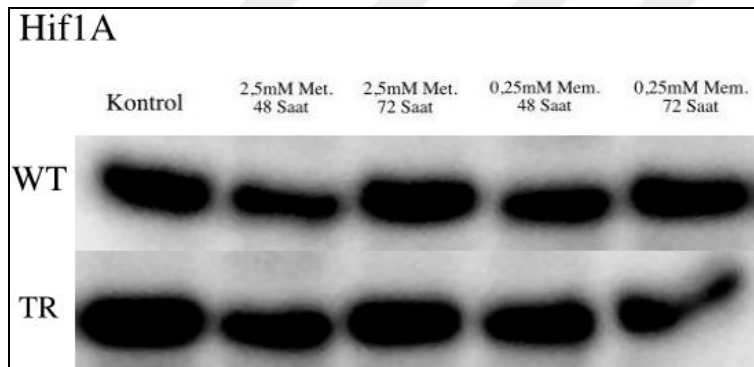
Resim 4.11. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte C-MYC protein ifadenmesine etkisi

Metformin ve Memantin'in apoptotik protein ekspresyonları üzerine etkileri ile tutarlı olarak yine 48.saatte kanser ilişkili hücre proliferasyonunu baskılayarak C-myc protein ekspresyonunu azaltıcı etki göstermişlerdir. FOXA1 geninin knock-out edilmesi C-myc ekspresyonu üzerindeki etkisini değiştirmemiştir (Resim 4.11.).

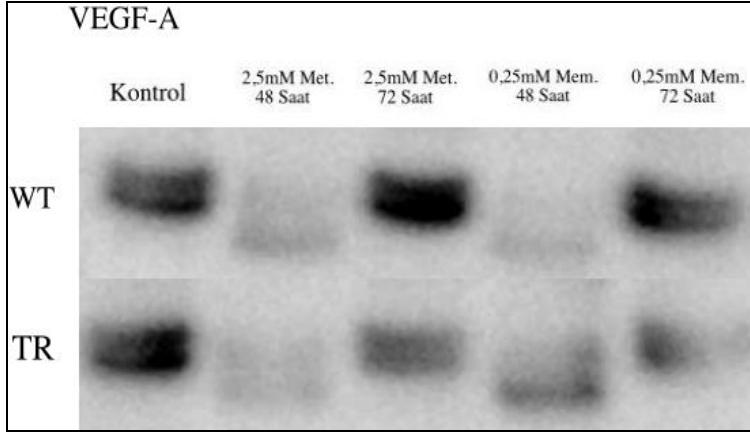


Resim 4.12. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte GSK-3B protein ifadenmesine etkisi

Metformin ve Memantin uygulamasının GSK3B protein ekspresyonunu değiştirmemektedir. Ancak FOXA1 geni knock-out edilen hücrelere uygulanan Memantin 48.saat ve 72. saatte GSK3B protein ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (Resim 4.12.).

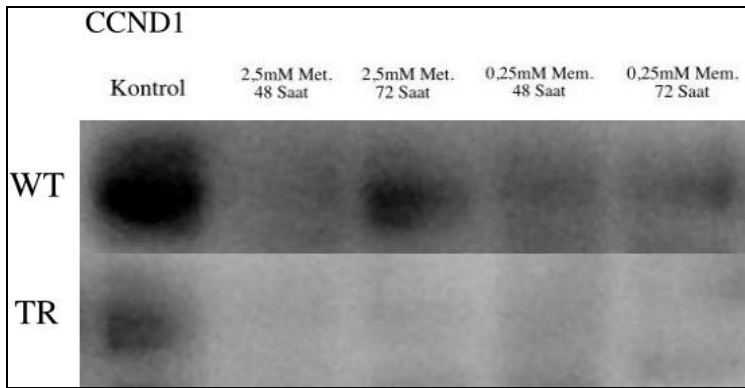


Resim 4.13. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte HIF1A protein ifadenmesine etkisi



Resim 4.14. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte VEGFA protein ifadenmesine etkisi

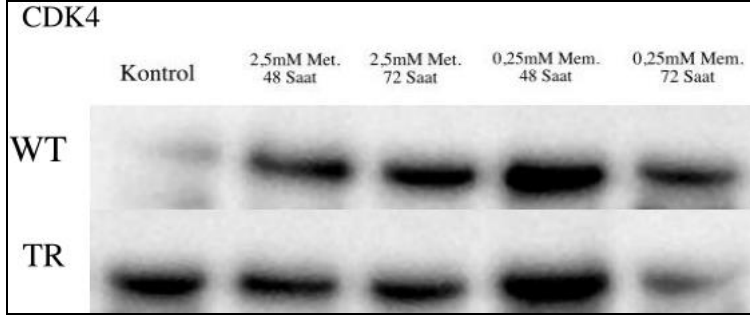
Metformin ve Memantin'in anti-anjiogenik etkilerinin belirlenmesi için HIF1A ve VEGFA protein ekspresyonları incelenmiştir. Metformin ve Memantin; HIF1A ekspresyonlarında herhangi bir değişiklik yaratmamıştır. FOXA1 geninin knock-out edilmesinin de HIF1A ekspresyonu üzerinde bir etkisi görülmemiştir. Metformin ve Memantin anti-anjiogenik etkilerini HIF1A üzerinde değil ancak VEGFA üzerinde 48.saatlerde ekspresyonlarını azaltmışlardır. 72.Saatlerde VEGFA ekspresyonu tekrar artmaya başlamıştır (Resim 4.13. Resim 4.14.).



Resim 4.15. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte CCND1 protein ifadenmesine etkisi

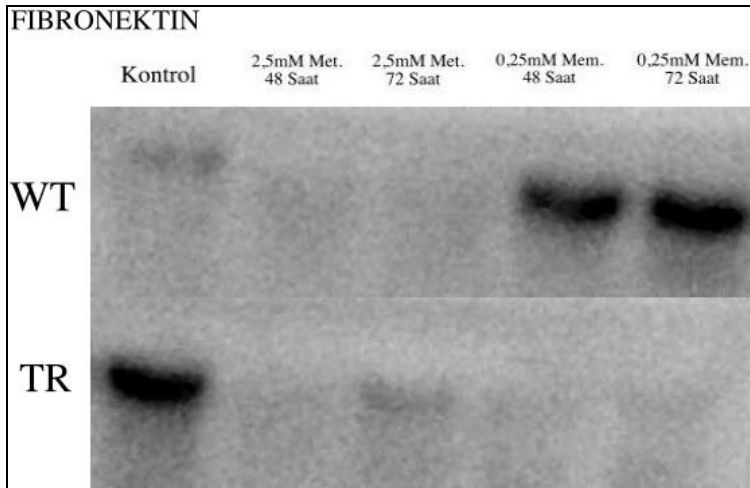
CCND1 (Siklin D1) protein ekspresyonunun Metformin uygulanan LNCaP hücrelerinde zamana bağlı olarak/kontrole göre azaldığı görülmüştür. Hücre döngüsünün kontrolünde görevli Siklin D1 protein ekspresyonu Metformin ve Memantin tarafından azaltılmıştır. 48.saatlerde ekspresyonun azalmasının ardından 72.saatte tekrar CCND1 ekspresyonunun

arttığı görülmüştür. FOXA1 geni knock-out edilen LNCap hücrelerinde ise Metformin ve Memantin uygulanmadan önce de Siklin D1 protein ekspresyonu azaldığı görülmüştür. FOXA1 geni knock-out edilmeyen hücrelerde 72. Saatte tekrar görülen protein ekspresyonu artışı, knock-out edilen hücrelerde görülmemiştir (Resim 4.15.).



Resim 4.16. Kontrol (FOXO1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXO1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte CDK-4 protein ifadelenmesine etkisi

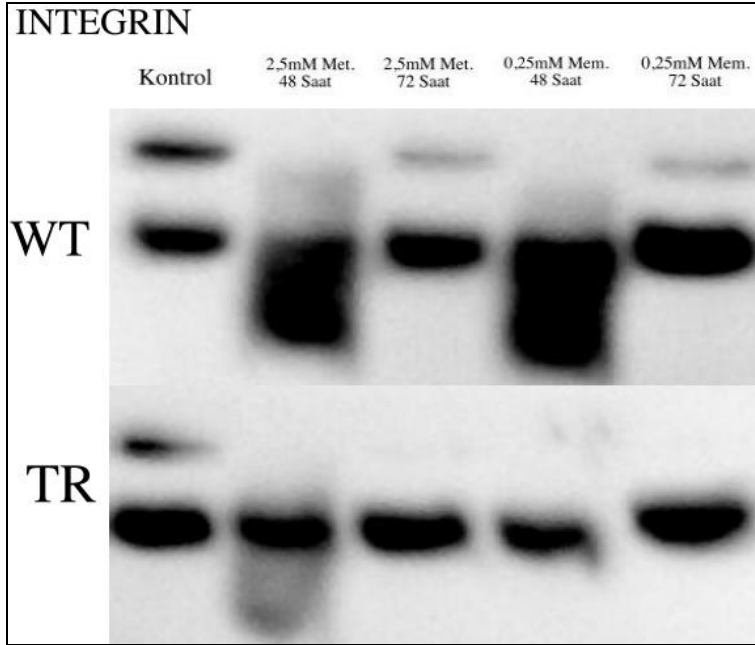
CDK4 protein ekspresyonunun kontrole göre en çok 48.saat Memantin uygulamasında arttığı görülmüştür. FOXO1 geninin knock-out edilmesi ile CDK4 proteininin ekspresyonu artmıştır (Resim 4.16.).



Resim 4.17. Kontrol (FOXO1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXO1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte Fibronectin protein ifadelenmesine etkisi

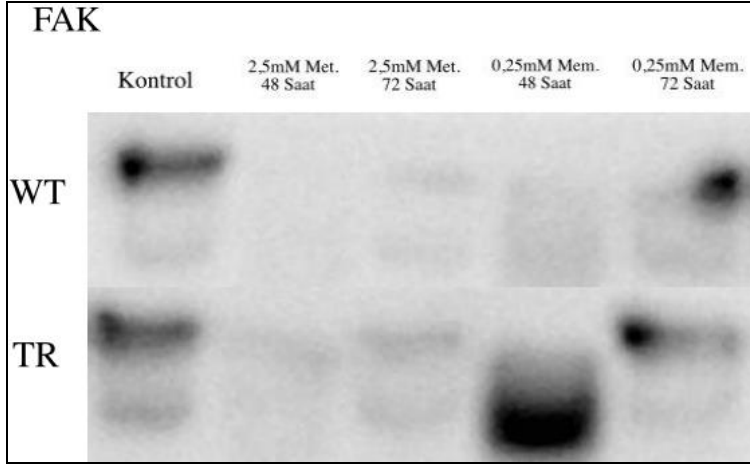
Wild tip ve 48, 72.saat Metformin uygulamasında ekspresyonu görülmeyen Fibronectin protein ekspresyonu 48.saat ve 42.saat Memantin uygulamasında artmıştır. FOXO1 geninin knock-out edilmesi ile Fibronectin ekspresyonu hiç ilaç uygulanmadan artış

göstermiştir. FOXA1 geni knock-out edilip Memantin uygulanan hücrelerde ise Fibronektin protein ekspresyonu baskılanmıştır (Resim 4.17.).



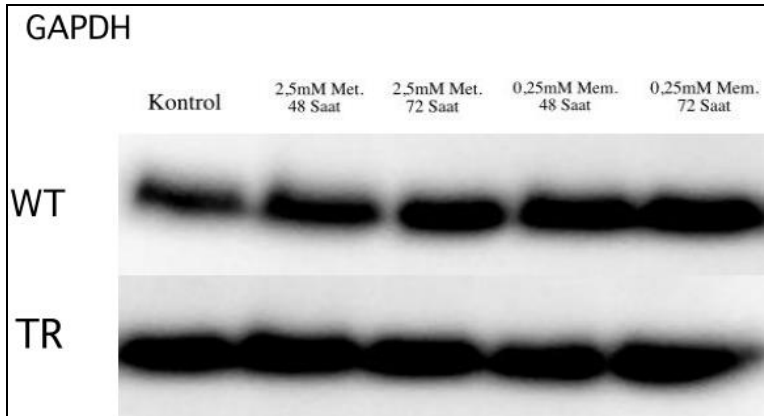
Resim 4.18. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte İntegrin protein ifadenmesine etkisi

48.saatlerde Metformin ve Memantin uygulanan LNCaP hücre hattında İntegrin protein ekspresyonu artmıştır. FOXA1 geni knock-out edildikten sonra uygulanan Metformin ve Memantin 48.saat İntegrin protein ekspresyonlarını azaltıcı etki göstermişlerdir (Resim 4.18.).



Resim 4.19. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte FAK protein ifadeleneşine etkisi

Metformin ve Memantin 48. ve 72.saatlerde FAK protein ekspresyonlarını azaltıcı etki göstermişlerdir. FOXA1 knock out yapılmasının ardından 48.saat Memantin uygulamasında görülen bantın spesifik olmayan bağlanma olabileceğinden şüphe edilmektedir (Resim 4.19.).



Resim 4.20. Kontrol (FOXA1 geni knock out edilmemiş-WT) ve FOXA1 geni knock-out edilmiş(TR) LNCaP hücre hattında, Metformin ve Memantin etkin ilaç dozlarının 48 ve 72.saatte GAPDH protein ifadeleneşine etkisi

Housekeeping gen olarak GAPDH protein ekspresyonları incelenmiştir (Resim 4.20.).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda literatürde yoğun bir şekilde araştırılan, terapötik bir yaklaşım olarak kanser tedavisinde glukoz metabolizmasının hedeflenmesinin yanısıra glutamin metabolizması hedeflenerek PI3K/Akt/mTOR yolağında görevli çeşitli genlerin protein ekspresyonu seviyelerinde ifadelerini inceledik. Kanser hücresi glutamin metabolizmasını hedeflemek amacıyla kullandığımız FDA onaylı Alzheimer ilacı Memantin'in kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini belirledik.

Çalışmamızda, 48. ve 72. saatte Metformin ve Memantin uygulanan androjen-bağımlı LNCaP hücrelerinin canlılığı MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. Metformin uygulanan (48. saat) LNCaP hücre hattında IC50 değeri (inhibisyon konsantrasyonu) 2,5 mM; Memantin (48. saat) için ise IC50 değeri 0,25 mM olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz Metformin'in LNCaP hücrelerinde 48.saatteki IC50 değeri; Kato ve arkadaşları ile hemen hemen uyumludur (Kato ve diğerleri, 2015). Memantin'in prostat kanseri hücreleri üzerindeki IC50 dozu ise daha önce araştırılmamıştır. Dolayısı ile literatür ile herhangi bir karşılaştırma yapılamamaktadır.

Pek çok kanser türü çoğalma ve sağ kalım için glukoz/glutamin gibi metabolik ürünlere ihtiyaç duymaktadır. Tedavide kanser metabolizmasının hedeflenmesi, kanserlerin bu zayıf noktasından kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda; kanser glukoz metabolizmasını hedeflemek için Metformin; glutamin metabolizmasını hedeflemek için ise Memantin ile LNCaP prostat kanseri hücrelerini muamele ettik.

Metformin'in kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Metformin'in glikolizi bozarak, hücreyi mitokondriyal solunum aracılı oksidatif stresin pro-senesans etkisinden koruduğu ve hücre immortalizasyonuna karşı koruyarak premalign hücre ve tümörogenezi inhibe ettiği düşünülmektedir. Metformin'in antineoplastik etkisinde rol alan pek çok yolak olduğu bilinmesine rağmen mTOR sinyallemesinin LKB1 bağımlı baskılanması esas mekanizma olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca; Metformin'in glikolitik tümör hücrelerini, Monokarboksilat Transporter inhibitörlerinin inhibisyonu ile büyüme inhibisyonu göstermişlerdir (Riedmaier ve diğerleri, 2013). Metformin hücre döngüsünü AMPK bağımlı ve bağımlı olmayan şekilde

inhibe etmektedir (Shi ve diğeri, 2012; Zheng ve diğeri, 2013). Elde ettiğimiz bulguların ışığında, kanser hücreleri üzerindeki anti-neoplastik etki mekanizması daha önce araştırılmayan Memantin’inde Metformin’e benzer mekanizmalar üzerinden kanser hücrelerine etkilerini belirlemiş bulunmaktayız.

PI3K/AKT yolağı tümör oluşumunun stimülasyonu ile ilişkilendirilmiştir. PI3K/AKT/mTOR yolağı, hücre büyümesi, hücre sağ kalımı, hücre göçü, anjiyogenez ve hücre metabolizması gibi çok çeşitli hücresel süreçlerde önemli bir yoldur.

Metformin, insülin seviyesini düşürdüğü, büyüme faktörlerinin sinyallerini baskıladığı ve metabolizmayı değiştirdiğinden antikanser ilaç özellikleri taşımaktadır. Hücre büyümesi, proliferasyon ve enerji metabolizmasında önemli rolleri nedeniyle antidiyabetik ve metabolizma değiştirici ilaçlar kanser için önleyici ve terapötik değer taşımaktadır (Quinn ve diğeri, 2013).

Metformin, oral olarak kullanıldığında kan beyin bariyerini geçebilmekte ve MSS üzerinde etkisini direk olarak gösterebilmektedir. Düşük toksisite profili, FDA onaylı durumu ve etkinliği nedeniyle Metformin ön plana çıkmaktadır (Würth ve diğeri, 2013; Quinn ve diğeri, 2013; Riedmaier ve diğeri, 2013). Çalışmamızda kullanılan diğeri bir kimyasal ajan olan Memantin de kanser hücre metabolizmasını hedefleyerek, kanser hücreleri proliferasyonunu engellemektedirler.

Metformin’in birincil moleküler hedefinin mitokondri olduğu düşünülmektedir. Metformin pozitif yükü nedeniyle mitokondri matriksinde birikir, ETS 'deki kompleks I’i inhibe eder. Bu, NADH oksidasyonunda azalmaya ve dolayısıyla ATP sentezinde de azalmaya neden olmaktadır (Pernicova ve diğeri, 2014).

Metformin’in Tip2 diyabet hastalarındaki etki mekanizmasının glukoneogenez’in inhibisyonu ve kas hücrelerinde glukoz alımına neden olması, kandaki glukoz ve insülin seviyesini düşürmesi olduğu düşünülmektedir. Metformin; hastalarda insülin duyarlılığını arttırarak ve insülin direncini azaltarak, insülin reseptör ekspresyonu ve tirozin kinaz aktivitesi üzerine dolaylı olarak etki yapmaktadır. Kronik olarak yüksek plazma insülin seviyesi, insülinin mitojenik etkisi ve tümör hücrelerindeki insülin reseptörlerinin yüksek

ekspresyon seviyesi nedeniyle tümörijenik etkiye sebep olabilir (Polivka ve diğerleri, 2014).

Antidiyabetik ilaç Metformin kanser hücrelerine karşı kemo-preventif özellik göstermektedir. Bu etkiyi mitokondriyel elektron transportunu inhibe ederek AMP artışı ve ATP'nin azalması ile sağlamaktadır. Metformin AMP/ATP oranını düşürerek, AMPK'yı aktive edip, katabolizmayı teşvik etmektedir (Wen ve diğerleri, 2013).

Kanser hücrelerinin anerobik glikolize yönelerek HIF protein ifadelerinde artış olması beklenmesine rağmen, bazı kanser hücrelerinin aerobik hücresel solunuma devam ettikleri belirlenmiştir (Altman ve diğerleri, 2016). Metformin ve Memantin'in HIF1A ekspresyonu üzerinde bir etki yaratmaması, hücrelerin aerobik glikolize devam ettiklerinin bir göstergesi olarak düşünmemize neden olmuştur. Çalışmamızda FOXA1 geninin knock-out edilmesi de HIF1A ekspresyonu üzerinde bir değişikliğe neden olmamıştır.

Kanser hücrelerinde normal hücrelerde olduğu gibi hem anaerobik (glukozdan laktata) hem de aerobik glikoliz (glukozdan pirüvata) eş zamanlı ancak daha fazla miktarda devam etmektedir. Artan glikoliz, kanser hücrelerinin en belirgin metabolik özelliklerinden birisi olarak kabul edilmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Bu nedenle kanser hücreleri transkripsiyon faktörü HIF1A ve onkogen C-Myc tarafından aktive edilen glikolitik yolda görevli GLUT, HK ve PFK-1 gibi genlerin transport ve transkripsiyonda ekspresyonlarında artış görülmektedir (Moreno-Sánchez ve diğerleri, 2014). Kanserde glutamin metabolizması MYC, p53, Ras ve HIF gibi pekçok faktörle düzenlenmektedir (Chen ve diğerleri, 2015).

Tümör hücreleri üzerindeki anti-kanser etki mekanizması daha iyi bilinen Metformin ve anti-kanser etkisi hakkında henüz hiçbir şey bilinmeyen Alzheimer ilacı NMDAR(N-metil D-Aspartat reseptör antagonisti) Memantin'in benzer moleküler mekanizmalar üzerinden hücre proliferasyonunu engelledikleri ilk defa yaptığımız bu çalışma ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda Metformin ve Memantin'in 48.saatte anti-apoptotik Bcl-2 ve Survivin ekspresyonlarını baskıladığı, Casp-3 protein ekspresyonunda 48.saatte artış görüldüğü bu nedenle hücreyi kaspaz aracılı apoptoza yönlendirdiği görülmektedir. Ancak 72.saatte Bcl-2, Survivin ve Casp-3 seviyesinin tekrar kontrole yakın bir ifadenime yaptığı

görülmektedir. Bu sonuçtan hareketle hücre döngüsü hızlı olan kanser hücrelerinin apoptozda dinamik bir dönüşümde olduğu söyleyebiliriz. Çalışmamızda Metformin ve Memantin hücrenin glikoz/glutamin metabolizmasını hedefleyen iki molekül olduğundan ve tümör hücre metabolizmasının dinamik yapısı nedeniyle etkilerinin geçici olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda Metformin ve Memantin'in hücrelerde Bax-aracılı mitokondriyel apoptozu indüklediği ve bu etkinin 72.saatte de artarak devam ettiği belirlenmiştir. Kanser hücreleri üzerindeki neoplastik aktivitesinin etki mekanizması literatürde daha önce araştırılmamış olan Memantin'in Bax-aracılı mitokondriyel apoptoz ile kanser hücrelerini öldürdüğünü belirlemiş bulunmaktayız.

FOXA1 geninin knock-out edilmesi ise hücrelerden Casp-3, Bcl-2, Survivin ekspresyonları üzerinde wild type'a göre herhangi bir değişiklik yaratmazken, Bax ve Casp-9 proteinlerinin ekspresyonlarını arttırmıştır.

Metformin ve Memantin benzer mekanizmalar üzerinden 48.saatte Casp3 ekspresyonunu arttırarak, Bcl-2 ve Survivin anti apoptotik proteinlerinin ekspresyonunu baskılayarak, kanser ilişkili hücre proliferasyonunda görevli C-myc ekspresyonunu baskılayarak LnCap insan prostat kanseri hücrelerini proliferasyonunu inhibe etmişlerdir. Bcl-2, Survivin anti-apoptotik proteinlerinin ekspresyonlarının benzer patternlerde olması bulgularımızın tutarlılığını göstermektedir. Çalışmamızda, Metformin ve Memantin'in Bcl-2 ve Survivin protein ekspresyonları üzerindeki etkilerinin 72.saatte tekrar kontrole yakın hale dönmesine rağmen; Bax-aracılı mitokondriyel apoptoz'un 72.saatte arttığı gözlemlenmiştir. Bax, mitokondriyel apoptotik faktörlerin salınmasını indükleyerek içsel Bcl-2 protein ekspresyonundan bağımsız olarak tümör hücrelerinin ölümüne neden olur (Wen ve diğerleri, 2013).

Metformin ve Memantin'in apoptotik protein ekspresyonları üzerine etkileri ile uyumlu olarak, 48.saatte kanser ilişkili hücre proliferasyonunu baskıladığı ve C-myc proteininin az ifadelenmesine neden olduğu gösterilmiştir. FOXA1 geninin knock-out edilmesi C-myc ekspresyonu üzerindeki etkisini değiştirmemiştir.

Metformin ve Memantin; HIF1A ekspresyonlarında herhangi bir değişiklik yaratmamıştır. FOXA1 geninin knock-out edilmesinin de HIF1A ekspresyonu üzerinde bir etkisi görülmemiştir. Metformin ve Memantin anti-anjiogenik etkilerinin etki mekanizmalarının; HIF1A sinyali üzerinden olmayıp; VEGFA üzerinden gerçekleştiğini, 48.saatlerde VEGFA ifadesinin azalması göstermiştir. Buna ek olarak; 72. saatlerde VEGFA ekspresyonu tekrar artmaya başlamıştır. Bu hızlı protein ekspresyonu değişimi tümör hücrelerinin dinamik metabolik süreçleri ile açıklayabilmekteyiz.

Hücre döngüsünün kontrolünde görevli Siklin D1 protein ekspresyonu Metformin ve Memantin tarafından azaltılmıştır. 48.saatlerde ekspresyonun azalmasının ardından 72.saatte tekrar CCND1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. FOXA1 geni knock-out edilen LNCaP hücrelerinde ise Metformin ve Memantin uygulanmadan önce de Siklin D1 protein ekspresyonu azaldığı görülmüştür. FOXA1 geni knock-out edilmeyen hücrelerde 72. saatte tekrar görülen protein ekspresyonu artışı, knock-out edilen hücrelerde görülmemiştir. Bu bulgu, FOXA1 geninde mutasyon olan hasta gruplarında hücre döngü inhibitörlerinin tedavide kullanımının daha etkin olabileceğini düşündürmüştür. Bu hipotezin doğrulanması için bu çalışmanın *in vivo* platforma da taşınması gerekmektedir.

Wild tip ve 48, 72.saat Metformin uygulamasında ekspresyonu görülmeyen Fibronectin protein ekspresyonu 48.saat ve 72.saat Memantin uygulamasında artmıştır. Fibronectin hücre morfolojisinde ve hücresel iskeletin yapılanmasından sorumlu ekstrasellüler matriks glikoproteinidir. Hücrelere Memantin uygulanmasının ardından hücre morfolojisinde mikroskobik değişiklikler gözlenmiştir (Data burada gösterilmiyor). Kontrol hücrelerinde görülmeyen ancak Memantin uygulamasının ardından protein ekspresyonundaki artışının Fibronectin'in hücre iskeletindeki rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

Mitokondri metabolizmasını etkileyen ajanların klinikte radyoterapötik ve kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanılma potansiyeli bulunmaktadır (Mitrakas ve diğerleri, 2014). Bu tez çalışmasında mitokondriyal metabolizmayı etkileyen, giderek moleküler mekanizmaları daha fazla aydınlatılan anti-diyabetik ilaç Metformin ve yeni bir anti-kanser etkili ilaç adayı olarak önerilen Alzheimer'ın tedavisinde kullanılan Memantin'in kanser hücrelerinde Bax-aracılı apoptozu indükleyerek kanser hücrelerini ölüme götürmesinin moleküler mekanizması ortaya konmuştur. Bu ilaçların özellikle 48.saatte hücre ölüm şekillerinden apoptoz üzerine etkileri artmaktadır. 72.saatte ise anti apoptotik markerlar

üzerine olan etkilerinin azaldığı görülmüştür. Bu azalan etkinin açıklaması olarak hücre metabolizmasının dinamik özelliği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu ajanların; halihazırda kullanılan kemoterapötik ilaçların yanında adjuvan terapi olarak, kanser hücre metabolizmasının zayıflatılarak ardından hemen radyoterapi/kemoterapi uygulanması şeklinde potansiyel olarak kullanımı alternatif bir tedavi yaklaşımı olarak önerilmektedir.

Düşük toksisite profili, kemoterapiye kıyasla daha az yan-etkilerinin bulunması, Kan-Beyin bariyerini geçebilmesi, fiyat avantajı gibi özellikleri nedeniyle Alzheimer ilacı Memantin'in; *in vivo* çalışmalarda deney hayvanı kanser modelleri üzerinde denenerek hızla ileri faz çalışmalarına katılması ve klinik olarak kullanım potansiyelinin dikkat çekici olduğunu belirtmek isteriz.

Giderek daha fazla çalışmada yer alan anti-diyabetik ilaç Metformin'in en önemli dezavantajlarından birisi olarak *in vivo* çalışmalarda anti-kanser etkili dozunun suprafizyolojik dozun üzerinde olması gösterilmektedir (Pernicova ve Korbonits, 2014). *In vitro* deney sonuçlarımız göz önünde alındığında Memantin'in Metforminden daha düşük dozlarda (Memantin IC50: 0,25 mM-Metformin IC50: 2,5mM) kanser hücreleri üzerinde etkili olmasının Memantin'i daha avantajlı hale getirdiğini düşünmekteyiz.

Metformin kullanımındaki endişelerden birisi de yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunun retrospektif olması ve klinik denemelerin sadece Metformin için düzenlenmemiş olmasıdır (Azvolinsky, 2014). Yapılan prospektif çalışmaların bazılarında Metformin'in anti-kanser etkinliğinin beklenen düzeyden az olduğu görülmüştür (Margel ve diğerleri, 2013). Bu nedenle bu yeni-konumlandırılmış ilaç adayları ile ilgili daha fazla sayıda prospektif çalışma yapılması gerekmektedir.

Anti-diyabetik ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılan Metformin'in prostat kanserini de içeren farklı tümör tiplerindeki antineoplastik aktivitesi literatürde gösterilmiştir (Kato ve diğerleri, 2015; Camacho ve diğerleri, 2015). Yapılan bu *in-vitro* çalışmamızda Metformin ve Memantin'in çeşitli hücre fonksiyonları ve moleküler yolları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu ilaçların mitokondri-aracılı apoptozu indükledikleri belirlenmiştir.

Mitokondriyal inhibitörlerin, ilaç direnci gösteren kanserlerin ikincil tedavisinde veya standart sitotoksik, hedefe yönelik tedavilerin yanında birincil tedavide kullanım

potansiyeli bulunmaktadır. Mitokondriyal inhibitörlerin klinikteki kullanımlarının önündeki en önemli endişe yüksek oranda mitokondriyal ATP kullanımı olan ve oksidatif strese karşı daha hassas olan kardiyomiyositler, dopaminerjik nöronlar üzerindeki etkisidir (Wolf, 2014). Bu nedenle özellikle ilaç dirençli kanserlerde görülen seçici oksidatif fosforilasyon artışı ile ilgili daha fazla sayıda araştırma yapılması gerekmektedir.

Metformin'in klinik denemelerindeki ana problem toksisite değil, etkisinin yetersiz olmasıdır. Klinik denemelerdeki başarısızlığın altında yatan en önemli nedenler birisi de mitokondriyal inhibitörlerden en iyi faydayı sağlayacak hasta popülasyonunun seçilememesinden kaynaklı olabileceği belirtilmektedir (Wolf, 2014). Kanserde kişiye özgü tedavi'nin gerçekleştirilmesinde hasta stratifikasyonunda moleküler alt tiplere son derece önemlidir ve hastaların tedavi seçiminde göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızdan elde edilen en önemli sonuçlardan birisi de FOXA1 geni inaktive edilen hücrelerde, hücre döngüsünün inhibe olduğu gözlenmiştir.(CCND1 protein ekspresyonunda azalmanın görülmesi). Bu sonuç da FOXA1 geninde mutasyon görülen hastalarda hücre döngüsünün daha zayıf olması ile hücre döngüsü inhibitörlerine verilebilecek yanıtın araştırılması gerektiğini göstermektedir. Çalışmanın deney hayvanları ile *in vivo*'ya geçirilmesinin ardından klinikte hangi hastaya hangi tedavi uygulanacağını belirlenmesinde yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

Kanserde fonksiyonu bozulan mitokondriler, hücrenin en temel enerji ve metabolit kaynağı olarak görev yaptığından, değişen mitokondri fonksiyonlarının tümör gelişimi ne şekilde etkilediğinin anlaşılması gerekmektedir. Onkogen ve tümör supressörlerin mitokondriyal metabolizma ve dinamiklerini nasıl düzenlediği ile ilgili çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Farklı tümör çeşitleri, farklı driver onkogenik lezyonların etkilerine göre mitokondriyal fonksiyonlara daha az ya da fazla hassas olabilirler (Boland ve diğerleri, 2013).

Bu nedenle de hangi tümör tiplerinin mitokondri fonksiyonlarına daha hassas olduğu araştırılarak bu tümörlerde mitokondriyal inhibitörlerin kullanılması daha etkili sonuçlar verebilir. Prostat kanserinin daha yavaş progresyonlu bir kanser türü olduğu göz önünde bulundurulduğunda, pankreas kanseri , glioblastoma gibi progresyonun daha hızlı olduğu kanser türlerinde mitokondriyi hedefleyen ajanların etkilerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

RB tümör supressör geni hücre döngüsünün önemli kontrollerinden birisidir. DNA hasarı, hipoksi, büyüme faktör eksikliği gibi pekçok stres koşulunda E2F transkripsiyon faktörünü baskılayarak hücre döngüsünün G1 fazında tutuklanmasına neden olmaktadır. RB yolağının upstreamindeki diğer genlerde p16/INK4A (CDKN2A) ve Cyclin D1 (CCND1)'dir. Çalışmamızda kullanılan Metformin ve Memantin, hücre döngüsü düzenleyicilerinden Siklin D1'i inhibe ederek döngünün G1 fazında tutuklanmasına neden olmaktadır (Boland ve diğerleri, 2013). FOXA1 geninin inaktif hale getirilmesi de SiklinD1 ekspresyonu üzerinde Metformin ve Memantin etkisine benzer bir etki yaratmıştır. Bu ilaçların yolağın başında bulunan tümör supressor RB ekspresyonu üzerinde etkili olması da muhtemeldir.

Cevabına yanıt aranması gereken önemli sorulardan birisi de mitokondriyel mutasyonların hastalıkların nedeni mi yoksa hastalık progresyonunun bir belirtici mi olduğudur (Verschoor ve diğerleri, 2013).

Metformin ve Memantin'in 48.saate Bcl-2, Survivin, C-myc, VEGF protein ekspresyonlarını azaltması ve 72.saatte bu protein ifadelerinin tekrar kontrolle aynı seviyeye dönüşü, bu genlerin DNA, mRNA, fosfo-protein seviyeleri bakımından da incelenmesini gerektirmektedir. Memantin ve Metformin'in sadece protein düzeyinde değil DNA, mRNA, fosfo-protein ve epigenetik etkilerinin incelenmesi ile birlikte bu ilaçların transkripsiyonel etki mekanizmaları aydınlatılabilecektir.

Kanser ilaçları, kanser hücrelerinin DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar nedeniyle DNA hasarı üzerinden etki göstermekte ve hücreleri apoptoza götürmektedir (Kaufmann ve diğerleri, 2000). Bu nedenle kanserin tedavisinde apoptotik yolların aktifleştirilmesi hedeflenmektedir. Kanser ilaçlarının etkinliğinin artırılabilmesi için antineoplastik ajanların aktifleştirdikleri apoptotik yolların belirlenmesi gerekmektedir.

Kaspaz aracılı apoptozun son durağı olan kaspaz-3 protein ekspresyonundaki 48.saatte görülen artış, LNCap hücrelerinin ölüm mekanizması olarak apoptozu kullandıklarının bir göstergesidir. Elde ettiğimiz western blot bant görüntüleri değerlendirildiğinde, sitotoksiste deneyinde elde edilen sonuçlarımıza paralel olarak LNCap hücrelerinde Casp-3 protein miktarının en fazla 48.saat Metformin ve Memantin uygulamasında artmış olduğu görülmektedir. Ancak 72.saatte Casp-3 protein seviyesinin tekrar azaldığı

görülmektedir. LNCap prostat kanseri hücrelerinde Casp-3 aracılı, anti-apoptotik Bcl-2 ve Survivin aracılı apoptozun 72.saatte azaldığı ancak Bax protein ekspresyonunun 48.saate sonrası 72 saatte giderek arttığı, dolayısıyla Metformin ve Memantin'in Bax-aracılı mitokondriyel apoptoz ile kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmektedir.

Literatürde daha önce N-metil D-aspartat reseptör antagonisti Memantin'in kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlendiği bir çalışma olmadığından, herhangi bir karşılaştırma yapılamamaktadır.

Memantin'in beyinde fazla glutamat'ın neden olduğu eksitotoksisiteyi azaltarak görev yaptığı bilinmektedir. Memantin'in kanser hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisinin de fazla glutamat'ı kanser hücrelerinin dezavantajına olan ara metabolitlere çevirerek kanser hücre proliferasyonunu baskıladığını düşünmekteyiz. Bu durum Memantin'i kemoterapi öncesi/sonrası, radyoterapi öncesi/sonrası potansiyel adjuvan terapi olarak değerlendirilmesini önermekteyiz.

Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda Metformin'in kanser kök hücreleri üzerine seçici etkisi ortaya konulmuştur (Hirsch ve diğerleri, 2009). Memantin'in de Metformin ile benzer mekanizmalar üzerinden etki gösterdiğini belirlememizle Memantin'in de kanser kök hücre sub-popülasyonları üzerinde kanser hücrelerinin proliferasyonunu engelleyici etki göstermesi muhtemeldir. Bu konuda daha çalışmaların yapılması gerekmektedir. Memantin'in kanser kök hücrelerini seçici olarak öldürme potansiyelinin değerlendirilmesi ile Memantin'in kanser relapsını önlemede fayda sağlayıp sağlayamayacağı belirlenebilecektir.

Memantin'in de Metformin ile benzer şekilde etki göstermesinin nedeni olarak Glutamat'ın Metformin'in hedef moleküllerin birisi olduğunu düşünmekteyiz. Memantin ve Metformin'in kanser hücrelerinin hem glukoz hem de glutamin metabolizmasını etkilemek üzere kombine kullanımlarının da araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

FOXA1 knock out edilmesinin hücrenin protein ekspresyon profiline etkisini incelemenin yanı sıra, epigenetik etkilerini de incelemenin faydalı olacağı kanısındayız. FOXA1 güçlendirici faktör (pioneer faktör) olarak görev yapmaktadır ve güçlendirici faktörler etkilerinin büyük bir kısmını histon modifikasyon enzimlerini aktive ederek ya da

baskılayarak, sistein rezidülerini koruyarak CpG adalarının metilasyonunu kontrol ederler. Bu süreçler ayrıca hücre farklılaşmasının transkripsiyonel zamanlamasında etkilidirler. Kanserin de hücre farklılaşmasında meydana gelen bozukluklar ile ilişkili olduğunu göz önünde bulundurduğumuzda FOXA1 gen knock-out'unun epigenetik etkilerinin değerlendirilmesinin de son derece önemli olduğu kanısındayız.

Koochekpour ve arkadaşları çalışmalarında, esansiyel olmayan aminoasit glutamat'ın serumdaki yüksek seviyesinin agresif primer ve metastatik prostat kanseri ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Koochekpour ve diğerleri, 2012). Kanser tedavisinde glutamat metabolizmasının rolünün aydınlatılması gerekmektedir.

Prokaryotik adaptif immün sistemi Crispr-düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümelerinde bulunan aralık genlerin (spacer), o canlıyı enfekte eden bazı virüsler ile aynı diziye sahip oldukları keşfedilmiştir. Bir virüs DNA'sı ile aynı diziye sahip aralık genine sahip olmaksızın o virüse karşı bir direnç verdiği ve Crispr sisteminin nükleik asit temelli bir bağışıklık mekanizması olabileceği hipotezi ortaya çıktı. Crispr sisteminin en önemli özelliklerinden biri, DNA'nın herhangi bir bölgesini yüksek hassaslık ve doğrulukta kesebilmek için sadece o DNA'nın baz dizisi ve hücre içinde ribonükleoprotein ile kompleks oluşturabilecek aktif bir Cas nükleaz proteinine ihtiyaç duymasısıdır (Doudna ve Charpentier, 2014).

Bir genin fonksiyonlarını anlamanın yollarından biriside o gen yokluğunda biyolojik sistemlerin incelenmesidir. Bir genin yokluğunda yada mutasyonunda fare vb. deney hayvanlarının genomlarının manipüle edilmesi ile genlerin değiştirilmesi ve insanlarda o genin nasıl bir fonksiyon gösterdiğinin belirlenmesi çalışmaları yapılmaktadır. Çalışmamızın *in vivo* ortama taşınması ile birlikte Crispr ile gen knock-out yapılmasının ardından FOXA1 gen fonksiyonu daha iyi anlaşılacaktır.

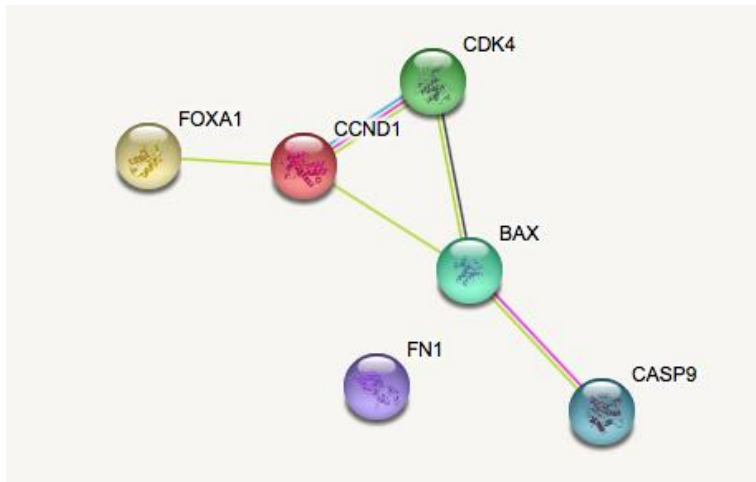
Ancak literatürde FOXA1 geninin knock-out edildiği *in vivo* çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Bunun nedeni olarak FOXA1 gen knock-out farelerin gelişimsel olarak lethal olması gösterilebilir. FOXA1 geninin knock-out edilmesi farelerin ölümüne neden olmuştur (Jin ve diğerleri, 2013). Bu sebeple FOXA1 geninin fonksiyonunun *in vivo* olarak çalışılmasının önünde çeşitli engeller bulunmaktadır.

FOXA1 geninin *in vivo* knock-out çalışılmasının önündeki zorluklar nedeniyle PDX(hasta-kökenli xenograft) hücre hatlarının ve deney hayvanlarının oluşturulması ile *in-vivo*’yu daha iyi mimikleyen çalışmalar yapılabileceği kanısındayız.

FOXA1’in ilaç hedefi bir molekül olarak potansiyelinin değerlendirilmesi kapsamında; yaptığımız çalışma sadece protein ifadesi üzerinde etkilerini araştırdığımız için bu soruya net olarak cevap verememekteyiz. Ancak, FOXA1 gen ekspresyonu baskılanan hücrelerde, hücre döngüsünün kontrolünde önemli bir noktada bulunan CCND1 ekspresyonunu azalttığından, FOXA1’in androjene duyarlı LNCaP prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunda görev aldığı belirlenmiştir. Bu da FOXA1’in prostat kanseri tedavisinde ilaç hedefi olarak önemini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda protein seviyesinde ekspresyonları incelenen bütün genler; Casp-3, Casp-9, Bcl-2, Bax, Survivin, B-Cat, C-myc, GSK-3B, HIF1A, VEGFA, CCND1, CDK4, Fibronectin, İntegrin, FAK bakımından incelendiğinde; ilaç uygulamaları olmaksızın FOXA1 geninin knock-out edilmesinin Casp-9, Bax, CCND1, CDK4 ve Fibronectin protein ekspresyonlarını değiştirdiği belirlenmiştir.

Protein-protein etkileşimlerinin incelendiği bir veritabanı olan STRING’de FOXA1 gen knock-out’u ile ekspresyonları değişen CCND1, CDK4, Bax, Casp-9 ve Fibronectin’in FOXA1 ile olan etkileşimleri Şekil 5.1.’deki gibi bulunmuştur.



Şekil 5.1. FOXA1 proteininin ekspresyonu değişen diğer proteinlerle olan etkileşim haritası (String: Protein-Protein etkileşim veritabanı)

Protein-Protein etkileşimi; veri madenciliği ile işlenerek elde edilen etkileşim haritasında FOXA1'in CCND1, CDK4, Bax ve Casp-9 ile etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. Bu protein-protein etkileşim veritabanında Fibronektin'in FOXA1 ile herhangi bir etkileşimi bulunamamıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlaçların klinikte kullanılmaya başlanmayan önceki pre-klinik araştırma aşamaları, ruhsatlandırma, toksisite ve güvenilirlik çalışmaları sırasındaki maliyetler dikkate alındığında hali hazırda piyasada bulunan ve farklı bir hastalığın tedavisinde kullanılan ajanların “İlaç yeniden konumlandırma” çalışmaları kapsamında; onay aldığı hastalıktan farklı bir hastalığın tedavisinde kullanılması ön plana çıkmaktadır.

Hali hazırda FDA onayı alan Metformin ve Memantin gibi ilaçların abirateron asetat tedavisi yanında adjuvan tedavi olarak rutin tedavi yöntemleri arasına girerek, hastanın sağkalımının uzatılması ve hastalığın tedavisinde alternatif bir yol olarak kullanılabilmesi için bu çalışmaların *in vivo* aşamalarda da gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Alzheimer ilacı olarak FDA onayı alan ve beyinde fazla glutamatın neden olduğu toksisiteyi engellemede kullanılan Memantin’in kanser hücreleri üzerinde antineoplastik aktivitesinin Bax-aracılı apoptozun indüklenerek (0,25mM) meydana geldiği literatürde ilk defa yaptığımız bu çalışma ile ortaya konmuştur.

En dikkat çekici sonuçlarımızdan birisi Memantin’in, Metformin’den oldukça düşük bir dozda (0,25 mM); kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellemesidir, Memantin’in kanser hücrelerinin tümörjenik potansiyeli üzerindeki etkilerinin araştırılması ve *in vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir. Memantin’in Bax-aracılı apoptozu tetikleyerek hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisi ve böylece anti-kanser aktivite etkisi literatürde gösterilmemiştir. Bu bağlamda sonuçlarımızın bilim dünyasına, Memantin’in anti-kanser mekanizmasına dair yeni bir bakış açısı getireceğini umut etmekteyiz.

Yaygın tedavilerde (Kemoterapi-Radyoterapi) kanser hücreleri oksidatif stres aracılığı ile öldürülmektedir. Kanser hücrelerini öldürmede başarısız olan öldürücü dozların altındaki uygulamalarda ise sistemik oksidatif stres indüklenerek ters Warburg etkisi gözlenerek tümör rekürrensi ya da lösemi ve lenfoma gibi sekonder malignitelerin oluşumuna katkı sağlanmaktadır (Sotgia ve diğerleri, 2012). Bulgularımız ışığında kanser tedavisinde kullanılan diğer metabolik yolak inhibitörleri yanında mitokondriyal inhibitörlerin de göz önünde bulundurulması gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda androjen-bağımlı LnCaP prostat kanseri hücrelerinde, glukoz ve glutamin metabolizması hedeflenerek, kanser hücresi proliferasyonunda meydana gelen değişimler, PI3K/Akt/mTOR yolağı bazında araştırılmıştır. Glukoz metabolizmasını hedeflemenin yanısıra glutamin metabolizmasını hedeflemenin de potansiyel bir tedavi yaklaşımı olabileceği pre-klinik olarak ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda prostat gelişiminde rol oynayan FOXA1 geninin fonksiyonunu araştırmak amacıyla etkili bir genom düzenleme metodu Crispr/Cas9 ile susturularak, bu genin susturulmasının; hücre döngüsünde görev yapan CCND1 protein ifadenmesini azalttığı belirlenmiştir. Pre-klinik olan bu çalışmamız FOXA1'in androjen bağımlı prostat kanserinde ilaç hedefi bir molekül olarak önemini ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz bulgulara göre FOXA1'in ilaç hedefi olarak hormon bağımlı diğer kanserlerde de (örn:meme kanseri) kullanılabileceği düşüncesindeyiz.

Biyoloji'nin ilk büyük ölçekli projesi olan İnsan Genom Projesi'nde, insan genomunu oluşturan üç buçuk milyar baz çiftinin dizilenmesi 13 yıl sürmüştür. İnsan genom projesi halen tarihin en önemli konsorsiyum tabanlı büyük bilim projeleri arasındaki yerini almaktadır. Bu projenin yanısıra pek çok ülke büyük çaplı kendi ulusal genom araştırma programlarını başlatmışlardır (Örneğin ABD-1milyon genom projesi, Birleşik Krallık-UK10K Projesi). Genom dizileme maliyetlerinin giderek daha da düşmesi ile birlikte giderek daha fazla sayıda genom dizilemesi yapılacaktır. Bu da bireyler arası varyasyon ve genomumuz hakkında bildiklerimizi genişletecektir.

Genom teknolojilerinde yaşanan bu gelişim ve değişimlerle birlikte, özellikle kanserin tedavisinde “One size fits all” yaklaşımının geride bırakılması hedeflenerek, kişiye özgü tedavi mümkün hale gelebilecektir. Kişiye özgü tedavide ilk aşama olarak hastaların stratifikasyonunun yapılmasında moleküler tıp'dan yararlanılması faydalı olacaktır.

Büyük araştırma gruplarınca yapılan çok sayıda hastadan alınan tümörlerde yapılan mutasyon, kopya sayısı değişiklikleri, mRNA ekspresyon füzyonları, DNA metilasyon patternleri, miRNA ve protein ekspresyonları gibi geniş çaplı araştırmaların ardından hastalıkların moleküler taksonomileri ortaya konulmaya başlanmıştır. Bizlerde bu araştırmaları yakından takip ederek, ülkemizdeki hasta profilinde de mutasyonların türlerinin; sürücü ve yolcu mutasyonların (driver-passenger) araştırılması gerekmektedir.

Hasta stratifikasyonlarının yapılmasının ardından herkese kendi hastalık ve genom tipine uygun tedavi yapılabilmesinin önü açılacaktır. Hastalık progresyonunda driver mutasyonların ve bu genlerin up-downstream moleküllerinin belirlenmesi ile yeni ilaç hedefleri ortaya konularak, tedavide farklı alternatiflerin keşfedilmesi sağlanabilecektir.

Yaşam bilimlerinde Crispr ile yeni bir dönemin başladığı bu Post-genomik çağda, Crispr'ın biyolojinin pek çok alanına uyarlanması ile yeni ufuklara doğru ilerlenmektedir. Teknoloji devlerinden Google, Mountain View/Kaliforniya'da pek çok akademik ünlüye de ev sahipliği yapan yeni bir yaşam bilimleri araştırma merkezi kurmuştur. İnsan Genom Projesindeki çalışmaları ile dikkat çeken bilim adamı Craig Venter'da "Human Longevity" adını verdiği yeni şirketi ile genomik, informatik, yeni-nesil DNA dizi teknolojisi ve kök hücre teknolojisini tek bir yerde buluşturarak sağlıklı yaşlanmayı mümkün hale getirmeyi ve yaşlanma araştırmalarına yeni bir bakış açısı getirmeyi hedeflemektedir. İnsan genomunu daha iyi anlamamızla birlikte hastalıkların tedavisinde yeni alternatif yaklaşımlar getirebileceğiz..



KAYNAKLAR

- Agnihotri, N., Rani, I., & Kumar, S. (2015). Targeting Mitochondria: A Powerhouse Approach to Cancer Treatment. In *Multi-Targeted Approach to Treatment of Cancer* (pp. 263-276). Springer International Publishing.
- Azvolinsky, A. (2014). Repurposing to fight cancer: the metformin–prostate cancer connection. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(2), dju030.
- Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 619-634.
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 3(8), 673-683.
- Barbieri, C. E., Baca, S. C., Lawrence, M. S., Demichelis, F., Blattner, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E. (2012). Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nature Genetics*, 44(6), 685-689.
- Boland, M. L., Chourasia, A. H., & Macleod, K. F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers In Oncology*, 3, 292.
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(2), 85-95.
- Camacho, L., Dasgupta, A., & Jiralerspong, S. (2015). Metformin in breast cancer-an evolving mystery. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2015). The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell*, 163(4), 1011-1025.
- Chakraborty A ve Trivedi V. (2015). Streamlining the Drug Discovery Process through Repurposing of Clinically Approved Drugs. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 2(3): 1047. ISSN: 2378-3036
- Chen, L., & Cui, H. (2015). Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22830-22855.
- Cong, L., & Zhang, F. (2015). Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. Chromosomal Mutagenesis, 197-217. Edlind, M. P., & Hsieh, A. C. (2014). PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian Journal of Andrology*, 16(3), 378–386. <http://doi.org/10.4103/1008-682X.122876>
- Daye, D., & Wellen, K. E. (2012, June). Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. In *Seminars in Cell & Developmental biology* (Vol. 23, No. 4, pp. 362-369). Academic Press.

- Diabetes Prevention Program Research Group. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *The New England Journal of Medicine*, 2002(346), 393-403.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Fogg, V. C., Lanning, N. J., & MacKeigan, J. P. (2011). Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chinese Journal of Cancer*, 30(8), 526.
- Frezza, C., & Gottlieb, E. (2009, February). Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 19, No. 1, pp. 4-11). Academic Press.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2008). Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?. *Trends in Cell Biology*, 18(4), 165-173.
- Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2009, February). Mitochondria as targets for cancer chemotherapy. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 19, No. 1, pp. 57-66). Academic Press.
- Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2010). The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(1), 60-74.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Tsiachlis, P. N., & Struhl, K. (2009). Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer research*, 69(19), 7507-7511.
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(6), 735-745.
- Jin, H. J., Zhao, J. C., Ogden, I., Bergan, R. C., & Yu, J. (2013). Androgen receptor-independent function of FoxA1 in prostate cancer metastasis. *Cancer research*, 73(12), 3725-3736.
- Jones, N. P., & Schulze, A. (2012). Targeting cancer metabolism—aiming at a tumour's sweet-spot. *Drug Discovery Today*, 17(5), 232-241..
- Kato, H., Sekine, Y., Furuya, Y., Miyazawa, Y., Koike, H., & Suzuki, K. (2015). Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via the downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(1), 115-121.

- Kaufmann, S. H., & Earnshaw, W. C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 256(1), 42-49.
- Kiliccioglu, I., Konac, E., Albayrak, G., Donmez, C., & Bilen, C. Y. (2015). Combination of Metformin and Dichloroacetate Inhibits Proliferation and Induce Intrinsic Pathway of Apoptosis in PC-3 Human Prostate Cancer Cells. *Gazi Medical Journal*, 26(4A).
- Kirkin, V., Joos, S., & Zörnig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1644(2), 229-249.
- Kitada, S., Pedersen, I. M., Schimmer, A. D., & Reed, J. C. (2002). Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene*, 21(21), 3459-3474.
- Koochekpour, S., Majumdar, S., Azabdaftari, G., Attwood, K., Scioneaux, R., Subramani, D., & Shourideh, M. (2012). Serum glutamate levels correlate with Gleason score and glutamate blockade decreases proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 18(21), 5888-5901.
- Lee, M. J., Albert, S. Y., Gardino, A. K., Heijink, A. M., Sorger, P. K., MacBeath, G., & Yaffe, M. B. (2012). Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks. *Cell*, 149(4), 780-794.
- Lino, M., & Merlo, A. (2009). Translating biology into clinic: the case of glioblastoma. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 311-316.
- Lisi, L., Laudati, E., Navarra, P., & Russo, C. D. (2014). The mTOR kinase inhibitors polarize glioma-activated microglia to express a M1 phenotype. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1.
- Margel, D., Urbach, D. R., Lipscombe, L. L., Bell, C. M., Kulkarni, G., Austin, P. C., & Fleshner, N. (2013). Metformin use and all-cause and prostate cancer-specific mortality among men with diabetes. *Journal of Clinical Oncology*, 31(25), 3069-3075.
- Michalak, K. P., Maćkowska-Kędziora, A., Sobolewski, B., & Woźniak, P. (2015). Key Roles of Glutamine Pathways in Reprogramming the Cancer Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- Mitrakas, A. G., Kalamida, D., & Koukourakis, M. I. (2014). Effect of mitochondrial metabolism-interfering agents on cancer cell mitochondrial function and radio/chemosensitivity. *Anti-Cancer Drugs*, 25(10), 1182-1191.
- Mossman, T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63
- Moreno-Sánchez, R., Marín-Hernández, A., Saavedra, E., Pardo, J. P., Ralph, S. J., & Rodríguez-Enríquez, S. (2014). Who controls the ATP supply in cancer cells?

- Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell biology*, 50, 10-23.
- Pernicova, I., & Korbonits, M. (2014). Metformin [mdash] mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(3), 143-156.
- Polivka, J., & Janku, F. (2014). Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(2), 164-175.
- Pyzocha, N. K., Ran, F. A., Hsu, P. D., & Zhang, F. (2014). RNA-guided genome editing of mammalian cells. *Gene Correction: Methods and Protocols*, 269-277.
- Quinn, B. J., Kitagawa, H., Memmott, R. M., Gills, J. J., & Dennis, P. A. (2013). Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(9), 469-480.
- Riedmaier, A. E., Fisel, P., Nies, A. T., Schaeffeler, E., & Schwab, M. (2013). Metformin and cancer: from the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(2), 126-135.
- Rattan, R., Ali Fehmi, R., & Munkarah, A. (2012). Metformin: an emerging new therapeutic option for targeting cancer stem cells and metastasis. *Journal of Oncology*, 2012.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308.
- Ran, F. A. (2014). CRISPR-Cas: Development and applications for mammalian genome editing. *Harvard University*.
- Roberts, A. W., Davids, M. S., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Puvvada, S. D., Gerecitano, J. F., & Wong, S. (2016). Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(4), 311-322.
- Romanienko, P. J., Giacalone, J., Ingenito, J., Wang, Y., Isaka, M., Johnson, T., Mark, W. H. (2016). A Vector with a Single Promoter for In Vitro Transcription and Mammalian Cell Expression of CRISPR gRNAs. *PloS one*, 11(2), e0148362.
- Sánchez-Rivera, F. J., & Jacks, T. (2015). Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 387-395.
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347-355.
- Shi, W. Y., Xiao, D., Wang, L., Dong, L. H., Yan, Z. X., Shen, Z. X., & Zhao, W. L. (2012). Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death & Disease*, 3(3), e275.

- Singh, S. R., Tan, M., & Rameshwar, P. (2015). Cancer Metabolism: Targeting metabolic pathways in cancer therapy. *Cancer Letters*, 356(2), 147-148.
- Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2015). Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular Cell*, 58(4), 568-574.
- Sotgia, F., Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U. E., Flomenberg, N., Birbe, R., Witkiewicz, A. K., & Lisanti, M. P. (2012). Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the "reverse Warburg effect" in positive lymph node tissue. *Cell Cycle*, 11(7), 1445-1454.
- Taylor, B. S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B. S., Antipin, Y. (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, 18(1), 11-22.
- Thakore, P. I., D'Ippolito, A. M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N. K., Kabadi, A. M., & Gersbach, C. A. (2015). Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nature Methods*.
- Tsang, C. K., Qi, H., Liu, L. F., & Zheng, X. S. (2007). Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discovery Today*, 12(3), 112-124.
- Verschoor, M. L., Ungard, R., Harbottle, A., Jakupciak, J. P., Parr, R. L., & Singh, G. (2013). Mitochondria and cancer: past, present, and future. *BioMed Research International*, 2013.
- Watson, P. A., Arora, V. K., & Sawyers, C. L. (2015). Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*.
- Wen, S., Zhu, D., & Huang, P. (2013). Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Medicinal Chemistry*, 5(1), 53-67.
- Wolf, D. A. (2014). Is reliance on mitochondrial respiration a "chink in the armor" of therapy-resistant cancer?. *Cancer Cell*, 26(6), 788-795.
- Würth, R., Pattarozzi, A., Gatti, M., Bajetto, A., Corsaro, A., Parodi, A., Fenoglio, D. (2013). Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt. *Cell Cycle*, 12(1), 145-156.
- Zhang, L., Zhou, F., & ten Dijke, P. (2013). Signaling interplay between transforming growth factor- β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(12), 612-620.
- Zheng, L., Yang, W., Wu, F., Wang, C., Yu, L., Tang, L., & Feng, G. (2013). Prognostic significance of AMPK activation and therapeutic effects of metformin in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 19(19), 5372-5380.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :ALBAYRAK, Gülşah
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : Ankara, 02/01/1987
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 05553673914
 E-mail : albayrakgulsah@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Anadolu Üniversitesi, Biyoteknoloji B.D.	2010
Lisans	Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2008
Lisans	Anadolu Üniversitesi, İşletme Bölümü	2011
Lise	Ankara Ayrancı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-Halen	Gazi Üniversitesi S.B.E.	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- İlker Kiliccioglu, Ece Konac, Gulsah Albayrak, Cigdem Donmez, Cenk Y Bilen. Combination of Metformin and Dichloroacetate Inhibits Proliferation and Induce Intrinsic Pathway of Apoptosis in PC-3 Human Prostate Cancer Cells. <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/index.php/GMJ/issue/view/118>, Gazi Medical Journal, Vol 26, No 4A, 2015
- Güven K, Albayrak G, Güven A, Yazıcı B (2015) FT-IR for Rapid Discrimination of Halophilic Archaea and Bacteria. J Phylogen Evolution Biol 3:145. doi: 10.4172/2329-9002.1000147
- Güçlü S., Albayrak G., Deveci A., Ekmekci A. Molecular Traces and Evidence of Evolution. J Ist Faculty Med 2014; 77:2

Hobiler

Dünyayı Gezmek



GAZİ GELECEKTİR..