Nur Betül KARTAL BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS 2017

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE WİP1 FOSFATAZIN KEMOTERAPİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

NUR BETÜL KARTAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

AYDIN-2017

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE WİP1 FOSFATAZIN KEMOTERAPİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

NUR BETÜL KARTAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF1-16029 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN–2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Nur Betül KARTAL tarafından hazırlanan "Akut Lenfoblastik Lösemide Wip1Fosfatazın Kemoterapi Üzerine Etkileri" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/12/2017

Ünvan	Adı Soyadı	Kurum	İmza
Prof. Dr.	Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL	Adnan Menderes Üniversitesi	
Doç. Dr.	Mehtap KILIÇ EREN	Adnan Menderes Üniversitesi	
Yrd.Doç.Dr.	Bekir ÇÖL	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ...28/12/2017....tarih ve .....41.....sayılı oturumunda alınan .....VIII.....nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan ve çalışmam süresince Tübitak 214S200 nolu proje kapsamında bursiyer olarak yer almamı sağlayan değerli danışman hocam Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezim için vermiş olduğu değerli değerlendirme ve tavsiyelerden dolayı tez jürilerim Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL ve Prof.Dr. Aslıhan KARUL hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmama ev sahipliği yapan Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı ve Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne (ADÜ BİLTEM' e) teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında manevi desteğini hissettiğim, bilgilerini paylaşan hayatımda olduğu için kendimi her zaman şanslı hissettiğim Hatice PİLEVNELİ'ye, Meltem GÜLER'e, Ceylan AK'a, Anı Altuğ CURNA'ya ve Burçin İrem ABAS'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen, yoluma ışık tutan, hayattaki en büyük hazinelerim olan, annem Hatice KARTAL'a, babam Varol KARTAL'a, kardeşim Elif KARTAL'a ve manevi desteğini hep hissettiğim Nisa METİN'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamı TPF-116029 nolu proje ile destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ viii

ŞEKİLLER DİZİNİ x

TABLOLAR DİZİNİ xiv

ÖZET xv

ABSTRACT xvii

1.GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. DNA Hasarı ve DNA Hasarına Etki Eden Faktörler 3

2.2. DNA Hasarı Cevabı 3

2.3. DDR Aktivasyonu ve Önemli Elemanları 4

2.4. DNA Tamir Mekanizmaları 7

2.5. Wip1 Fosfataz 8

2.6. Wip1'in Transkripsiyon Faktörleri ve Transkripsiyonel Olarak Düzenlenmesi 10

2.7. Wip1'in Hücresel Tümör Supressör Cevaplar Üzerine Etkileri 13

2.7.1. PPM1D/Wip1 ve DDR'nin Kontrolünde ki Rolü 13

2.7.2. Wip1 Fosfatazın Apoptazis Üzerine Etkisi 15

2.7.3. Wip1 Fosfatazın Kontrol Noktaları Üzerine Etkisi 18

2.7.4. Wip1'in Hücresel Senesens Üzerine Etkileri 19

2.8. Wip1'in Onkogen Rolü ve Tümörigeneze Etkisi 20

2.9. p53 Negatif Tümörlerde Wip1 Aktivasyonu 23

2.10. Hematolojik Malignansilerde Wip1 Fosfatazın Rolü 25

2.11. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) 26

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 28

3.1. Kullanılan Hücre Dizileri 28
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar 28
3.1.2. Kullanılan Antikorlar ve Oligolar 29
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler 29
3.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar 30
3.2. Yöntem 30
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları 30
3.2.2. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği 31
3.2.3. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması 31
3.2.4. Hücrelerin Sayım Yöntemi 31
3.2.5. Kemoterapötik İlaç Stoklarının Hazırlanması 33
3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmalarının ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanışı 33
3.2.6.1. Jurkat hücrelerinde 24 saatte apoptozisin indüklendiği hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı 34
3.2.6.2. Jurkat hücrelerinde 72 saatte apoptozisin indüklendiği hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı 34
3.2.6.3. Jurkat hücrelerinde 72 saatte senesensin indüklendiği hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı 34
3.2.6.4. Wst-1 testi 35
3.2.6.5. SA-β-Galaktozidaz boyama testi 35
3.2.6.6. Annexin-V apoptozis testi 36
3.2.6.7. Caspase 3/7 Testi 36
3.2.6.8. Hücre Siklusu (Cell Cycle) Testi 37
3.2.6.9. γH2AX analizi 38
3.2.6.10. Protein izolasyonu, protein miktar tayini ve Western Blot analiz çalışmaları 39
3.2.6.10.1. Protein izolasyonu 39

3.2.6.10.2. Protein miktar tayini 39
3.2.6.10.3. Western Blot analizi..... 40
3.2.6.10.3.1. Poliakrilamid Jelin (SDS-PAGE Jel) hazırlanması..... 42
3.2.6.10.3.2. Jele yüklenecek protein örneklerinin hazırlanması 43
3.2.6.10.3.3. Elektroforetik yürütme işlemi..... 43
3.2.6.10.3.4. Transfer işlemi (yarı ıslak transfer işlemi)..... 44
3.2.6.10.3.5. Bloklama işlemi..... 44
3.2.6.10.3.6. Primer ve seconder antikor ile inkübasyon işlemleri 44
3.2.6.10.3.7. ECL ile görüntüleme işlemi..... 45
3.2.7. PPM1D/Wip1 Geninin RNA İnterferansı ile Hedeflenmesi..... 45
3.2.8. RNA İzolasyonu 47
3.2.9. Real Time Ready Single Assay Metodu 48
3.2.9.1. cDNA (komplementer) sentezi 48
3.2.9.2. Real-Time PCR aşaması..... 49
3.2.10. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi 49
4. BULGULAR 50
4.1. Wip1'in Jurkat Hücrelerinde mRNA ve Protein Düzeyinde Belirlenmesi..... 50
4.2. Etoposid ve Doxorubicinin 24 Saatte Apoptozisi İndükledikleri Dozlarının Jurkat Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi 51
4.2.1. Wst-1 Testi ile 24 Saatte Canlılığının ve Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi..... 51
4.2.2. Annexin V Testi ile 24 Saatte Hücre Canlılığın Apoptozisin Belirlenmesi..... 52
4.3. Jurkat Hücrelerinde Etoposid ile Doxorubicinin Apoptozisi İndükledikleri Dozlarının 72 Saatte Hücre Canlılığı ve Apoptozis Aktivasyonu Üzerine Ekileri 53
4.3.1. Wst-1 Testi ile 72 Saate Hücre Canlılığının ve Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi 53
4.3.2. Annexin V Testi ile 72 Saatte Hücre Canlılığının ve Apoptozisin Belirlenmesi 54
4.3.3. Caspase 3/7 Testi ile Apoptozisin Belirlenmesi..... 56
4.3.4. Hücre Döngüsü Analizlerinin Değerlendirilmesi 57

4.3.5. Etoposid ve Doxorubicinin 72 Saatte Apoptozisi İndükledikleri Dozlarıyla Muamele Edilen Jurkat Hücrelerinde DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Değerlendirilmesi 58

4.3.6. Etoposid ve Doxorubicinin 72 Saatte Apoptozisi İndükledikleri Dozlarının DDR Elemanları Üzerine Etkilerinin Western Blot Analizi ile Belirlenmesi 59

4.4. Jurkat Hücrelerinde Etoposid ve Doxorubicinin Senesens Aktivasyonu Üzerine Etkileri 61

4.4.1. Wst-1 Testi ile Etoposid ve Doxorubicinin Jurkat Hücrelerinde Senesensi İndükledikleri Dozlarının 72 Saatte Metobolik Aktivite Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi 61

4.4.2. Etoposid ve Doxobicinin 72 Saatte Jurkat Hücrelerinde Senesensi İndükledikleri Dozlarının Hücre Döngüsü Dağılımı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi 62

4.4.3. Etoposid ve Doxobicinle 72 Saatte Senesensin İndüklendiği Jurkat Hücrelerinde Meydana Gelen DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Değerlendirilmesi 63

4.4.4. Senesense Bağlı Olarak Artış Gösteren β galaktozidaz Aktivitesi 64

4.4.5. Etoposid ve Doxorubicinin 72 Saatte Jurkat Hücrelerinde Senesensi İndükledikleri Dozlarının DDR Elemanları Üzerine Etkileri 66

4.5. Western Blot Analizi ile Jurkat Hücrelerinde Wip1'in DDR Elemanları Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi 67

4.6. siRNA Oligoları ile Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Apoptozisin Değerlendirilmesi 69

4.6.1. Wip1 ifadesi Baskılanmış Hücrelerde Annexin V Testi ile Apoptozisin Belirlenmesi 69

4.6.2. Wip1 ifadesi Baskılanmış Hücrelerde Caspase 3/7 Testi ile Apoptozisin Belirlenmesi 70

4.6.3. Wip1 ifadesi Baskılanmış Hücrelerde Hücre Siklusun Analizlerinde Değerlendirilmesi 72

4.6.4. Etoposid ve Doxorubicinin Apoptozisi İndükledikleri Dozlarla Muamele Edilen Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Değerlendirilmesi 73

4.7. siRNA Oligoları ile Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Senesensin Değerlendirilmesi 74

4.7.1. Senesense Bağlı Olarak Artış Gösteren β-galaktozidaz Aktivitesi 74

4.7.2. Wip1 ifadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Hücre Siklusu Analizlerinin Değerlendirilmesi 76

4.7.3. Etoposid ve Doxorubicinin Senesensi İndükledikleri Dozlarla Muamele Edilen Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Değerlendirilmesi 77

4.8. Wip1'i Aşırı İfade Eden ve Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Apoptozis Analizlerinin Karşılaştırılması 78

4.8.1. Annexin V Testi Sonuçlarının Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi 78

4.8.2. Caspase 3/7 Testi ile Apoptozisin Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi 79

4.8.3. Hücre Döngüsü Analizlerinin Karşılaştırılması Olarak Değerlendirilmesi 80

4.8.4. DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirlmesi..... 81

4.9. Wip1'i Aşırı İfade Eden ve Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Senesens Analizlerinin Karşılaştırılması 82

4.9.1 Hücre Döngüsü Analizlerinin Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi 82

4.9.2 DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi..... 83

5. TARTIŞMA 85

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 92

KAYNAKLAR 94

ÖZGEÇMİŞ..... 104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALL : Akut lenfoblastik lösemi

ATM : Ataxia telangiectasia mutated kinase

ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase

Bax : Apoptoz uyarıcı Bcl2 aile üyesi X proteini

Bcl2 : B hücreli lenfoma 2 (pro ve anti apoptotik etkili gen ailesi)

Bcl_{XL} : Apoptoz engelleyici Bcl2 aile üyesi

BSA : Bovin serum albumin

cDNA : Komplamenter DNA

Chk1 : Kontrol noktası kinazı 1

Chk2 : Kontrol noktası kinazı 2

CRE : Siklik adenozin yanıt elemanı

CREB : CRE bağlanma proteini

DDR : DNA damage response, DNA hasarı cevabı

DMSO : Dimetil sülfoksit

DNA : Deoksiribo nükleik asit

E2F : Transkripsiyon uzama faktörü 2

EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit

ERalfa : Östrojen reseptörü alfa

FBS : Fetal bovin serum

GAPDH : Gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz

H2AX : Histon protein 2AX

HR : Homolog rekombinasyon

I.R. : İyonize radyasyon

JNK : j-cun N-terminal kinaz

MAPK : Mitojenle etkinleştirilen protein kinaz

MDM2 : Mouse double minute 2

MEF : Mouse embriyonik fibroblastı

MMTV : Mouse meme tümör virüsü

mRNA : Mesajcı RNA

myc : Myelositomatozis

NF-kappaB : Nükleer faktör kappa B

P53 : Tümör protein 53

PBS : Fosfat tuzu tamponu

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

PI3K : Fosfotidilinositol-3-kinaz

PPM1D : Protein phosphatase 1D magnesium dependent

PTEN : Fosfataz ve tensin homolog

qRT-PCR : Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Ras : Küçük GTP bağlayacı protein

RNA : Ribo nükleik asit

RNAi : RNA interferansı (RNA müdahelesi)

RUNX2 : RUNT ilişkili transkripsiyon faktörü 2

siRNA : Small interfering RNA

TNF-α : Tümör nekroz faktör alfa

TP53 : Tümör protein 53 geni

U.V. : Ultraviole ışık

UNG2 : Urasil DNA glikozilaz 2

Wip1 : Wild type p53 indüklü fosfataz 1

Wst-1 : Water-soluble tetrazolium tuzu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. DNA hasarı cevabı sinyal yolları aktivasyonu 4

Şekil 2. DNA hasarı cevabı mekanizması ve görev alan önemli proteinlerin aktivasyonu..... 5

Şekil 3. Kontrol noktası sinyalizasyon ağının önemli aracıları olan Chk1-Chk2 ve görev aldıkları hücresel mekanizmalar 6

Şekil 4. Wip1'in hedefleri fonksiyonel aktivasyonunun sonuçları 9

Şekil 5. PPM1D/Wip1 geni üzerinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin gösterimi 10

Şekil 6. PPM1D'nin transkripsiyonel regülasyonu. 12

Şekil 7. Wip1'in fonksiyonel hedefleri ve DDR kontrolünde ki rolü 14

Şekil 8. Tümörigenez ve terapötik yanıtta Wip1'in fonksiyonu 22

Şekil 9. Cisplatin ile muamele edilen p53-/- Saos2 hücrelerinde Bax/Bcl-x_L oranının Wip1 tarafından düzenlenmesinin temsili olarak şematize edilişi..... 24

Şekil 10. Neuber lamının mikroskop altındaki temsili görünüşü Neubauer lamı; kalın, düz ve sayım odacıklarına sahiptir. Mikroskop altında bakıldığında üzerinde 16' şar küçük kareden oluşan toplam 4 büyük kare alan bulunmaktadır. 32

Şekil 11. Jurkat hücrelerinde Wip1'in mRNA ve protein düzeyinde analizi..... 50

Şekil 12. Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile 24 saat inkübasyonu sonrasında meydana gelen metabolik aktivite değişiminin % olarak gösterimi 51

Şekil 13. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 24 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimin % olarak gösterimi 52

Şekil 14. Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile 72 saat inkübasyonu sonrasında meydana gelen metabolik aktivite değişiminin % olarak gösterimi 54

Şekil 15. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimin % olarak gösterimi 55

Şekil 16. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinin Caspase 3/7 aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi**.** 56

Şekil 17. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü fazlarında meydana gelen değişimin % olarak gösterimi 57

Şekil 18. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi 59

Şekil 19. Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozlarının 72 saatte DDR elemanları üzerine etkileri 60

Şekil 20. Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinin senesens dozları ile 72 saat inkübasyonu sonrasında meydana gelen metabolik aktivite değişiminin % olarak gösterimi 61

Şekil 21. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü fazlarında meydana gelen değişimin % olarak gösterimi 62

Şekil 22. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi 63

Şekil 23. 72 saat etoposid (1 µg/ml) ve doxorubicin (0,2 µg/ml) ile muamele edilen Jurkat hücrelerinin mikroskop altında SA-β-gal boyama görüntüleri 65

Şekil 24. Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin senesens dozlarının 72 saatte DDR elemanları üzerine etkileri 66

Şekil 25. . Wip1'in DDR'de rol oynayan proteinlerin ifade düzeyleri üzerine etkisi 68

Şekil 26. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimin % olarak gösterimi 69

Şekil 27. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinin Caspase 3/7 aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi 71

Şekil 28. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü dağılımında meydana gelen değişimin % olarak gösterimi 72

Şekil 29. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi 73

Şekil 30. 72 saat etoposid (1µg/ml) ve doxorubicin (0,2µg/ml) ile muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinin mikroskop altında SA-β-gal boyama görüntüleri..... 75

Şekil 31. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü dağılımında meydana gelen değişimin % olarak gösterimi 76

Şekil 32. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi 77

Şekil 33. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış normal Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimin karşılaştırılması..... 78

Şekil 34. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin Caspase 3/7 aktivasyonunda meydana gelen değişimin karşılaştırılması..... 79

Şekil 35. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin hücre döngüsü dağılımında meydana gelen değişimin karşılaştırılması..... 80

Şekil 36. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin karşılaştırılması 81

Şekil 37. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin hücre döngüsü dağılımında meydana gelen değişimin karşılaştırılması 82

Şekil 38. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin karşılaştırılması 83

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Wip1'in tanımlanmış bazı defosforilasyon hedefleri 15

Tablo 2. Wip1'in aşırı ifade edildiği veya gen amplifikasyonunun arttığı bazı insan tümörleri 21

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddelerin listesi 28

Tablo 4. Çalışmalar sırasında kullanılan antikorlar ve oligoların listesi 29

Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemelerin listesi 29

Tablo 6. Çalışmalarda kullanılan alet ve cihazların listesi 30

Tablo 7. Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri 30

Tablo 8. Ayırıcı jel bileşenleri ve miktarları (belirtilen miktarlar 2 adet jel hazırlamak için kullanılır) 42

Tablo 9. Paketleyici jel bileşenleri ve miktarları (belirtilen miktarlar 2 adet jel hazırlamada kullanılır) 43

Tablo 10. İmmunoblotlamada kullanılan birincil antikorların spesifitesi firma bilgileri ve dilüsyon oranları 45

Tablo 11. İmmunoblotlamada kullanılan ikincil antikorların ürün kodu, firma bilgileri ve dilüsyon oranları 45

Tablo 12. A ve B solüsyon içerikleri 47

Tablo 13. cDNA sentez basamakları ile bu basamaklardaki sıcaklık ve bekleme süreleri 48

Tablo 14. PCR işleminde kullanılan malzemelerin miktarları 49

Tablo 15. PCR aşamaları ile bu aşamalardaki sıcaklık miktarları ve bekleme süreleri 49

ÖZET

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE WİP1 FOSFATAZIN KEMOTERAPİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

KARTAL NB. 2017, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017

PPM1/DWip1 (*Protein phosphatase 1D magnesium dependent/wild type p53 induced phosphatase*) genotoksik stres üzerine DNA hasarıyla p53'e bağlı olarak indüklenen bir serin/treonin fosfatazdır. Ancak Wip1 fosfataz stres ve doku tipine bağlı olarak E2F, CREB, c-Jun ve NF-κB gibi diğer transkripsiyon faktörleriyle de indüklenebilir. Wip1 fosfataz indüklendiğinde p53, Chk1, Chk2, γH2AX, ATM/ATR dahil çok sayıda proteini defosforilasyon yoluyla inaktive ederek stres cevaplarını azaltmakta ve sonuç olarak hücre döngüsü kontrol noktaları, senesens ve apoptoziside engellemektedir. Wip1'in özellikle *wt*-p53' e sahip insan solid tümörlerinde aşırı ifade edildiği, amplifiye olduğu ve mutasyona uğradığı ve böylece bir onkogen gibi davrandığı bilinmektedir. Wip1'in deregülasyonu solid tümörlerde kötü prognozla da ilişkililendirilmiştir. Ancak hematolojk kanserlerde ve özellikle *mt*-p53'e sahip olan akut lösemilerde Wip1'in aşırı ifade edildiğinde rolünü ve sonuçlarını gösteren kapsamlı bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışma da Wip1'i aşırı ifade eden ve *mt*-p53' e sahip olan akut T lenfoblastik lösemi hücre dizisi (Jurkat) kullanılarak Wip1'ın kemoterapi indüklü hücresel stres cevapları üzerine rolü araştırılmıştır.

Öncelikle Jurkat hücrelerinde Wip1 fosfatazın aşırı ekspresse olduğu qRT-PCR ve Western blot analizleriyle konfirm edilmiştir. Wst-1 testi ile etoposid ve doxorubicinin metabolik aktivite üzerinde etkilerinin zamana ve doza bağlı olduğu tespit edilmiştir. Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinle 24 saatlik muamelesi sonucunda apoptozise direnç gösterirken 72 saatlik muamele sonucunda apoptozis oranının arttığı Annexin V ve Caspase3/7 aktivasyon testleri ile belirlenmiştir. Benzer şekilde Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinle 72 saatlik inkübasyon sonucunda senesens oranının da oldukça düşük olduğu tesbit edilmiştir. Sonrasında Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicine cevaben DNA hasarı cevabının önemli elemanlarının ATM, ATR, Chk1, Chk2 ve γH2AX dahil fosforilasyon düzeyleri WB analiziyle test edildiğinde özellikle ATM ve ATR'nin fosforilasyon düzeylerinin çok düşük olduğu tesbit edilmiştir. Takiben Jurkat hücrelerinde

RNA interferansı yöntemiyle Wip1 hedeflendiğinde ise etoposid ve doxorubicine cevaben DDR elemanlarının hepsinin ATM, ATR, Chk1, Chk2 ve γH2AX dahil fosforilasyon düzeylerinin arttığı görülmüştür. Wip1'in Jurkat hücrelerinde RNA interferansı ile hedeflenmesi sürpriz bir şekilde AnnexinV ve Caspase 3/7 testi ile gösterildiği gibi apoptozis oranını azaltırken SA-β-gal testiyle gösteridiği gibi senesens oranını artırmıştır. Ayrıca Jurkat hücrelerinde Wip1'in knock-down edilmesinin hücre döngüsü tutuklanması üzerinde etkili olmadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Wip1 fosfataz, DNA hasarı cevabı, RNA interferansı, Akut lenfoblastik lösemi (ALL)

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF WIP1 PHOSPHATASE ON CHEMOTERAPHY INDUCED CELLULAR RESPONSE ON ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS

KARTAL NB. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Medicine Faculty Clinical Biochemistry Program Master Thesis, Aydın, 2017

Wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1/PPM1D), is a serin/threonine phosphatase induced upon genotoxic stress by DNA damage in a p53-dependent manner. However depending on the type of stress or tissue Wip1 phosphatase can be also induced by other transcription factors such as E2F, CREB, c-Jun and NF-κB. Upon induction, Wip1 dampens the stress responses by inactivating multiple proteins via dephosphorylation including p53, Chk1, CHK2, γH2AX, ATM/ATR consequently abrogates cell cycle checkpoints and inhibits senescence and apoptosis. Wip1/PPM1D is known to be overexpressed, amplified and mutated in human solid tumors hence displaying typical oncogenic properties. Deregulation of Wip-1 is also associated with poor prognosis in various types of human solid tumors. However, in hematological cancers, especially in acute leukemia containing *mt* p53, so far no data has shown the role of overexpression of Wip1 phosphatase and it's consequences. Hence, in this study Wip1 overexpressing acute T lymphoblastic leukemia cell line (Jurkat) containing *mt* p53 was used to investigate the role of Wip1 phosphatase on chemotherapy induced cellular stress responses.

Firstly, overexpression of Wip1 was confirmed with q-RT-PCR and Western blot analyses in Jurkat cells. Metabolik activity of Jurkat cells in response to etoposid and doxorubicin was determined by Wst-1 test in a time and dose dependent manner. When analysed for apoptosis in response to doxorubicin and etoposide treatment by Annexin V and Caspase3/7 tests for 24 h Jurkat cells showed resistance to apoptosis whereas they were responsive after 72 h treatment. Similarly when Jurkat cells were tested for induction of senescence in response to etoposide and doxorubicin treatment the amount of senescencent cells were also little. As next, when Jurkat cells were analysed for phosphorylation status of the key lements of DNA damage response (DDR) ATM, ATR, Chk1 and Chk2 as well as γH2AX, in response to etoposide and doxorubicin treatment by WB analysis, the results showed that

phosphorylation levels of the DDR elements especially ATM and ATR were significantly low. Accordingly targeting Wip1 levels by RNA interference were increased the phosphorylation status of all DDR elements including ATM, ATR, Chk1, Chk2 and γH2AX levels in Jurkat cells. Surprisingly, targeting Wip1 by RNA interference decreased the levels of apopotosis in Jurkat cells whereas it was increased the senescence levels as determined by AnnexinV and Caspase 3/7 and SA-β-gal tests, respectively. In addition knock down of Wip1 was not effective on cell cycle arrest in Jurkat cells.

Key words: Wip1 phosphatase, DNA damage response (DDR), RNA interferance (RNAi), Acute lymphoblastic leucemia (ALL)

1.GİRİŞ

Kanser pekçok moleküler değişikliklerden meydana gelen heterojen bir hastalıktır. Kanserin çok basamaklı evrimi ise; normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine ve normal dokulardan benign ve nihayetinde malign tümörlere dönüşümüne yol açan genetik değişikliklerin birikimine işaret eder (Bartek ve Lukas, 2003). Bu genetik değişiklikler; gün içerisinde mevcut olan çok sayıda stres faktörünün esasen organizmaların DNA'sı üzerinde meydana getirdiği hasarlar olup, bu hasarların birikimi sonucunda da 'genomik istikrarsızlık' olarak adlandırılan ve insan malignansilerinin çoğunda karakteristik olan bir durum açığa çıkmaktadır (Cadet ve Davies, 2017).

Genomik istikrarsızlıkla mücadele eden organizmalar, hasarlı DNA'nın tamiri ve genomik bütünlüğün sağlanması adına DNA tamirine olanak tanıyan hücre döngüsü kontrol noktalarının aktivasyonunu ve takiben DNA tamirini içeren kompleks bir DNA hasarı cevabı (DNA damage response, DDR) mekanizmasını geliştirirler (Broustas ve Lieberman, 2014; Liang ve ark, 2009). Bununla birlikte DDR, etkili bir şekilde DNA tamiri gerçekleştirilememiş olan hücreleri apoptozise veya senesense yönlendirerek hasarlı genomun çoğalıp mutasyonların oğul döllere aktarımını önlemede de kritik bir rol oynamaktadır. Böylece DDR'nin tümörigenez/kanser oluşumunu önlemede tümör süpresör bir bariyer olarak davrandığı anlaşılmaktadır (Broustas ve Lieberman, 2014; Hosoya ve Miyagawa, 2014). DNA hasarı sinyalinin algılanması, hücre döngüsü kontrol noktalarının aktivasyonu, DNA tamiri, apoptozis veya senesens gibi DDR'nin aktivasyonunu sağlayan mekanizmalardan birinde ya da birkaçında meydana gelen defektler veya onların fonksiyonel inaktivasyonları mutasyonların birikimine izin vererek tümör/kanser oluşumuna katkı sağlamaktadır. (Liang ve ark, 2009).

Kanser ile yakın ilişkili olan DNA hasarı ve DDR mekanizmalarının iyi bilinmesi; kanser oluşumunu ve ilerleyişini anlamada ve kanser terapisine yeni ve daha etkili, hedefe odaklı çözüm sağlamada önemli bir role sahiptir. Bu doğrultuda DDR'nin homeostatik bir düzenleyicisi olarak görev yapan Wip1 fosfataz enzimi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar dikkat çekici bir öneme sahiptir. Çünkü hücrede normal şartlar altında oldukça düşük düzeyde bulunan Wip1 fosfatazın regülasyonu bozulmuş ve sürekli ifade edilmeye başlamışsa onkogen özelliği kazanmakta böylece ATM/ATR indüklü DDR ile apoptozis ve senesens gibi tümör süpresör cevapları inhibe ederek tümörigenezi teşvik etmektedir

(Bartkova ve ark, 2006; Guezennec ve Bulavin, 2010; Lowe ve ark, 2012). Yapılan çalışmalar sonucunda; insan kanserlerinin bazılarında özellikle meme ve ovaryum kanserleri ile nöroblastoma, medullablastoma, pankreatik adenokarsinomada Wip1'in regülasyonunun bozularak aşırı ifade edilmesiyle bir takım onkogenik özelliklere sahip olduğu böylece tümörigenezi teşvik ettiği kanıtlanmıştır.

Wip1 üzerine yapılan kapsamlı çalışmalar ağırlıklı olarak solid ve p53'ün fonksiyonel olduğu tümörler üzerinden gerçekleştirilmiş olup hematolojik kanserlerde özellikle de p53 mutant malignansilerde kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Tek bir dokuya özgü olmayıp tüm dokularda ifade edilebilen ve p53'den bağımsız mekanizmalar tarafından da indüklenebilen Wip1 fosfatazın sadece solid ve p53'ün fonksiyonel olduğu tümörlerde önemli bir role sahip olmadığını diğer malignitelerde de tümörigez üzerinde etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu sebeple bu çalışmada akut lenfoblastik lösemiden biri olan p53 mutant Jurkat hücre dizilerinde PPM1D/Wip1 geninin aşırı ekspresyonunun ve aynı hücrelerde RNA interferansı yöntemi ile Wip1 ifadesinin baskılanmasının anti-kanser ilaç tedavisine dolayısıyla hücresel stres cevapları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Jurkat hücrelerinde böyle bir çalışmanın ilk defa gerçekleştirilmiş olması bu tez çalışmasının özgün nitelik taşıdığını göstermektedir. Ayrıca bu tez çalışması ALL'de yeni biyomarker, farmakolojik ve terapötik hedef ve stratejiler belirlenmesine böylece daha etkili tedavi cevaplarının oluşturulmasına da katkı sağlayacak olması açısından son derece önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DNA Hasarı ve DNA Hasarına Etki Eden Faktörler

Organizmalar gün içerisinde pekçok stres faktörüne maruz kalırlar. Bu stres faktörleri; iyonize radyasyon, U.V. ışınları, sigara, alkilleyici ajanlar, aflatoksinler, vinil klorid, hardal gazları vs. gibi dış kaynaklı (çevresel) olabileceği gibi, hücre içerisinde meydana gelen yanlış eşleşmeler (insersiyon, delesyon gibi), deaminasyon ve metilasyon gibi kimyasal değişimler, baz kayıpları, oksidatif hasar ve replikasyon hataları gibi iç kaynaklı faktörleride içermektedir (Elias ve ark, 2014; Zannini ve ark, 2014).Hücrelerin maruz kaldığı iç ve diş kaynaklı stres faktörleri DNA'da baz modifikasyonlarına, DNA protein çapraz bağlarına, zincirler arası çapraz bağlara, tek ve çift zincir kırıklarının oluşumuna sebep olarak DNA hasarlarını meydana getirirler (Hosoya ve Miyagawa, 2014). DNA hasarları mutajenik etkiye sahip oldukları için; replikasyon sırasında tamir edilemezlerse kanser ve yaşlanma gibi ağır insan patolojilerini açığa çıkarırlar (Bhattacharjee ve Nandi, 2017).

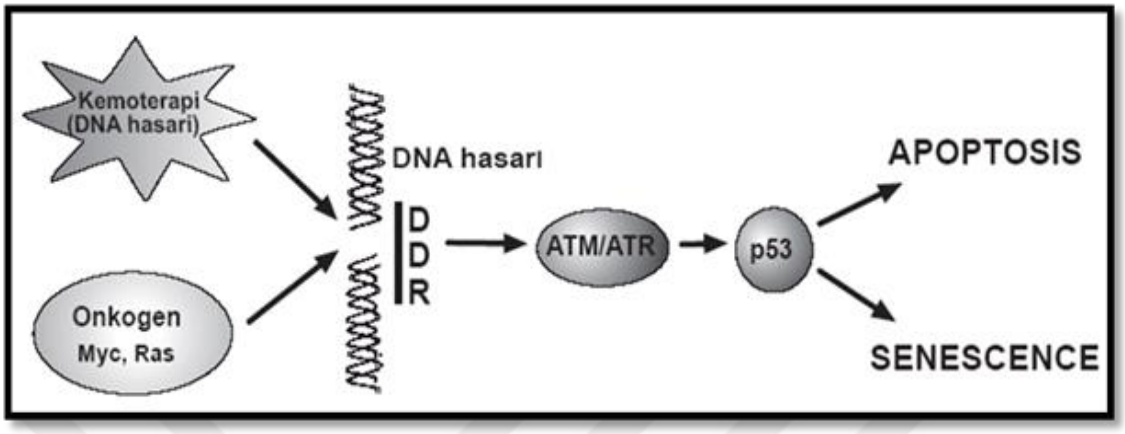
DNA hasarı gerçekleşmiş bir hücre hayatta kalmak, çoğalmak ve kansere dönüşümünü engellemek için sters faktörlerine çeşitli sinyal kaskadlarını uyararak gerekli tedbirlerin alınmasını sağlamaktadır (Cha ve ark, 2010). Bu tedbirlerin alınmasını sağlayacak olan en önemli sinyal kaskadı ise DNA hasarı cevabıdır (Blackford ve Jackson, 2017).

2.2. DNA Hasarı Cevabı

DDR, DNA hasarına yanıt olarak aktive edilen bir süreçtir ve DNA tamirini koordine eden mekanizmaların düzenlenmesinden sorumludur. DDR, DNA'da meydana gelen lezyonları gidererek hücrenin genomik bütünlüğünü korumayı hedefler (Zannini ve ark, 2014).

DNA hasarı gerçekleşmiş hücrede aktive olan DDR; hücre içi ve hücreler arası farklı sinyal olaylarını ve enzim aktivitelerini gerçekleştirir. Bu olaylar; hücre döngüsü tutuklanmasını, DNA replikasyonunun düzenlenmesini ve DNA tamirine olanak tanıyan mekanizmaları içerir (Sun ve ark, 2017). Eğer DNA tamiri mümkün olamazsa veya uygun bir şekilde tamir gerçekleştirilemezse hücrenin genomik bütünlüğü sağlanamayacağından

DDR Şekil 1.'de gösterildiği üzere apoptozis ve senesens gibi alt mekanizmalarını aktive ederek tümör supresör bir bariyer gibi davranır ve hasarlı DNA'nın çoğalmasına engel olur (O'Connor, 2015; Kang ve ark, 2015).



Şekil 1. DNA hasarı cevabı sinyal yolları aktivasyonu

2.3. DDR Aktivasyonu ve Önemli Elemanları

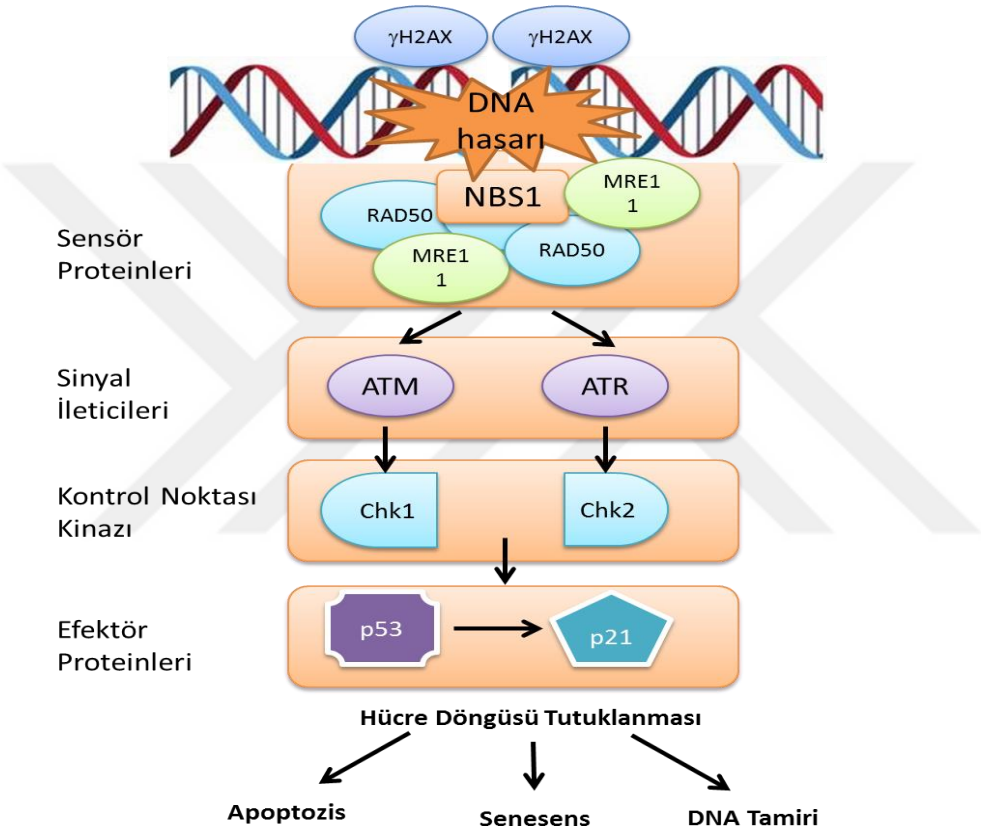
DDR; fosforilasyon ve defosforilasyon olayları ile düzenlenen bir sinyal ağına sahiptir ve üç temel bileşen üzerinden yönlendirilir. Bunlar; Şekil 2.'de gösterildiği gibi sensörler (MRE11-RAD50-NBS1 kompleks proteini kısaca MRN olarak ifade edilir), sinyal ileticileri (ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 kinaz) ve efektörler (p53, p21, CDC25A/B/C) olarak adlandırılırlar (Macurek ve ark, 2013; Shimada and Nakanishi, 2013).

DDR'nin aktivasyonu ilk olarak sensör proteini olan MRN kompleksinin hasarlı bölgeye gelerek bağlanması ile başlar. Bu durum önemli sinyal ileticileri olan ATM (ataxia telangiectasia mutated) ile ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) kinazın otofosforilasyon yoluyla aktive olmasını teşvik eder (Rendtlew Danielsen et al., 2009; Macurek ve ark, 2013).

ATM ve ATR kinazlar DDR'de anahtar rol oynayan iki düzenleyici proteindir. Bu kinazlar, DNA hasarına karşı çeşitli substratları fosforile ederek hücresel tepkileri düzenlemekte ve kromatin organizasyonu ile gen ekspresyonunda da yoğun değişiklikleri tetikleyerek DDR'de yer alan çok sayıda basamakları aktive etmektedirler (Shiloh, 2003; Shimada and Nakanishi, 2013).

ATM ve ATR kinazların aktivasyonu DNA'da meydana gelen hasarın çeşidine bağlı olarak gerçekleşir. DNA'da ki çift zincir kırıkları ATM'yi aktif hale getirirken, tek zincir kırıkları sonucu ise ATR aktive edilir (Macurek ve ark, 2013).

Yapılan çalışmalarla; DDR'de enzimatik aktivitelerin, lokalizasyonun, protein-protein etkileşimlerinin ve stabilizasyonun düzenlenmesi için serin (S) / treonin reziduları üzerinde gerçekleştirilen fosforilasyon / defosforilasyon işlemlerinin esas olduğu gösterilmiştir (Shimada ve Nakanishi, 2013).



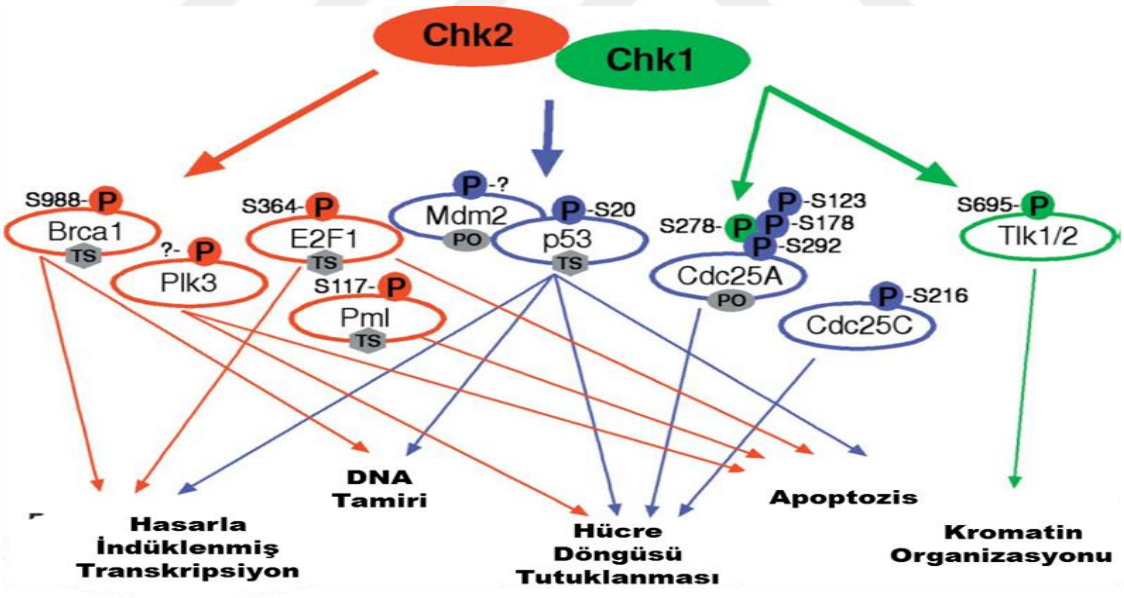
Şekil 2. DNA hasarı cevabı mekanizması ve görev alan önemli proteinlerin aktivasyonu

DNA hasarından hemen sonra γH_2AX S139 rezidusu üzerinden; ATM / ATR tarafından fosforillenir ve oluşan modifikasyon, adaptör protein MDC1'in aktivasyonunu sağlar (Şekil 2.). Böylelikle kromatin organizasyonu ile ilgili basamaklar başlatılır (Ronchetti ve ark, 2017). Kromatin organizasyonunda görev alan çeşitli proteinler, DNA tamiri sinyallemesi kararının verilmesini sağlar. Kromatinde devam eden sinyal olaylarına paralel olarak ATM/ATR; DNA hasarı indüklü kontrol noktasının aktivasyonunda etkili ve çok önemli rolleri olan kontrol noktası kinazlarını (Chk2, Chk1) aktive ederler. (Şekil 2.).

ATM Chk2'yi Thr68 rezidusu üzerinden, ATR ise Chk1'i S345 ve S317 üzerinden fosforilleyerek aktive eder (Yoda ve ark, 2008; Zannini ve ark, 2014).

Chk2; hücre döngüsü boyunca ifadesi stabil olan bir proteindir ve DNA hasarının olmadığı durumlarda genellikle inaktif halde bulunur (Di Benedetto ve ark, 2017). DNA' da meydana gelen hasarlar (özellikle çift zincir kırıkları) sonucu Chk2; ATM tarafından aktive edilir ve aktivasyonunu dimerizasyon ve otofosforilasyon ile sürdürür. Chk2'nin aksine Chk1 proteini; çoğunlukla S ve G2 fazları ile sınırlandırılır. DNA hasarının mevcut olmadığı durumlarda dahi hücre döngüsü boyunca aktif halde bulunan Chk1'in, DDR ile aktivasyonu arttırılır (Bartek ve Lukas, 2003). Chk1 aktivasyonu dimerizasyon ve otofosforilasyona gerek duymaz (Di Benedetto ve ark, 2017).

Ayrıca Chk1 ve Chk2 kinazlar; DNA replikasyonu ve hücre döngüsü ilerleyişi, kromotin organizasyonu ve apoptozis gibi önemli hücresel fonksiyonların düzenlenmesinden de sorumludurlar (Massey, 2016).



Şekil 3. Kontrol noktası sinyalizasyon ağının önemli aracıları olan Chk1-Chk2 ve görev aldıkları hücresel mekanizmalar (Bartek ve Lukas, 2003'den modifiye edilerek alınmıştır).

Şekil 3.'de; yeşil ile Chk1'in, kırmızı ile Chk2'nin ve mavi ile hem Chk1'in hem de Chk2'nin hedef bölgeleri gösterilmiştir. Chk1 ve Chk2 aktive olduktan sonra kontrol noktası

sinyalizasyonunun yayılmasına yardımcı olan efektör proteinlerin fosforilasyonunu gerçekleştirirler. Bu durum sters indüklü transkripsiyona (E2F1, Brca1, p53), doğrudan veya dolaylı olarak DNA tamirinin başlamasına (Brca1, p53), hücre döngüsü progresyonunun geciktirilmesine (Cdc25A) veya hücre döngüsü tutuklanmasının sürdürülmesine (Cdc25C, p53, Plk3), apoptozise (p53, E2F1, Pml) ve kromatin organizasyonuna aracılık eden yolakların düzenlenmesine sebep olur. Ayrıca Chk1'in ve Chk2'nin fosforile ettiği bazı efektör proteinler arasında protoonkogenler ve tümör süpresör proteinlerde yer almaktadır (Bartek ve Lukas, 2003).

DDR'de ATM ve ATR kinazlar tarafından aktive edilen Chk1 ve Chk2, siklin bağımlı kinazların aktivasyonunu engelleyen üç önemli fosfatazı yani CDC25A, CDC25B, CDC25C'yi inaktive ederek hücre döngüsünün ilerleyişini geçici olarak durdururlar (Hurley ve Bunz, 2007). Ayrıca; ATM ve ATR kinazlar MDM2'yi de direkt inhibe ederek tümör süpresör bir protein olan p53'ün stabilizasyonunu ve transkripsiyonel aktivasyonunu da sağlamaktadırlar (Goloudina ve ark, 2016). Aktive olan p53 ise p21'in aktivasyonunu indükleyerek, hücre döngüsünü teşvik eden çok sayıda proteinin ifade edilmesini baskılar ve hücre döngüsünün tutuklanmasına katkıda bulunur (Medema ve Macurek, 2012; Sun ve ark, 2017). Esasen hücre döngüsü tutuklanması; DNA tamirinin gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan zamanın tanınmasını sağlar böylece hücrenin hasarlı DNA ile hücre bölünmesine doğru ilerleyişi engellenmiş olur (Shaltiel ve ark, 2015).

2.4. DNA Tamir Mekanizmaları

DNA'da meydana gelen çeşitli hasarların onarımı; birbirinden bağımsız veya koordineli olarak çalışan farklı tamir mekanizmaları ve sinyal yolakları aracılığıyla gerçekleştirilir (Hosoya ve Miyagawa, 2014; O' Connor, 2015). Örneğin; çift zincir kırıkları tamiri, homolog rekombinasyon (HR) veya non-homolog uç birleştirme tamiri (non-homologous end joining, NHEJ) tarafından gerçekleştirilir (Ceccaldi ve ark, 2016; Hartlerode ve Scully, 2009). Tek zincir kırıkları ve küçük DNA değişimleri ise; baz çıkarımı onarım sistemi (base-excision repair, BER) proteinleri ile onarılır (Caldecott, 2015). U.V. ışınlarının sebep olduğu pirimidin dimerleri gibi büyük DNA lezyonları için; nükleotid çıkarımı onarım (nukleotide excision repair, NER) yolağı aktive edilir (Zhu ve Wani, 2017). Çapraz bağlanmaların tamirinde ise; Fankoni anemisi (FA) yolağı önemli bir rol oynar (Kim ve D'Andrea, 2012).

DNA tamiri gerçekleştirilmiş olan bir hücrenin, kaldığı yerden normal döngüsüne devam edebilmesi için DDR sonlandırılır. DDR'nin sonlandırılması; DNA tamirine eş zamanlı olarak p53'ün ve diğer DDR mekanizmasında yer alan önemli moleküllerin fosfatazlar tarafından azaltılması veya baskılanmması ile gerçekleştirilir. Bu sayede; hücrenin homeostatik durumuna tekrardan dönmesi kolaylaştırılmış olur (Freire, 2013). Bu mekamizmada görev alan en önemli fosfataz ise Wip1 fosfatazdır.

2.5. Wip1 Fosfataz

PPM1D/WİP1 (Protein phosphatase 1D magnesium dependent/wilt type p53 induced phosphatase) geninin ürünü olan Wip1 fosfataz, bir serin/treonin fosfataz olan PP2C ailesinin üyesidir (Shen ve ark, 2017).

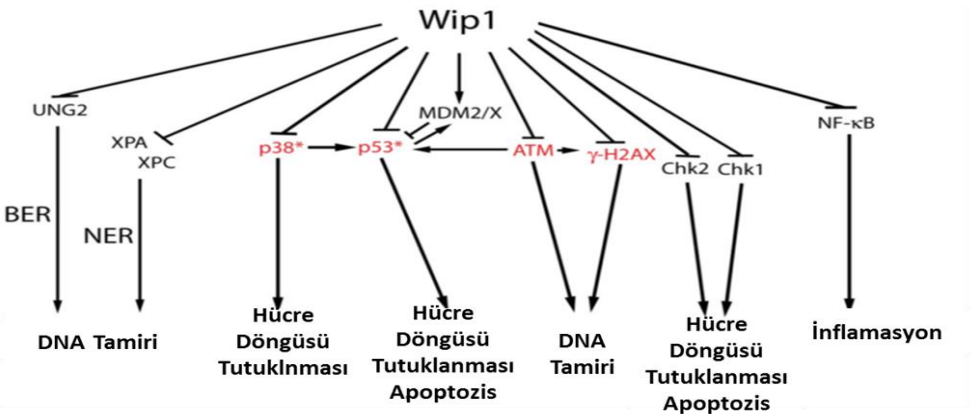
Serin/ treonin fosfatazlar dizi, yapı ve biyolojik özelliklerine göre; Mg^{+2}/ Mn^{+2} bağımlı fosfatazlar (PPM/PP2C ailesi) ve fosfoprotein fosfatazlar (PPP ailesi) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Ashton ve ark, 2017).

PPP ailesinin üyeleri çok fazla izoform içerir ve bunların substratları nisbeten iyi karakterize edilmiştir. PPP ailesinin üyeleri iyi bir substrat özgüllüğüne sahip değildir. Bu yüzden çok sayıda katalitik alt birimlere sahiptir. Bu katalitik alt birimler; substrat özgüllüğüne aracılık eden ve fosfataz aktivitesini ayarlayan çok sayıda regülatör ile etkileşim halinde bulunarak hedef proteinlerle bağlanma motifleri oluştururlar. En önemli hedef proteinleri ise çeşitli DDR'de yer alan BRCA1, pRB, 53BPI ve Cdc25'tir. Ayrıca PPP ailesinin bazı üyeleri ve onların izoformları DNA hasarını takiben; Repo-Man gibi kromatin hedefli alt birimlerle kompleks oluşturarak kromatinden salınır ve DNA hasarı bulunan bölgede ATM aktivasyonunu gerçekleştirerek DDR'nin başlatılmasına aracılık ederler (Shimada ve Nakanishi, 2013).

PP2C ailesinin üyeleri ise; oldukça korunmuş monomerik serin/treonin fosfatazlar olup mikrosistin ve okadaik asit inhibisyonuna duyarsızdırlar. Ayrıca aktivasyonları için Mg^{+2} ve Mn^{+2} gibi iki değerlikli katyonlara gereksinim duyarlar (Lu ve ark, 2008; Guezennec ve Bulavin, 2010; Shimada ve Nakanishi, 2013). İnsan genomunda yaklaşık 18 tane PP2C geni tanımlanmıştır (Madrid ve ark, 2007). PP2C üyeleri substrat özgüllüğüne sahip olduklarından PPP fosfatazların aksine; düzenleyici alt birim içermezler bunun yerine spesifik düzenleyici ve hedef domainleri içererek hedef moleküllerle doğrudan bağlanma

motifi oluştururlar (Shimada ve Nakanishi, 2013). Bu grubun üyeleri hem prokaryotlarda hemde ökaryotlarda hücresel stres sinyallerinin inhibisyonunda rol alarak stres cevabı yolaklarının regülasyonunu sağlarlar (Jackson ve Denu, 2001). Özellikle Wip1 fosfataz; DDR'nin sonlandırılması ve kontrol noktalarından geri toparlanmada merkezi bir rol oynamaktadır.

Wip1 ilk olarak 1997 yılında Fiscella tarafından keşfedilmiştir. Başlangıçta p53 pozitif olan Burkitt lenfoma hücrelerinde; iyonize radyasyonla hızlı bir şekilde p53'e bağımlı olarak indüklenmiş nükleer bir fosfataz olarak tanımlanmıştır (Shen ve ark, 2017; Zhao ve ark, 2016). Ancak ilerleyen yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde Wip1 ifadesinin başka stres faktörleriyle (U.V., anisomisin, inflamatuar sitokinler, hidrojen peroksit, metil metan sülfanot…) de artmakta olduğu kanıtlanmıştır (Chew ve ark, 2009; Lowe ve ark, 2012). Tek bir dokuya özgü olmayıp tüm dokularda ifade edilebilen ve çeşitli stres faktörleri ile indüklenen Wip1; stres sinyallerinde yer alan önemli sinyal proteinlerine doğrudan bağlanmakta ve fosfataz aktivitesi sayesinde stres sinyallerini düzenlemektedir. Wip1'in bu hedefleri arasında; hücre döngüsü tutuklanmasında, apoptozisde ve senesensde rol oynayan p38 MAPK, p53, Chk1, Chk2, p16, p19 ile DNA tamirinden sorumlu γH2AX, ATM, ATR, UNG2 gibi önemli proteinlerin fosforile formları yer almaktadır (Wang ve ark, 2017).



Şekil 4. Wip1'in hedefleri fonksiyonel aktivasyonunun sonuçları (Lowe ve ark, 2013'den modiye edilerek alınmıştır).

Wip1 sinyal iletilerini defosforilasyon yolu ile gerçekleştirir. Böylece apoptozisi engeller, DNA tamirini inhibe eder, hücre döngüsünü durdurur ve inflamasyonu azaltır. Şekil 4.'de gösterilen kırmızı işaretli proteinlerin hepsi tümör baskılanmasında rol oynar ve Wip1 tarafından bunların inhibisyonu tümörigenezi teşvik eder (Lowe ve ark, 2013).

2.6. Wip1'in Transkripsiyon Faktörleri ve Transkripsiyonel Olarak Düzenlenmesi

PPM1D/Wip1 geninin promotör bölgesi guanin (G) ve sitozince (C) zengin olup hem genotoksik hemde onkogenik stres cevabında görev alan çeşitli transkripsiyon faktörleri için bağlanma motifleri içerir. Strese karşı dokuya özgü yanıtları ayarlama konusunda karmaşık bir düzenleme gösteren PPM1D/Wip1 geninin regülasyonu, stres çeşidine ve doku tipine bağlı olarak uygun transkripsiyon faktörleri ile düzenlenir. Bu transkripsiyon faktörleri Şekil 5.'de gösterildiği üzere östrojen reseptör alfa (ERalpha), c-jun, CREB, E2F, NF-kappaB ve p53'tür (Lowe ve ark, 2010; Lowe ve ark, 2013; Goloudina ve ark, 2016).



BÖLGE	LOKASYON	SEKANS	TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ
p53RE	-168	GGACAAGTCCAGACATCGCG	p53
c-jun	-284	GTGACGTCAGC	c-jun
CRE	-283	TGACGTCA	CREB
ERE	-309	GGATTGGTCGAGC	ERα
	-1057	TGGGATTGTGACC	ERα
	-1191	TGAAGAAATGGCC	ERα
	-2730	GGTAATAGTGGCC	ERα
	-2952	GCCCGCGTTGGCC	ERα
	-2989	GGCCATGTTGGCC	ERα
E2F1	-652	TTTCCCGC	E2F1
κB	-793	GGAAATTTCC	NF-κB

Şekil 5. PPM1D/Wip1 geni üzerinde transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin gösterimi (Lowe ve ark, 2013'den alınmıştır).

Şekil 5.'de temsili olarak gösterilen PPM1D promotörünün şeması transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini göstermektedir.

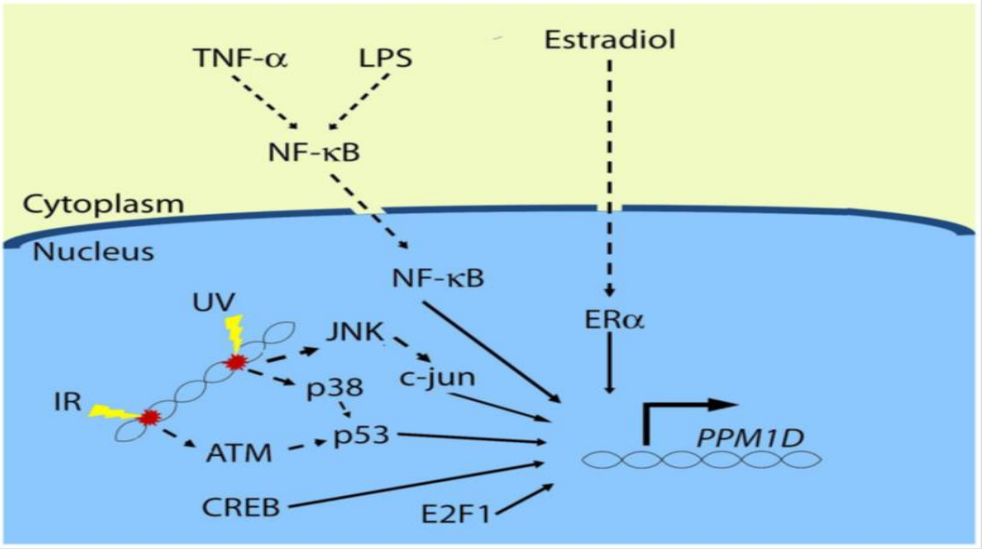
Bilinen en önemli tümör süpresör protein olan p53 aynı zaman da bir transkripsiyon faktörüdür ve genellikle genotoksik stresle ekspresyonu indüklenerek stabilizasyonu sağlanır ve devamında p53, kendisine bağımlı olarak indüklenen genlerin (p21, PUMA, Fas, PPM1D gibi) promotörlerine bağlanarak bu genlerin transkripsiyonlarının aktivasyonunu gerçekleştirir (Kleiblova ve ark, 2013). İlk olarak Fiscella ve ark (1997) tarafından Wip1'in p53'e bağımlı olarak aktive olduğu bildirilmiştir ancak gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda PPM1D promotöründe p53 bağlanma bölgesinin bulunduğunu tespit edememişlerdir. İlerleyen yıllarda Rossi ve ark (2008) HCT116 kolon kanseri hücrelerinin PPM1D promotöründe korunmuş bir p53 cevap elementi (p53ERE) bulunduğunu

tanımlamışlardır ve bu elementin PPM1D'nin p53 bağımlı transkripsiyonunun indüklenmesi için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada gerçekleştirilen analizler sonucu I.R. sonrası p53'ün PPM1D'nin promotörüne bağlandığı saptanmıştır (Rossi ve ark, 2008). Genotoksik stresin çeşidine bağlı olarak farklı mekanizmalarla aktive edilen p53'ün (I.R. ile Ser15, U.V. ile Ser33 ve Ser46 reziduları üzerinden ATM/ATR tarafından fosforilasyonu gerçekleştirilir) PPM1D'nin transkripsiyonel aktivasyonunda rol oynadığı sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir (Bulavin ve ark, 2002; Sriraman ve ark, 2016).

p53ERE dışında PPM1D'nin promotöründe evrimsel açıdan korunmuş ve -793 baz çiftlik bir alana lokalize olmuş κB bölgesi bulunmaktadır. Bu durum stres faktörlerine hücresel yanıtta, inflamasyonda ve özelliklede inflamasyona bağlı karsinogenez oluşumunda görev alan NF-κB'nin PPM1D geninin transkripsiyon seviyesinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir (Cartwright ve ark, 2016). Kimyasal olarak veya siRNA ile NF-κB inhibisyonu MCF7 meme kanseri hücrelerinde Wip1'in mRNA ve protein seviyesini azaltmaktadır. Bu durum kısmende olsa Wip1'in bazal ekspresyonunda NF-κB'nin etkili olduğunu göstermektedir (Lowe ve ark, 2010). Bununla birlikte Zhong ve ark (2016); NF-κB aktivitesi uyarılmış hücrelerde hem mRNA hem de protein düzeyinde Wip1 ekspresyon seviyesinin arttığını, NF-κB aktivasyonunun baskılandığı hücrelerde ise Wip1 mRNA ve protein düzeylerinin azaldığını belirtmişlerdir. Bu doğrultuda NF-κB; Wip1'in pozitif bir düzenleyicisi olarak değerlendirilmektedir (H. Zhong et al., 2016). Öte yandan Wip1'in fonksiyonel sonuçlarından biri de NF-κB sinyal yolağının inaktivasyonudur (Wamsley ve ark, 2017). Wip1 bunu iki farklı mekanizma ile gerçekleştirmektedir. Birincisi; NF-κB'yi Ser536 rezidusu üzerinden defosforile ederek doğrudan inaktive eder. İkincisi ise; p38 MAPK inaktivasyonu aracılığıyla NF-κB'nin dolaylı olarak aktivasyonuna engel olur (Chew ve ark, 2009; Zhong ve ark, 2016). Bu bilgiler ışığında Wip1 ve NF-κB arasında bir geri bildirim inhibisyon mekanizması olduğu anlaşılmaktadır (Wamsley ve ark, 2017). Hem NF-κB'nin hem de Wip1'in hücre içerisinde ki işlevi; stres sinyalizasyonlarını ortadan kaldırmak ve hücrenin homeostatik durumuna dönmesini kolaylaştırmaktır. Ancak aralarında ki regülasyonun çeşitli faktörlerle bozulması durumunda karmaşık stres sinyali yolaklarının yapısı bozularak tümör oluşumuna zemin hazırlamaktadır (Lowe ve ark, 2013; Zhong ve ark, 2016; Wamsley ve ark, 2017).

Hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında ve sağ kalımında görev alan genlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde ve özellikle akut lösemili hastalarda aşırı derecede ifade

edilen CRE-bağlayıcı protein (CREB)'nin Wip1 fosfatazın da transkripsiyonel olarak düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Shi ve ark, 2004; Cheng ve ark, 2009). Konu ile ilgili olarak; insan ve homolog fare genlerinde yapılan kapsamlı çalışmalar neticesinde PPM1D geninin promotör bölgesinde korunmuş bir siklik adenozin yanıt elemanı (CRE) tespit edilmiştir (Rossi ve ark, 2008; Lowe ve ark, 2013). Ayrıca; insan böbrek ve hepatositleri ile HEK293 hücrelerinin PPM1D promotöründe CRE bağlanma proteini (CREB) saptanmıştır (Zang ve ark, 2005; Rossi ve ark, 2008). Böylece PPM1D potansiyel bir CREB hedef geni olarak tanımlanmıştır (Rossi ve ark, 2008). Yine yapılan bir çalışmayla I.R. sonrası PPM1D'nin promotör bölgesine CREB'in bağlanma miktarında artış olduğu tespit edilmiş ve bu durum I.R. sonrası PPM1D'nin transkripsiyonel olarak düzenlenmesinde p53 gibi CREB'in de rol oynadığı belirlenmiştir (Lowe ve ark, 2013). Ayrıca, Rossi ve ark (2008) yaptığı bir çalışmada HCT116 p53+/+ ve HCT116 p53-/- kolon kanseri hücrelerini herhangi bir stres faktörüne maruz bırakmadan karşılaştırarak CREB'in p53'ten bağımsız olarak Wip1'in transkripsiyonunda rol oynadığını kanıtlamışlardır.



Şekil 6. PPM1D'nin transkripsiyonel regülasyonu.
PPM1D'nin transkripsiyonu p53, CREB, E2F1, c-jun, ERα ve NF-κB tarafından gerçekleştirilir. PPM1D'nin bu faktörlerin herbiri tarafından ayrı ayrı düzenlenmesi veya bu faktörlerin PPM1D promotörüne bağlanmaları büyük bir olasılıkla stres çeşidine ve doku tipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Lowe ve ark, 2013'den alınmıştır).

Wip1'i aktive eden transkripsiyon faktörleri ile ilgili yapılan diğer çalışmalar sonucunda ise; PPM1D geninin promotöründe -652 baz çiftlik bir alanda E2F ailesinin

bağlanma motifi oluşturduğu belirlenmiştir. Konu ile ilgi olarak gerçekleştirilen bir çalışmada; RT-PCR ve ChıP analizleri ile E2F1'in bir hedefinin de PPM1D olduğunu bildirilmiştir (Hershko ve ark, 2006). Yine yapılan başka bir çalışmayla p53'ün negatif olduğu H1299 akciğer karsinoma hücrelerinde Wip1 regülasyonunda ki artışın E2F1 tarafından sağlandığı tespit edilmiş ve E2F1'in PPM1D transkripsiyonunu p53'den bağımsız olarak gerçekleştirdiği kanıtlanmıştır (Yang ve ark, 2010).

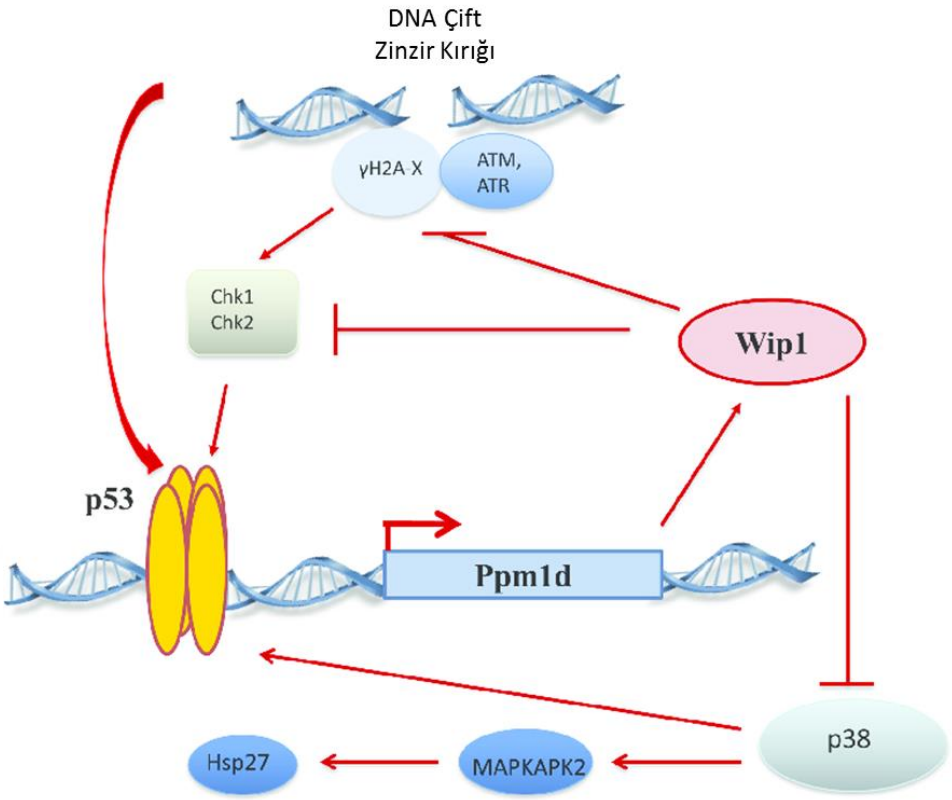
Wip1'in steroid bağımlı bir şekilde de düzenlenmiş olabileceği çeşitli bulgularla gösterilmiştir. Meme ve ovaryum kanserleri gibi steroidlerle düzenlenen kanser tiplerinde Wip1 aşırı ifade edilmektedir. Buna ek olarak göğüs tümörlerinin büyük bir bölümünde ERalfa yüksek derecede ifade edilmektedir (Lowe ve ark, 2013). Ayrıca; MCF7 hücrelerinde ERalfa'nın PPM1D'nin promotörüne bağlanarak Wip1'in pozitif regülasyonunda görev aldığı kanıtlanmıştır (Han ve ark, 2010; Martin-Millan ve ark, 2010).

2.7. Wip1'in Hücresel Tümör Supressör Cevaplar Üzerine Etkileri

Wip1 fosfataz; DDR, hücre döngüsü kontrol noktaları, apoptozis ve senesens gibi tümör baskılayıcı mekanizmalar üzerine etki etmekte ve bu mekanizmalarda kilit rol oynayan ATM, ATR, Chk1, Chk2, p53, p38, p16, p19 gibi çoklu tümör baskılayıcı proteinlerin aktivitelerini multipli mekanizmalarla inhibe ederek çeşitli hücresel düzenlemeleri gerçekleştirmektedir. (Yin ve ark, 2016; Wamsley ve ark, 2017)

2.7.1. PPM1D/Wip1 ve DDR'nin Kontrolünde ki Rolü

Wip1 DNA hasarı sonrası hücrelerin normal süreçlerine devam edebilmesi için; DNA tamirini takiben, kontrol noktalarının geri toparlanmasına yardımcı olan ve hücre proliferasyonunun kaldığı yerden tekrardan devam etmesine olanak tanıyan mekanizmaları aktive ederek DDR'yi sonlandırır (Pechackova ve ark, 2017). Böylece Wip1 DDR'nin homeostatik bir regülatörü olarak değerlendirilir. Bu doğrultuda, transkripsiyonel indüksiyonunu takiben nükleer olarak biriken Wip1; fosforile olmuş pSQ/pTQ ve pTxpY motiflerini tanıyarak Şekil 7.'de gösterildiği gibi DDR'nin önemli düzenleyicilerinden ATM/ATR ile onların çok sayıda ki substratını defosforilasyon yoluyla inaktive etmekte ve bu süreci gerçekleştirmektedir (Goloudina ve ark, 2016).



Şekil 7. Wip1'in fonksiyonel hedefleri ve DDR kontrolünde ki rolü (Goloudina ve ark, 2016'dan modifiye edilerek alınmıştır).

Wip1; DDR'de ve genomik stabilitenin sağlanmasında önemli rolü olan γH2AX' i Ser139 rezidusu üzerinden direkt defosforile ederek inaktivasyonunu sağlar. Benzer şekilde Wip1 p53'ün de Ser15'den direkt defosforilasyonunu sağlar. Bununla birlikte p53'ün hem Ser20, Ser33 ve Ser46 rezidularından fosforilasyonunu azaltarak hem de ATM'i Ser1981, Chk1'i Ser345, Chk2'yi Thr 68, MDM2'yi Ser395 ve p38MAPK'ı Thr180 rezidularından defosforile ederek p53'ü dolaylı ve çoklu mekanizmalarla baskılar (Jaiswal ve ark, 2017). Bununla birlikte Wip1 p53 sinyalini sadece p53 protein stabilitesini etkileyerek değil, aynı zamanda p53'ün hedef genlerinin transkripsiyonunu da baskılamak suretiyle etkilemektedir (Wamsley ve ark, 2017; Zhu ve Bulavin, 2012). Wip1'in bu fonksiyonunu p53'ün negatif düzenleyicileri olan MDM2 ve MDMX'i defosforile etmek suretiyle yaptığı böylece MDM2 ve MDMX tarafından p53'ün hedeflerinin transkripsiyonunu baskıladığı bilinmektedir (Pechackova ve ark, 2016).

Wip'in p38MAPK yolağını da direkt olarak inaktive etmesi Wip1'in diğer hücresel stres yolaklarını da etkili bir biçimde baskıladığına işaret etmektedir (Lu ve ark, 2008; Zhu ve Bulavin, 2012).

Tablo 1. Wip1'in tanımlanmış bazı defosforilasyon hedefleri (Lu ve ark, 2008'den modiye edilerek alınmıştır)

Protein	Bölge	Motif	Protein Fonksiyonu	Wip1'in Etkilediği Mekanizma
p38MAPK	T180	TXY	Stres Yanıtı	Kinaz Aktivitesi
UNG2	T6	TXY	Baz-çıkarımı Tamiri	Urasil Çıkarımı
Chk1	S345	S/TQ	DNA Hasarı Cevabı	Kinaz Aktivitesi
Chk2	T68	S/T/Q	DNA Hasarı Cevabı	Kinaz Aktivitesi
p53	S15	S/TQ	DNA Hasarı Cevabı	Apoptozis
ATM	S1981	S/TQ	DNA Hasarı Cevabı	Kinaz Aktivitesi
ATR	S428	S/TQ	DNA Hasarı Cevabı	Kinaz Aktivitesi
MDM2	S395	S/TQ	p53 Regülasyonu	p53 Seviyesi

2.7.2. Wip1 Fosfatazın Apoptazis Üzerine Etkisi

Apoptozis yani programlı hücre ölümü; hasarlı hücrelerin replikasyonunu engelleyerek genomik DNA'da ki hasarın sonraki kuşaklara aktarılmasını önler. DNA hasarı ile apoptozise gidememek hasarlı DNA mutasyonlarının sonraki kuşaklara aktarılmasına ve potansiyel tümör oluşumuna neden olacağından dolayı bu durum organizma açısından büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır (Gohler ve ark, 2011).

Hücrelerde apoptozis Bcl-2 gibi anti-apoptotik ve p53, Bax ve Caspaz 3 gibi pro-apoptotik faktörlerin dengelenmesi ile düzenlenmektedir (Feng ve ark, 2017).

İnsan kanserlerinin pekçoğunda tümör hücrelerinin stresten sonra apoptozisi indüklemesi için gerekli olan p53 gibi proteinlerin sıklıkla mutasyona uğradığı bilinmektedir (Mirzayans ve ark, 2013). Bununla birlikte hücreler; stres indüklü hasarın etkili bir şekilde tamiri gerçekleştirildikten sonra apoptozisin engellenmesi için, apoptotik yolakarın negatif regülasyonunu sağlayan proteinlere ihtiyaç duyarlar ve bu proteinlerden biri de Wip1 fosfatazdır (Issler ve Mombach, 2017).

P53 apoptozisin merkezi bir düzenleyicisidir ve p53 bağımlı apoptozis oldukça iyi karakterize edilmiştir. Bu doğrultuda; Wip1'in p53'ü direkt olarak inhibe etmesi ve sinyal

yolağının bir üst basamağında yer alan proteinlerin inaktivasyonunu sağlamasıyla apoptozisi baskılar böylece hücrenin hayatta kalımını teşvik eder (Mirzayans ve ark, 2013; Lowe ve ark, 2013).

Yapılan bir çalışmayla; Eμ-myc-indüklü lenfoma modelinde Wip1, myc-indüklü apoptozisi ATM-p53 yolağını inhibe ederek baskılamakta böylece tümörigenezi de teşvik ettiği görülmektedir. Bununla beraber; Wip1-/- farelerde myc-indüklü lenfoma tümörleri kontrol farelere göre oldukça yüksek apoptozis oranına sahip olduğu ve buna ATM'nin ya da p53'ün delesyonu eklendiğinde aynı tümörlerde apoptozisin azaldığı böylece Wip1 tarafından ATM'nin p53 sinyali inhibe edilerek farelerde sağ kalımın arttığı ortaya çıkarılmıştır (Shreream ve ark, 2006).

Ayrıca; fonksiyonel p53'e sahip meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada; ilgili hücrelerde ki Wip1 ifadesi siRNA ile azaltılarak apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir (Parssinen ve ark, 2008). Yapılan başka bir çalışmada ise; Wip1'i aşırı ifade eden wt-p53'e sahip MCF7 hücrelerinde Wip1'in azaltılması doxorubicin muamelesine cevaben apoptozisin seviyesini oldukça arttırdığı belirtilmiştir (Song ve ark, 2013).

Wip1 p38MAPK/p53 yolağında da negatif feedback bir etki oluşturarak apoptozisi inhibe edebilmektedir. Bu doğrultuda Takekawa ve ark (2000) *wt*-p53'e sahip A549 akciğer karsinomalarında p53'e bağlı Wip1 ekspresyonunun p38MAPK/p53 yolağını negatif düzenleyerek U.V. indüklü apoptozisi baskıladığını kanıtlamışlardır.

Wip1'in knock-down edilmesi ise tümör hücre gelişimini azaltarak apoptozis oranını arttırmaktadır. Bu doğrultuda gerçekleştirilen bir çalışmada, Wip1 knock-down edilen Hela hücrelerinde radyasyon sonrası p38MAPK'nın aktivasyonuyla hücre proliferasyonunun inhibe edilerek apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir (Wang ve ark, 2014). Bu konuda yapılan diğer bir çalışma insan ovaryum kanserlerinde Wip1'in susturularak apoptozisin indüklenmesi üzerinedir. Feng ve ark (2017) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada insan ovaryum karsinoma hücresi olan SKOV3 hücre dizilerinde Wip1 seviyesi siRNA ile susturularak p53'ün upregülasyonunu takiben p38MAPK sinyal yolağının ekspresyonu ve Bax/Bcl2 oranı artmış buna paralel olarak apoptozis oranında artış gözlendiği bildirilmiştir.

Ayrıca Wip1; E2F1 ve U.V. indüklü apoptozisi de p38MAPK aracılığıyla inhibe edebilmektedir (Chock ve ark, 2010). Hershko ve ark (2006) aktif E2F1'in; apoptozis sinyal düzenleyicisi kinaz1 (ASK 1) aracılığıyla p38MAPK'nın fosfosrilasyonunu ve

aktivasyonunu indüklediğini bildirmişlerdir. Daha önce bahsedildiği gibi Wip1 E2F1'in hedeflerinden biridir. E2F1 ile indüklenmiş Wip1 p38MAPK'ı defosforile ederek inaktivasyonunu sağlar. Dolayısıyla Wip1'in siRNA ile susturulması uzun süreli p38MAPK fosforilasyonuna sebep olur (Lowe ve ark, 2013). Yapılan bir çalışmada aktif p38MAPK'nın Wip1 tarafından inaktive edilmesi E2F1 indüklü apoptozisi baskıladığı bununla birlikte Wip1'in siRNA ile knock-down edilmesi sonucunda da apoptotik hücre miktarında artış olduğu saptanmıştır (Hershko ve ark, 2006).

Wip1'in aşırı ekspresyonunun Chk2 bağımlı apoptozis üzerinde de etkili olduğu çeşitli çalışmalarla incelenmiştir. Apoptozis sinyal yolaklarında görev alan Chk1 ve Chk2'nin fonksiyonu; p53 ile E2F1 proteinlerin her ikisinide fosforillemek böylece hem p53'e bağımlı hem de p53'ten bağımsız apoptozisi kolaylaştırmaktadır (Roos ve Kaina, 2006). Chk2'nin T68 fosforilasyonu; apoptozisin indüksiyonunda ve kendi kinaz aktivitesinin etkinleştirilmesinde önemlidir. Yapılan bir çalışmada I.R. sonrası Wip1'i aşırı ifade eden hücreler kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında Chk2'nin T68 rezidusu üzerinden gerçekleştirilen fosforilasyonun azaldığı tespit edilmiş ve fosforilasyonun azalmasının apoptozisi inhibe ettiği bildirilmiştir (Lowe ve ark, 2013).

Fare embriyonik fibroblastlarıyla (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEF) yapılan bir çalışmada da Wip1-/- MEF hücreleri anisomycin, etoposide, H_2O_2, U.V. radyasyonu ve staurosporin ile muamele edildikten sonra *wt*-MEF hücrelerine kıyasla daha yüksek düzeyde apoptozis oranına sahip oldukları saptanmıştır. Ayrıca bu Wip1-/- MEF hücrelerinde yine *wt*-MEF hücrelerine kıyasla p38MAPK ve JNK/c-Jun yolaklarının aktivasyonunun daha yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir (Xia ve ark, 2009).

Bu bilgiler doğrultusunda Wip1'in p53, E2F1, p38MAPK, JNK /c-Jun, Chk1 ve Chk2 yolaklarını da inhibe ederek apoptozisin global regülatörü olduğu sonucuna varılmıştır.

2.7.3. Wip1 Fosfatazın Kontrol Noktaları Üzerine Etkisi

Apoptozis gibi hücre döngüsü tutuklanması da hasarlı genomun DNA replikasyonunda kritik bir rol oynamaktadır. DDR, DNA hasarını takiben hücre döngüsünü ilgili kontrol noktaların aktivasyonunu sağlayarak geçici olarak durdurur ve böylece DNA tamirinin gerçekleştirilmesine olanak tanır. Bu sayede kontrol noktalarının aktivasyonu hasarlı DNA'nın sonraki kuşaklara aktarılmasını engelleyen bir bariyer gibi davranır (Shen veark, 2017).

Wip1 hücre döngüsü süresince farklı seviyelerde ifade edilmektedir. Bununla birlikte G1/S, intra S ile G2/M kontrol noktalarında önemli bir role sahiptir. Wip1'in protein ekspresyonu G1 evresinde düşük olmakla birlikte G2'de ise çok daha yüksek seviyeye ulaşmakta ve mitoz sürecinde de azalma göstermektedir (Macurec ve ark, 2017).

Yapılan bir çalışmayla Wip1-/- MEF'nin, *wt* MEF'e göre çok daha yüksek G2/M oranına sahip olduğu bilinmektedir (Oliva-Trastoy ve ark, 2007). Bununla birlikte Wip1'i aşırı ifade eden MCF7 hücreleri ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada; I.R.'a maruz kaldıktan 20 h sonra MCF7 kontrol hücrelerinin yaklaşık %70'inde mitoz ilerlemesi gözlenirken, GSK2830371 (Wip1 inhibitörü) ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde ise G2 tutuklanmasının devam ettiği tespit edilmiştir (Pechackova ve ark, 2016). Yapılan diğer çalışmalarla da bu bulgular desteklenmiş ve Wip1'i aşırı ifade eden hücrelerin I.R.'a maruz kaldığında daha düşük G2 tutuklanmasına sahip olduğu kanıtlanmıştır. Tüm bu çalışmalar neticesinde, DNA hasarı ile indüklenmiş G2 kontrol noktalarından geri toparlanmada Wip1'in gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Lindqvist ve ark, 2009).

Normal hücrelerle yapılan çalışmalarda G1 kontrol noktasından toparlanmada Wip1 aktivitesinin gerekli olmadığı belirtilmiştir. Öte yandan Wip1'i aşırı ifade eden veya C-terminalinden kesilmiş (truncated) Wip1'e sahip hücrelerde, Wip1'in sadece G2 kontrol noktasında değil G1 kontrol noktasında da etkili olduğu kanıtlanmıştır (Choi ve ark, 2002; Kleiblova ve ark, 2013; Pechackova ve ark, 2016). Yine düşük dozda I.R.'a maruz kalan MCF7 hücreleri ile geçekleştirilen bir çalışmada; GSK2830371 ile muamele edilen hücrelerin kontrol hücrelere kıyasla G1 kontrol noktasında daha güçlü bir birikim gösterdiği belirtilmiştir (Pechackova ve ark, 2016). Ayrıca; truncated Wip1'e sahip U2OS (osteosarkoma) ve HTC116 (kolorektal adenokarsinoma) hücrelerinde RNAi aracılığıyla Wip1'in azaltılması ile I.R. sonrası G1 tutuklanması gözlenmiştir (Kleiblova ve ark, 2013).

Wip1'in aşırı ifade edildiği ve Wip1'in baskılandığı hücrelerde yapılan çalışmalar ayrıca Wip1'in intra-S faz kontrol noktasını da regüle ettiğini göstermiştir (Lu ve ark, 2008).

Tüm bu çalışmalar neticesinde Wip1'in aslında hücrenin strese maruz kaldıktan sonra normal döngüye girebilmesi için G1/S, G2/M ve intra S fazlarının negatif regülasyonunu sağladığı görülmektedir. Bu durumda hücreler proliferasyona devam edebilmekte ve bu da Wip1'in tümörigenezi teşvik etmek için kullandığı diğer bir yol olarak gösterilmektedir (Lindqvist ve ark, 2009).

2.7.4. Wip1'in Hücresel Senesens Üzerine Etkileri

Hücresel senesens hücre bölünmesinin geri dönüşümsüz durdurulmasıdır. Hücresel senesens replikatif senesens ve prematüre senesens olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Replikatif senesens; hücre bölünmesi sırasında meydana gelen telomer kısalmasına bağlı olarak aktive edilen sinyaller tarafından tetiklenir. Premature senesens ise; genç hücrelerde, belirli onkogenlerin aktivasyonu (örn. Ras, Braf) veya tümör supresör gen inaktivasyonu (örn. PTEN), mitojenik stimülasyon, DNA hasarı yaratan anti kanser ajanları, oksidatif stres gibi çeşitli mekanizmalarla indüklenebilir. Senesensin indüksiyonuna ve sürekliliğine $p16^{INK4A}$-Rb ve $p19^{ARF}$-p53-p21 olarak bilinen iki ana tümör süpresör yol aracılık eder. Bununla birlikte senesens hangi yol üzerinden indüklenirse indüklensin ATM/ATR kinazların aktivasyonu ile yürüyen DNA hasarı sinyal yollarının (DDR) aktivasyonuna ihtiyaç duyar (Kilic ve Schmitt, 2008). Özellikle onkogen aktivasyonu ile indüklenen senesensin (OIS) kansere karşı bir başlangıç bariyeri gibi davrandığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, OIS'in çoğunlukla p53'ün ve $p16^{INK4A}$'nın fonksiyonuna dayandığı ve p53'ün fonksiyonunu bozan faktörlerin bu anti-tümör bariyerin aktivasyonunu engelleyerek kanser gelişimini teşvik ettiğine işaret etmektedir (Kilic Eren ve Tabor, 2014). Bununla birlikte, kanser hücreleri onkogen aktivasyonu ile indüklenen senesens bariyerini aşmalarına rağmen, DNA hasarına yol açan çeşitli ajanların kullanılmasına cevaben senesense uğrama yeteneklerini korumaktadırlar. Bu nedenle senesensin kanser hücrelerinde indüksiyonu kanser tedavisi için temel olarak alınabilir. Bu anlamda DNA hasarı yaratan ajanlarla ya da radyo terapi ile indüklenen senesens, apoptozis yanında kemoterapiye diğer bir majör hücresel cevap olarak yerini almaktadır. Yine yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinde halen

sağlam bir senesens yolağının var olmasının özellikle kritik olduğunu göstermektedir (Kilic ve Schmitt, 2008; Kilic Eren ve Tabor, 2014).

Wip1'in aslında p53'ün direkt trankripsiyonel hedefi olması ve p53'ün de negatif regülasyonunu sağlamasıyla, DDR'nin önemli elemanlarını (ATM, ATR, Chk1, Chk2 ve p38MAPK) defosforile etmesiyle senesensin regülasyonunda da yer almaktadır. Wip1'in primer insan fibroblastlarında malin transformasyona karşı bir bariyer gibi davranan RAS onkogeniyle indüklenen senesensi inhibe ettiği bildirilmiştir (Lu ve ark, 2008). Buna karşı, PPM1D -/- fare embiryonik fibroblastlarında diğer onkogenlerin (Ras, Erbb2, Myc, E1A) varlığında transformasyona direnç göstermişlerdir (Bulavin ve ark, 2004). Bu konuda yapılan bir çalışmada A549 ve MCF7 hücrelerinde doxorubicinle indüklenen senesens sırasında Wip1'in ifadesinin azaldığı bildirilmiştir (Crescenzi ve ark, 2013). Ayrıca aynı hücrelerde senesens indüklendikten sonra Wip1'in aşırı ifadesi G2/M kontrol noktasını bozmuş ve bu hücrelerin mitotik katastrofiye gitmelerine sebep olmuştur. Bundan başka normal insan mezenkimal kök hücrelerinde Wip1'in ifade edilmesi senesensin aşılmasına yol açmıştır (Lee ve ark, 2009).

Wip1'in senesens üzerinde etkileri ve bunların mekanizmalarını açıklayabilecek çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte yapılan çalışmalarla Wip1'in senesensi negatif regüle ettiği ve kendi aktivitesinin senesens sırasında negatif regüle edildiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

2.8. Wip1'in Onkogen Rolü ve Tümörigeneze Etkisi

Wip1 fosfatazın ATM/ATR-Chk1/2-p53 ve p38 MAPK - $p19^{ARF}$ /$p16^{INK4A}$ gibi tümör süpressör sinyal yolaklarında düzenleyici fonksiyonlara sahip olması bu proteini kodlayan gende meydana gelebilecek mutasyonların büyük bir onkojenik potansiyele sahip olabileceğini akla getirmektedir. Nitekim yapılan çalışmalar da bu durumu desteklemektedir (Lu ve ark, 2008).

Wip1 fosfatazın kodlanmasından sorumlu olan PPM1D genini taşıyan 17q23 kromozomal lokusu çeşitli insan tümörlerinde yaygın olarak amplifiye olmaktadır (Pechackova ve ark, 2016). Yapılan çalışmalar neticesinde özellikle nöroblastoma, medullablastoma, gastrik, meme, ovaryum, prostat ve adenokarsinoma gibi çeşitli kanser türlerinde PPM1D'nin amplifikasyonu ve buna bağlı olarak sıklıkla Wip1'in protein

düzeyinde artışı gözlenmekte ve bu durum kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. (Lu ve ark, 2008; Goloudina ve ark, 2016; Pechackova ve ark, 2016; Wamsley ve ark, 2017).

Wip1 amplifikasyonlu tümörlerde p53 mutasyonları seyrek olarak görülmektedir. Tablo 2.'de de gösterildiği üzere Bulavin ve *ark* tarafından 164 primer meme kanserinin 27'sinde Wip1'in aşırı ifade edildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte Wip1'in amplifiye olduğu tümörlerin sadece 1/8'de p53 mutasyonu olduğu bildirilmiştir (Bulavin ve ark, 2004).

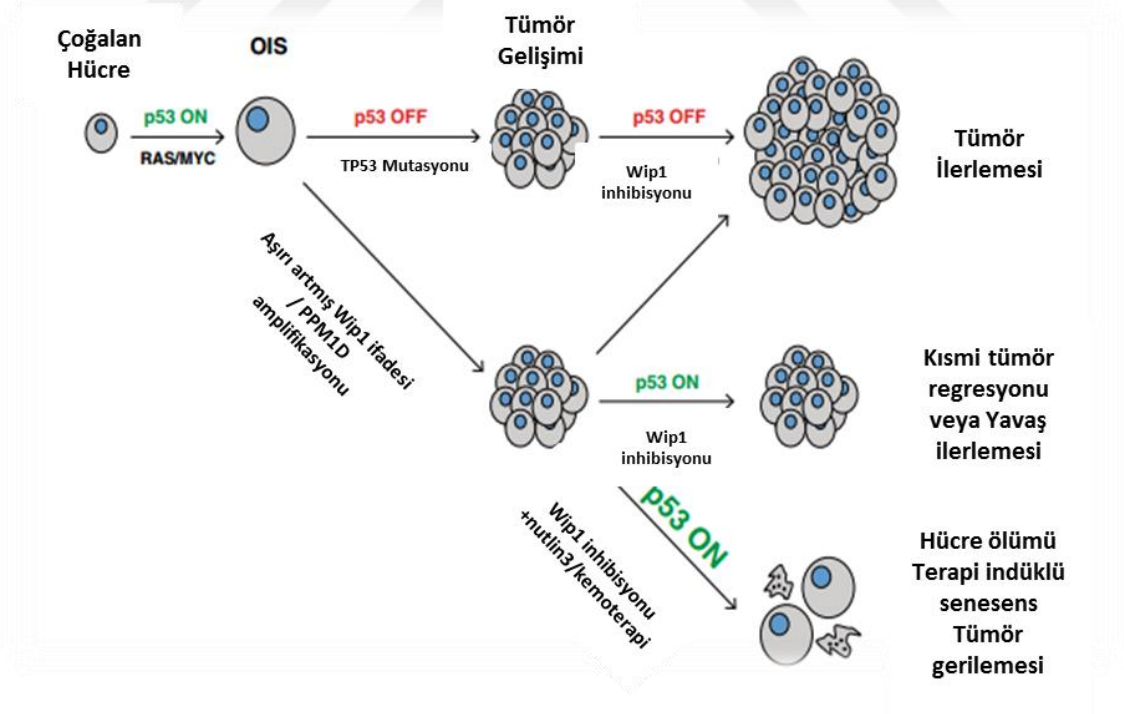
Tablo 2. Wip1'in aşırı ifade edildiği veya gen amplifikasyonunun arttığı bazı insan tümörleri

Tümör Çeşidi	p53 Mutasyonu	Prognozu	Referans
Nöroblastoma	1/16	Kötü	Lowe ve ark (2013)
	1/8	Kötü	Lu ve ark (2008)
Medullablastoma		Kötü	Lu ve ark (2008)
Gastrik Karsinoma			Lowe ve ark (2013)
Pankreatik Adenokarsinoma		Kötü	Lu ve ark (2008)
Ovaryum Adenokarsinoma		Kötü	Lu ve ark (2008)
Meme Adenokarsinoma	1/10	Kötü	Rauto ve ark (2006)
	1/8	Kötü	Bulavin ve ark (2004)
Prostat Kanseri			Lowe ve ark (2013)

Pankreatik nöroendokrin tümörleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada tümörlerin %51'inin PPM1D amplifikasyonuna ve yüksek oranda artmış Wip1 mRNA ekspresyonuna sahip oldukları bulunmuştur (Yang ve ark, 2010; Hu ve ark, 2010). Benzer şekikde primer medullablastoma da her 11 tümörden 7'sinde Wip1 amplifikasyonu gözlenmiştir (Castellino ve ark, 2008). Yine meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada Rauta ve ark meme kanserlerinin %11'inde Wip1'in amplifiye olduğunu ve Wip1 amplifikasyonlu meme kanserlerinin Wip1 amplifikasyonu gözlenmeyenlere kıyasla önemli derecede kötü prognoz gösterdiğini bildirmişlerdir (Rauta ve ark, 2006).

PPM1D knock-out mice'lar ve klinik örneklerden alınan veriler Wip1'in onkogenik davranışı ve işlevsel p53 yolağı arasında kuvvetli bir korelasyon olduğunu göstermektedir (Uyanik ve ark, 2017). PPM1D de ki fonksiyon kazanım mutayonları p53'ün tümör süpresör bariyerinin aşılmasını sağlayarak hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Öte yandan Şekil 8.'de görüldüğü gibi PPM1D'nin kaybı sadece p53'ün aktif olduğu hücrelerde proliferasyonun yavaşlatılmasına izin vermektedir (Pechackova ve ark, 2017).

Adenomatozis polipozis coli bağırsak tümörigenezisini ve c-myc indüklü lenfomayı içeren iki tümör modelinde Wip1 eksikliğinin, p53 aktivasyonunu inhibe etmediği böylece önemli ölçüde yavaşlatılmış tümörigenezin gerçekleştiği görülmüştür (Shen ve ark, 2017). Benzer şekilde MMTV-Erbb2 ve MMTV-HRAS1 mice larda Wip1 delesyonu, p38MAPK'a bağlı olarak meme tümörlerinden koruduğu belirtilmiştir (Macurek ve ark, 2017). Bu konu üzerine yapılan daha pekçok çalışma ile Wip1'in tümörigenezin düzenlenmesinde rol aldığı kanıtlanmıştır. Ancak Wip1'in tek başına aşırı ifade ediliyor olması spontan tümör oluşumuna neden olmamakta ve meme bezi epitelyumunda Wip1'in yine aşırı ifadesi kanser indüklenmesi için de yeterli gelmemektedir (Shen ve ark, 2017; Pechackova ve ark, 2017). Bu örneklerden anlaşıldığı gibi Wip1'in tek başına ifadesinin artmış olması tümörigenezi teşvik etmekte yeterli olmayıp onkogenik koşullar altında yani myc, HRas1 ve Erbb2 gibi onkogenlerle ilişkili olarak tümörigenezi teşvik etmekte ve hücresel dönüşümde daha etkili olmktadır. Onkogenik aktivasyonlar replikatif strese neden olarak senesensi indükleyebilmektedir. Wip1 onkogen kaynaklı senesensi de engelleyerek replikatif stres koşulları altında proliferasyonun devam etmesini sağlayarak mutasyonların birikmesine izin vermektedir (Lu ve ark, 2008; Freire, 2013; Emelyanov ve Bulavin, 2015).



Şekil 8. Tümörigenez ve terapötik yanıtta Wip1'in fonksiyonu (Pechackova ve ark, 2017'den modifiye edilerek alınmıştır).

Onkogenlerin aktivasyonu replikatif strese sebep olarak p53'ü aktive eder ve onkogen indüklü senesens (OIS) olarak adlandırılan kalıcı hücre döngüsü tutuklanmasına sebep olur. Şekil 8.'de gösterildiği gibi TP53'ü inaktive edici mutasyonlar, Wip1'in aşırı ekspresyonu veya PPM1D'nin amplifikasyonu p53 yolağını baskılayarak OIS'yi devre dışı bırakıp tümörigenezi teşvik eder. *wt*-TP53'e sahip hücrelerde Wip1 inhibisyonu kısmi olarak p53 yolağını tekrardan aktive ederek proliferasyonun yavaşlamasına sebep olurken mutant TP53'e sahip hücrelerde Wip1 inhibisyonu kanser hücrelerinde etkisizdir. Wip1 inhibisyonunun MDM2 antagonisti nutlin-3 ile veya DNA hasarını indükleyen kemoterapi ajanlarıyla kombinasyonu p53 yolağının en yüksek düzeyde aktive olmasına izin vererek hücre ölümünü ve senesensi indükler. Böylece tümör gelişiminin engellenmesi sağlanmış olur (Pechackova ve ark, 2017).

Wİp1'in aşırı ifade edilmesi üzerine gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise; aşırı ifade edilen Wip1'in nükleotid ve baz eksizyonunu yoluyla DNA tamirini bozduğu kanıtlanmıştır (Macurek ve ark, 2013). Yine bir başka çalışmada, özellikle PPM1D genin exon 6 bölgesi üzerinde Wip1'in fonksiyonunu etkileyen nokta mutasyonlarının var olduğu ortaya çıkarılmıştır. PPM1D'de bulunan bu nokta mutasyonları daha yüksek protein kararlılığı sergileyen ve genotoksik stres sonrası kontrol noktalarını devre dışı bırakan C-terminalinden kesilerek (truncated) daha kısa Wip1 varyantlarını oluşturur. Oluşan Wip1 varyantları meme ve ovaryum kanserlerinin yanı sıra beyin sapı gliomalarında, akciğer adenokarsinomasında ve prostat kanserinde de ortaya konmuştur (Kleiblova ve ark, 2013).

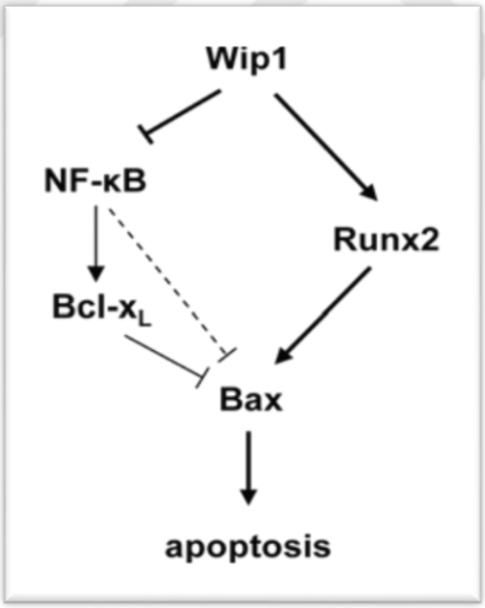
2.9. p53 Negatif Tümörlerde Wip1 Aktivasyonu

İnsan kanserlerinin yarıdan fazlasında p53'ün tümör süpresör fonksiyonunun kaybı meydana gelmekte ve böylece büyüme, genetik istikrar, hücre ölümü ve anti-kanser tedavisine duyarlılık gibi pekçok yolak bu durumdan etkilenmektedir (Goloudina ve ark, 2016).

p53 negatif tümörlerde Wip1'in aşırı ifadesi, *wt*-p53 barındıran tümörlerdekinden farklı bir işleve sahiptir (Clausse ve ark, 2016). p53'ün işlevsiz olduğu bu tümörlerde Wip1 inhibisyonunun etkisiz olduğu bilinmektedir. Öte yandan Wip1'in aşırı ekspresyonu şaşırtıcı bir şekilde bu tümörleri anti-kanser ilaçlarına duyarlı hale getirmektedir. Wip1 bu etkiyi p53 negatif tümörlerde ayrı ayrı mekanizmalarla, pro-apoptotik protein Bax'ı arttırıp anti-apoptotik protein Bcl_{XL}'nin ise seviyesini azaltarak gerçekleştirir. Böylece bu tümörlerde

normale göre azalmış olan Bax/Bcl_{XL} oranının artışı sağlanarak özellikle Caspase 3'e bağlı apoptozis aktive edilir ve tümör oluşumu ortadan kaldırılır (Goloudina ve ark, 2012b; Goloudina ve ark, 2016).

p53 negatif Saos-2 hücreleriyle yapılan bir çalışmada; Wip1'in aşırı ekspresyonu uyarılarak bu hücrelerin cisplatine daha duyarlı hale geldiği ve Bax/ Bcl_{XL} oranının artarak Caspase 3 bağımlı apoptozise uğradığı saptanmıştır. Şekil 4.'te gösterildiği gibi aşırı ifade edilen Wip1, p53 negatif Saos-2 hücrelerinde Bax ekspresyonunun artışını Bax'ın bir transkripsiyon faktörü olan RUNX2'yi Ser432 rezidusundan defosforilasyonla aktive ederek gerçekleştirmektedir. Aktive olan RUNX2 ise hedef geni olan Bax'ın promotöründe bulunan RUNT elementine bağlanarak Bax ekspresyonunu indüklemektedir (Goloudina ve ark, 2016; Pechackova ve ark, 2017). Buna ek olarak Wip1; p65RelA alt birimini Ser536'dan defosforile ederek NF-κB aktivitesini inhibe etmekte böylece azalan NF-κB ise hedef geni olan Bcl_{XL} düzeyinin azalmasına sebep olmaktadır. Sonuç olarak Şekil 9.'da gösterildiği gibi hem NF-κB hem de Bcl_{XL} inaktivasyonu/azalması Bax ekspresyonunun artışını sağlamaktadır (Goloudina ve ark, 2012a).



Şekil 9. Cisplatin ile muamele edilen p53-/- Saos-2 hücrelerinde Bax/Bcl-x_L oranının Wip1 tarafından düzenlenmesinin temsili olarak şematize edilişi (Goloudina ve ark, 2012a).

Genellikle p53 negatif tümörler anti-kanser tedavisine dirençlidir (Clausse ve ark, 2016). Yapılan bir çalışmada Wip1'in fosfataz aktivitesinin yetersiz olduğu mutant formunun, p53 negatif tümörlerde, kemoterapötik bir ajan olan cisplatin ile muamelelerinin bu tümörlerde apoptozu arttırmadığı tespit edilmiştir (Pechackova ve ark, 2017). Bu durum p53'ün işlevsiz olduğu tümörlerde Wip1'in fosfataz aktivitesinin gerekli olduğu sonucunu ortaya koymuştur. Yine yapılan bir diğer çalışmada p53'ün negatif olduğu Saos-2 osteosarkoma hücre dizilerinde Wip1 uyarılarak aşırı ifade edilmesi sağlanmış böylece kemoterapiye duyarlı hale getirilerek apoptozisi teşvik ettiği kanıtlanmıştır (Goloudina, 2016). Bununla birlikte *wt*-p53 barındıran normal hücrelerde Wip1 aşırı ifadesi ise; cisplatin kaynaklı DNA hasarlarında p53 sinyallemesini azaltarak normal hücreleri apoptozdan koruduğu da bilinmektedir (Pechackova ve ark, 2017). p53 negatif tümörlerde Wip1'in göstermiş olduğu bu etki, Wip1'in proapoptotik özelliğe sahip olduğunu ortaya koymakta ve p53 negatif tümörlerde anti kanser tedavisi için bir temel oluşturmaktadır (Goloudina ve ark, 2012a).

Wip1'in doğrudan veya dolaylı olarak substratı olan p53'ün işlevinin ortadan kalkması ile Wip1'in yeni ve farklı fonksiyonlara sahip olduğu anlaşılmış böylece Wip1'in hücre fizyolojisi için düşünüldüğünden çok daha önemli olduğu açığa çıkarılmıştır.

2.10. Hematolojik Malignansilerde Wip1 Fosfatazın Rolü

Wip1 fosfataz üzerine yapılan kapsamlı çalışmalar ağırlıklı olarak solid tümörler üzerinden gerçekleştirilmiş olup Wip1'in hematolojik malignansiler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı mevcut çalışmaların ise solid tümörlere nisbeten çok daha az sayıda olduğu görülmektedir.

Fiscella ve ark (1997) tarafından yapılan bir çalışmada *wt*-p53'e sahip Burkitt lenfoma ve lenfoblastoid hücre dizilerinde (WMN, FWL, Shoemaker, NL2) iyonize radyasyona cevaben *wt*-Wip1'in mRNA düzeyinin çok yükseldiği belirtilmiştir. Wip1 üzerine yapılan bir diğer çalışma ise Eμ-myc-indüklü lenfoma modeli oluşturulan farelerde gerçekleştirilmiş olup Wip1'in bu farelerde ATM-p53 yolağını inhibe ederek myc-indüklü apoptozisi baskıladığı ve böylece tümörigenezide teşvik ettiği bildirilmiştir (S. Shreeram et al., 2006). Konuyla ilişkili bir başka çalışmada da insan T-lenfotropik virüs 1 (HTVL-1) tax transformasyonuyla farede, insan erişkin T lösemi modeli oluşturulmuş ve Wip1'in HTVL-1 indüklü onkogeneze katkı sağladığı gösterilerek yeni bir terapötik hedef olabileceğine işaret

edilmiştir (Gillet ve ark, 2012; Dayaram ve ark, 2013). Wip1'in kimyasal inhibitörlerinin geliştirildiği çok önemli çalışmalardan birinde; çok sayıda lenfoma ve lösemi hücre dizisi Wip1 inhibitörü (GSK2830371) ile muamele edilerek Wip1 tarafından defosforile edilen substratların (DDR'de rol oynayan ATM, Chk2, p53 ve p38 gibi) fosforilasyon düzeylerinde artış olduğu ve tümörigenezde de azalma gözlendiğini bildirilmiştir (Gilmartin ve ark, 2014).

2.11. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

ALL, kemik iliğinin lenfopoetik veya homopoetik kök hücrelerinden yada progenitör hücrelerinden kaynaklanan malign bir hastalıktır (Terwilliger ve Abdul-Hay, 2017).

ALL genellikle yaşa bağlı bir tümördür ve en sık 2-10 yaş grubu çocuklarda görülmektedir. 15 yaş altında ki çocukluk çağı kanserlerinin %25-30'unu lösemiler oluşturmakta ve bu lösemilerin %75-80'nini ise ALL oluşturmaktadır (Huang ve ark, 2016). Dolayısıyla ALL çocukluk çağında en sık görülen hematolojik malignitedir ve çocuklarda en çok mortalite oranına sebep olan lösemi çeşididir (Suppipat ve ark, 2012). ALL 'Dünya Sağlık Örgütü' tarafından B ve T akut lenfoblastik lösemi olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır ve bu iki alt grubun görülme sıklığı prognozları ile ters orantılıdır. ALL olgularının % 70-80'i B hücre kökenli olmakla birlikte T hücreli ALL daha düşük bir frekansta görülmekte ve daha kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Weagel ve ark, 2017; Yanada ve ark, 2005). Tıbbı teknolojinin gelişimi ile ALL tedavisi alanlar arasında 5 yıllık sağ kalım oranları 14 yaş ve altında ki çocuklarda %90'lara ulaşmıştır ancak bu çocukların %20-30'unda tekrar ALL nüksü görülmekte ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Huang ve ark, 2016). Genellikle nüks görülen hastalar sonraki tedaviye direnç gösterirler ve çeşitli kanser ilaçlarıyla da çapraz direnç gösterebilirler (Chao, 2013). Bu durum ise tedavide en büyük problemlerden birini oluşturmaktadır. Bu sebeple yeni ilaçların geliştirilmesi, yüksek riskli hastalar için öncü terapiler oluşturmak ve nükseden hastalığı tedavi etmek için kritik bir öneme sahiptir (Suppipat ve ark, 2012)

Gen-ekspresyon analizleri kemoterapiye direncin moleküler temelinin anlaşılmasına oldukça yardımcı olmuş ve ilaç direncine yol açan çok sayıda sinyal yolaklarının aydınlatılmasınıda sağlamıştır. Ancak bu çalışmalardan kemoterapide başarının sağlanması için farklı yolakları ve farklı alt tiplere özgü molekülleri hedef alan kombinasyon tedavilerinin veya hastadan hastaya değişebilen genetik heterojeniteden dolayı kişiye özgü

yaklaşımların geliştirilmesi gerektiği sonucuda ortaya çıkmıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışma ile kemoterapiye dirençte oldukça önemli potansiyele sahip olduğu ortaya çıkan bir molekül olan Wip1'in aşırı ifade edildiği ALL'de kemoterapiye etkisi ve bu süreçte yer alan moleküler mekanizmaların ilk defa araştırılmış olması bu tez çalışmasını önemli kılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Hücre Dizileri

Çalışma boyunca kullanılan ve ticari olarak üretilmiş olan Jurkat hücre hatları ATCC'den temin edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddelerin listesi

Ürün	Firma
Tris-base	AppliChem
Glycine	ChemCruz®
Sodyum Dodesil Sülfat	BioShop®
Sodyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Potasyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Asetik Asit	Merc
Hidroklorik Asit	Merc
Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)	SIGMA®
Gliserol	ChemCruz
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS),	SIGMA®
Merkaptoetanol	SIGMA®
Magnezyum (II) Klorür	SIGMA
Amonyum Persülfat	SIGMA
Bromfenol Blue	SIGMA-ALDRICH
Tween 20	SIGMA-ALDRICH
Skim Milk	Fluka®
Bowin Serum Albumin	ChemCruz
Sodyum Deoksikolat	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Ortovanadat	SIGMA-ALDRICH
Proteaz İnhibitör Cocktail	Santa Cruz
Sodyum Hidroksit	SIGMA-ALDRICH®
RPMI 1640	Gibco
Optimem	Gibco
Fetal Bovin Serum	ChemCruz
Penisilin Streptomisin	Gibco
Etoposid	Santa Cruz
Doxorubicine	ChemCruz
Tetrametilendiamin (TEMED)	SIGMA
Akrilamid-bis (% 40)	BIO-RAD
Etanol	SIGMA-ALDRICH
Metanol	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	SIGMA-ALDRICH
BCA Assay Kit	Thermo Scientific
Western ECL substrat	BİO-RAD
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	ChemCruz
Annexin V Muse Kit	Muse
Cell Cycle Muse Kit	Muse
H2AX Muse Kit	Muse
Caspase 3/7 Muse Kit	Muse
RNA İzolasyon Kiti	QIAGEN
DNA İzolasyon Kiti	QIAGEN

3.1.2. Kullanılan Antikorlar ve Oligolar

Tablo 4. Çalışmalar sırasında kullanılan antikorlar ve oligoların listesi

Ürün	Firma
ATM	Cell Signaling
ATM-p	Cell Signaling
ATR	Cell Signaling
ATR-p	Cell Signaling
Wip1	SantaCruz
CHK1	SantaCruz
CHK1-p	Cell Signaling
CHK2	SantaCruz
CHK2-p	Cell Signaling
P53	SantaCruz
P53-p	Cell Signaling
γH2AX	Cell Signaling
GAPDH	Proteintech
Wip1 siRNA	SantaCruz
Anti-mouse IgG	SantaCruz
Anti-rabbit IgG	SantaCruz
Wip1 siRNA Oligosu	Santa Cruz
Lipofektamin (1µg/ml)	İnvitrogen

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemelerin listesi

Ürün	Firma
75'lik Steril Flask	SARSTEDT
1,5 ml'lik Eppendorf	AXYGEN
15 ml'lik Steril Falkon	SARSTEDT
50 ml'lik Steril Falkon	SARSTEDT
6 Kuyucuklu Steril Plate	SARSTEDT
12 Kuyucuklu Steril Plate	SARSTEDT
96 Kuyucuklu Steril Plate	SARSTEDT

3.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 6. Çalışmalarda kullanılan alet ve cihazların listesi

Ürün	Firma
Steril Kabin	AirStream
İnkübatör	NUAİRE
Su Banyosu	WiseBath
Muse Hücre Analiz Cihazı	Muse
Otoklav	HIRAYAMA
Sıvı Azot Tankı	Mrc
Dikey Elektroforez	BİO-RAD
Yatay Elektroforez	Cleaver
PCR	Applied Biosystems
Real-Time PCR	Applied Biosystems
Görüntüleme Cihazı	Chemidoc-It^2 510 İmager
Transfer Cihazı	BİO-RAD
Spektrofotometre	Termo Labsystem/Multiskan spectrum
İnverted Mikroskop	Leika
Vorteks	IKA
Manyetik Karıştırıcı	IKA
pH Metre	Hanna Intrumend
Mikro Santrifüj	Hettich
Soğutmalı Santrifüj	Hettich

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tablo 7. Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri

Hücre JURKAT
ATCC Kodu TIB-152™
Büyüme Özelliği Süspanse
Organizma *Homo sapiens*
Hücre Tipi T lenfosit
Doku Periferik kan
Hastalık Akut T hücre lösemi

Çalışma boyunca kullanılan Jurkat hücre dizileri, canlılıklarını sürdürebilmek amacıyla RPMI (1640) besiyeri ortamında kültüre edilmişlerdir. RPMI (1640) besi ortamının tamamlanmış içeriği aşağıda verilmiştir.

Tamamlanmış RPMI(1640) Büyüme Besi Ortam İçeriği:

% 89 RPMI (1640)

% 10 Fetal Bovin Serum (FBS)

% 1 Penicilin Streptomicin

Jurkat hücreleri, % 10 FBS ve % 1 penisilin streptomisin içeren RPMI (1640) büyüme besi yeri kullanılarak % 5 CO_2 içeren 37°C ısı ortamına sahip inkübatörde kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Kültür devamlılığı için 75 cm^2 lik flasklar kullanılmıştır. Hücrelerin kültür başlangıcı $5x10^5$/ml olacak şekilde gerçekleştirilmiş olup, hücre yoğunluğu $2x10^6$ /ml – $3x10^6$ / ml aralığına ulaştığında kültür devamlılığını sağlamak amacıyla pasajlanmışlardır.

3.2.2. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği

% 70 RPMI (complete medium)

% 25 Fetal Bovin Serum (FBS)

% 5 DMSO

Kültür devamlılığı bir süre devam etmiş ve canlılık oranı % 90 ve üzerinde olan kültürdeki hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere dondurularak sıvı azotta saklanmıştır. Bunun için hücreler ilk önce steril falkon içerisine alınarak 300xg'de, 4°C'de, 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pelet, dondurma besiyeri ile homojenize edilmiş ve herbir dondurma tüpünün içerisinde 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Tüpler - 80°C'de bir gece muhafaza edildikten sonra sıvı azot tankına alınarak -196°C'de saklanmıştır.

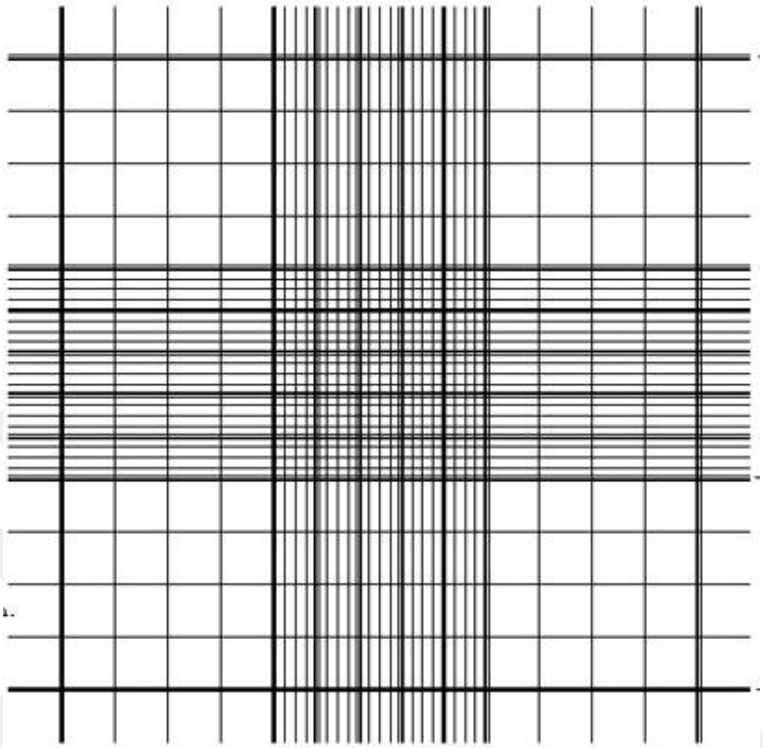
3.2.3. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması

İhtiyaç duyulduğunda, -196°C'de dondurularak stoklanmış olan hücreler sıvı azottan çıkarılmış ve 37 °C'de ki su bonyosunda çözdürülmüştür. Çözülmüş olan hücreler bekletilmeden 15 ml' lik steril falkona alınmış, üzerine RPMI besiyeri ilave edilerek 300xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı hücre peletinden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pelet üzerine tamamlanmış RPMI (1640) büyüme besi yerinden eklenerek pelet besiyeri içerisinde pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiş ve hücreler 25 ml'lik steril flask içerisine alınarak kültür devamlılığı sağlanmıştır.

3.2.4. Hücrelerin Sayım Yöntemi

Hücre kültürü aracılığı ile yapılmış olan testlerde belirli ve eşit sayıda hücre alınmasını sağlamak amacıyla her test öncesi hücre sayımı yapılmıştır. Kültür içerisinde ki

canlı ve ölü hücre miktarını belirlemek için 1:1 (v:v) oranında hücre süspansiyonu ve tripan mavisi karıştırılmış ve karışımdan 10µl alınarak; üzeri lamel ile kapatılmış olan Neubauer lamına mikro pipet yardımıyla aktarılmıştır.



Şekil 10. Neuber lamının mikroskop altındaki temsili görünüşü

Neubauer lamı; kalın, düz ve sayım odacıklarına sahiptir. Mikroskop altında bakıldığında üzerinde 16' şar küçük kareden oluşan toplam da 4 büyük kare alan bulunmaktadır.

Tripan mavisi ile dilüe edilen hücreler Neubauer lamına aktarıldıktan sonra mikroskop altında 4 büyük kare içerisinde konumlanmış halde bulunmaktadır. Tripan mavisi ile muamele edilmiş hücre süspansiyonu içerisindeki canlı hücreler mikroskop altında şeffaf, yuvarlak ve parlak görünürken, ölü hücreler ise tripan mavisini absorbe ederek koyu mavi görülmektedir. Herbir büyük kare alanda bulunan canlı hücreler ayrı ayrı sayılarak ortalamaları alınmış ve ml başına düşen canlı hücre miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

1ml'de Bulunan Canlı Hücre Miktarı= Ortalama canlı hücre sayısı x Dilüsyon faktörü x 10^4

Ayrıca; çalışılacak olan herbir kültürün canlı/ölü oranları hesaplanmış % 80 ve üzeri canlılığa sahip olan kültürler ile test çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Kemoterapötik İlaç Stoklarının Hazırlanması

Normal koşullar altında topoizomeraz II enzimi DNA'ya bağlanarak kesim kompleksleri oluşturur ve geçici çift zincir kırıklarının meydana gelmesine yardımcı olur. Kemoterapide sıklıkla kullanılan ANT grubu ilaçlar (daunorubicin, doxorubicin, etoposid, cisplatin gibi) ise; bu kompleksi kararlı hale getirerek DNA'da çok sayıda çift zincir kırıklarının oluşmasına sebep olurlar (J. M. Fortune and N. Osheroff, 2000, Y. Pommier, 2009). Böylece DNA'da meydana gelen bu hasarlar DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilemeyecek boyutta olduğu için hücre ölüme sürüklenir. DNA'ya bağlanarak topoizomeraz II'yi inhibe eden böylece DNA hasarının oluşumuna sebep olan etoposid ve doxorubicin en yaygın kullanılan kemoterapi ajanlarındandır (Vesela et al., 2017) .

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan doxorubicin ve etoposid ticari olarak temin edilmiş ve konsantrasyonları 100 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürülerek steril ortamda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler -20 °C' de saklanmıştır.

3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmalarının ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanışı

Çalışma boyunca Jurkat hücre dizileriyle kemoterapi ajanları (etoposid ve doxorubicin) ayrı ayrı muamele edilerek hücre canlılığı, hücre döngüsü ve DNA hasarı cevabı gibi tümör baskılayıcı yolakların etkili çalışıp çalışmadığı kontrol grubu ile kıyaslanarak test edilmiştir. Bunun için öncelikle; literatür araştırması ve araştırma sonrası yapılan ön denemeler sonucu etoposid ve doxorubicinin Jurkat hücrelerinde apoptozis ve senesensi indükledikleri dozlar belirlenmiştir. Daha sonra Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicine cevaben 24 ve 72 saatte apoptozisin ve 72 saatte senesensin indüklendiği hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sonrasında ise doxorubicin ve etoposidin ilgili doz ve sürelerde Jurkat hücreleri üzerinde ki etkilerini test etmek amacı ile 'Wst-1, Hücre döngüsü (cell-cycle), AnnexinV, Caspase 3/7, γH2AX ve 'Western Blot' analizleri yapılmıştır.

3.2.6.1. Jurkat hücrelerinde 24 saatte apoptozisin indüklendiği hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı

Bu çalışmalar sırasında kullanılacak olan kültür kapları (steril plaklar) sonrasında yapılacak olan analizlere göre belirlenmiştir. AnnexinV, Caspase 3/7, γH2AX ve Hücre döngüsü (Cell cycle) analizleri yapılacak ise çalışma steril 12 kuyucuklu plaklar içerisinde 2 ml'lik volümlerde hazırlanmış, Western blot analizleri için yapılan çalışmalar ise steril 6 kuyucuklu plakalar içerisinde 4 ml'lik volümlerle hazırlanmıştır. Ancak ml başına düşen hücre miktarı tüm çalışmalarda sabit tutulmuş ve $1x10^6$ /ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bu çalışmada, etoposid ve doxorubicin ile ayrı ayrı muamele edilen 2 grup ve hiçbir kemoterapi ajanı ile muamele edilmemiş kontrol grubunun bulunduğu toplam da 3 deney grubu yer almaktadır. Her bir deney grubu $1x10^6$/ml hücre içeren besi ortamıyla hazırlanmıştır. Jurkat hücrelerinde apoptozisin indüklendiği ilaç dozları etoposid için 5µg/ml, doxorubicin için 1µg/ml olarak belirlenmiş olup hazırlanan stok çözeltiler besi yeri ile seyreltilerek ilgili kuyucuklara belirtilen miktarlar hesaplanarak eklenmiştir. Son olarak hücreler 37 °C'de % 5 CO_2 içeren ortamda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.6.2. Jurkat hücrelerinde 72 saatte apoptozisin indüklendiği hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı

Bu çalışma Bölüm 3.2.6.1.'de bahsedildiği gibi hazırlanmış olup, inkübasyon süresi 24 saat yerine 72 saat olarak uygulanmıştır.

3.2.6.3. Jurkat hücrelerinde 72 saatte senesensin indüklendiği hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı

Bu çalışmada da, yine Bölüm 3.2.6.1.'de açıklandığı gibi 3 deney grubu yer almaktadır. Her bir deney grubu $1x10^6$/ml hücre içeren besi ortamıyla hazırlanmıştır. Jurkat hücrelerinde senesensin indüklendiği ilaç dozları etoposid için 1µg/ml, doxorubicin için 0.2 µg/ml olarak belirlenmiş olup hazırlanan stok çözeltiler besi yeri ile seyreltilerek ilgili kuyucuklara belirtilen miktarlar hesaplanarak eklenmiştir. Son olarak hücreler 37 °C'de % 5 CO_2 içeren ortamda 72 saatlik süre boyunca inkübasyona bırakılmışlardır.

3.2.6.4. Wst-1 testi

Metabolik aktivitenin belirlenmesi belirlenmesi amacıyla yapılan Wst-1 (water-soluble tetrazolium salt) testi canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir testir.

Bölüm 3.2.6.1. ve Bölüm 3.2.6.2.' de belirtildiği gibi etoposid ve doxorubicine cevaben 24-72 saatte apoptozisin ve 72 saatte senesensin indüklendiği Jurkat hücrelerinde gerçekleştirilmiş olan bu test ile etoposid ve doxorubicinin ilgili süre ve dozlarda metabolik aktivite üzerine etkileri belirlenmiştir. Bu test için 96 kuyucuklu steril plaklar kullanılmış ve her bir deney grubu için ayrı ayrı üçer kuyucuk belirlenmiştir. Her bir kuyucuğa 100µl tamamlanmış besiyeri içerisinde $5x10^4$ hücre aktarılmış ve ilgili dozlarla muamele edilerek 37 °C ısı ve % 5 CO_2 içeren ortamda 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda kontrol gruplarıda dahil olmak üzere her kuyucuğa 10µl Wst-1 solüsyonundan eklenmiş ve tekrar 37 °C, % 5 CO_2 içeren ortama alınarak 2 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası oluşan renk değişimi spektrofotometrede 450 nm' de ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmış ve grafiğe aktarılmıştır. ($A_{İLAÇ}$: İlaç uygulanan grubun absorbans değeri, $A_{KONTROL}$: Kontrol grubunun absorbans değeri)

$$\% \text{ Canlılık} = (A_{İLAÇ} / A_{KONTROL}) \times 100$$

Elde edilen veriler 'Origin 8' programıyla grafik haline getirilmiş ve değerlendirilmiştir.

3.2.6.5. SA-β-Galaktozidaz boyama testi

Bu boyama; yaşlanmış yani senesense uğramış hücrelerin tespit edilmesi amacı ile yapılmıştır. Bu işlem için öncelikle; Jurkat hücreleri etoposid ve doxorubicinin senesens dozları ile 72 saat boyunca 37 °C'de %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler 2 kez PBS ile yıkanmış ve PBS uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrası hücreler, 6 kuyucuklu steril plaka içerisinde cytospin/santrifüj ile lamel üzerine fikse edilmiş daha sonra glutaraldehit solüsyonu (% 0.25 glutaraldehit, % 2 paraformaldehit pH:6.0 olan PBS ile hazırlanır) eklenerek 10 - 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 2 kez PBS/$MgCl_2$ (1mM Mg/Cl_2 içeren PBS pH: 6.0) ile yıkanarak 1X- Gal solüsyonu (10 ml için; 9.3 ml PBS/$MgCl_2$, 0.5 ml 20x potasyum siyanid solüsyonu ve 0.25ml 40xX-Gal solüsyonu) eklenmiş ve gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası 3 kere PBS/$MgCl_2$ ile yıkanarak kuyucuklar içerisinde bulunan lameller lam üzerine alınmış ve ışık mikroskobunda incelenerek fotoğraflanmıştır. Bu boyama işlemi sonrası senesense uğrayan hücreler mikroskop altında mavi renkli görülmektedir.

3.2.6.6. Annexin V apoptozis testi

Annexin V testi; süspanse hücrelerde ki apoptotik hücrelerin membranlarının dış yüzeylerinde bulunan fosfotidilserine Annexin V' in bağlanarak apoptotik hücrelerin ayırt edilmesi temeline dayanır. Bu test ile apoptotik hücrelerin kantitatif ölçümü hücre analizörü veya flow sitometri kullanılarak gerçekleştirilir. Bu çalışmada apoptotik hücrelerin ölçümü için muse hücre analizörü kullanılmıştır.

Bu testle; etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile muamele edilmiş olan Jurkat hücrelerinde, 24 ve 72 saat inkübasyon sonrası gerçekleşebilecek olan erken apoptozisin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle Bölüm 3.2.6.1. ve Bölüm 3.2.6.2.'de belirtilen hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş olup yine belirtilen sürede inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda kültürlerden 1,5ml alınarak ependorflara aktarılmış ve 300xg'de santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonrası süpernatantların 1400 µl' si uzaklaştırılmış kalan 100 µl'leri ile peletler süspanse edilerek her bir örneğe100 µl 'Annexin V (muse özel kit)' solüsyonundan eklenmiş ve 3-5 sn pipetaj yapılmıştır. Daha sonra 20 dakika karanlık bir ortamda bekletilmiş ve muse hücre analiz cihazında ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen veriler grafiksel ve istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir.

3.2.6.7. Caspase 3/7 testi

Hücrelerde Caspase 3 ve Caspase 7 aktivasyonu apoptozisin bir belirtecidir. Bu test; Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozlarının 72 saat inkübasyon sonrasında Caspase 3/7 aktivasyonuna bağlı olarak meydana gelen apoptozis miktarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Test için Caspase 3/7 muse kiti kullanılmış ve hücrelerde meydana gelen apoptozis miktarları muse hücre analizöründe ölçülerek tespit edilmiştir.

Caspase 3/7 testi için hücreler Bölüm 3.2.6.2.'de belirtildiği gibi etoposid ve doxorubicinin apoptozisi indükledikleri dozlarla muamele edilmiş ve ayrı ayrı 72 saat

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her bir hücre grubundan (kontrol grubu, etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplar) $1x10^5$ – $5x10^6$ aralığında hücre alınarak 300xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantları uzaklaştırılmıştır. Peletlerin üzerine ise kit içerisinde bulnan 1X Assay Buffer BA' dan 50 µl eklenerek hücreler süspanse edilmiştir. Sonrasında ise 1:8 oranında 1X PBS ile dilüe edilerek hazırlanmış olan muse cspase 3/7 reagent çalışma solüsyonundan her bir örneğe 5 µl eklenerek vorteks ile orta hızda 3-5 saniye karıştırılmış ve tüplerin ağzı kapatılarak 37 °C, % $5CO_2$ içeren ortamda 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her bir örnek içerisine 150 µl muse caspase 7-AAD çalışma solüsyonundan (148 µl 1X Assay Buffer BA ve 2 µl muse caspase 7-AAD reagent karıştırılarak hazırlanmıştır) eklenmiş ve orta hızda 3-5 saniye vortekslenerek karıştırılmıştır. 5 dakika, karanlıkta ve oda ısısında inkübe edilmiş süre sonunda ise her bir örnek muse hücre analizör cihazında analiz edilmiştir.

3.2.6.8. Hücre döngüsü testi

Hücre döngüsü testi; etoposid ve doxorubicinin 72 saatte apoptozisin ve senesensin indüklendiği Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü tutuklanmasının gerçekleşip gerçekleşmediği, tutuklanma gerçekleşti ise hangi fazda olduğunu belirlemek amacı ile yapılmıştır.

Hücre döngüsünün her bir fazında (G0/G1, S ve G2/M)) bulunan hücre miktarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiş olan 'Hücre döngüsü testi' nin temeli; hücrelerin DNA içeriğinin propidium-iodid ile boyanmasına dayanmaktadır.

Bu test için hücreler öncelikle Bölüm 3.2.6.2. ve Bölüm 3.2.6.3'de ifade edildiği gibi steril 24 kuyucuklu plaklara aktarılmış ve ilgili deney grupları etoposid ve doxorubicinin apoptotik ve senesens dozları ile muamele edilerek daha önce belirtillen sürelerde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her kuyucuktan 1ml kültür alınarak ependorflara aktarılmış ve 300xg'de 5 dakika santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırılarak peletler 1ml 1x PBS ile yıkanmış ve 300xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak peletlerin üzerine % 70'lik soğuk etil alkolden 1ml eklenerek yavaşça pipetaj yapılmış ve -20 °C'de en az 3 saat bekletilmiştir (hücreler bu şekilde fikse halde 2 ay kadar bekletilebilir). Süre sonunda fiksasyondan 200 µl- 500 µl alınmış ve yine 300xg'de 5 dakika satrifüj edilerek etanol uzaklaştırılmıştır. Pelet

tekrar 1ml 1x PBS ile yıkanarak santrifüjlenmiş ve uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pelet üzerine muse cell cycle reagenttan her bir ependorfa 200µl eklenerek karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Son olarak muse hücre analizöründe ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen veriler grafiksel ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.9. γH2AX analizi

DNA hasarı sinyal kaskadında yer alan H2AX'in fosforilasyonu (γH2AX) DNA hasarının önemli bir indikatörüdür. Etoposid ve doxorubicinin 72 saatte senesensi ve apoptozisi indüklediği dozların Jurkat hücrelerinde DNA hasarına sebep olup olmadığını varsa hangi düzeyde olduğunu belirlemek amacıyla muse γH2AX kiti kullanılarak bu analiz gerçekleştirilmiştir. Ölçümleri ise muse hücre analizörü kullanılarak yapılmıştır.

Bölüm 3.2.6.2. ve Bölüm 3.2.6.3.'de ifade edildiği şekilde gerçekleştirilmiş olan çalışma sonrası her bir örnekten yaklaşık olarak $1x10^6$ hücre alınarak 300xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak 1 ml PBS ile hücreler yıkanmıştır. Tekrar 300 x g'de 5 dakika santrifüjlenerek PBS uzaklaştırılmış peletlerin üzerine kit içerisinde bulunan 1x Assay Buffer ve fiksasyon bufferdan ayrı ayrı 500µl eklenerek karıştırılmış ve 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra 300xg'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmış ve peletlerin üzerine 500µl permeabilization buffer eklenmiştir. 5 dakika buzda bekletildikten sonra yine aynı şekilde santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Her bir örnek 450 µl 1X Assay Buffer ile süspanse edilmiş ve 90 µl alınarak yeni ependorflara aktarılmıştır. Üzerine yine kit içerisinde bulunan Anti-phosfo-Histone H2AX (Ser139) ve Anti-H2AX PECy5 solüsyonlarından ayrı ayrı 5 µl eklnerek karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 100 µl 1X Assay Buffer eklenerek 300xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş süpernatant uzaklaştırılmıştır. Son olarak 200 µl 1X Assay Buffer eklenerek muse hücre analizöründe ölçülmüştür.

3.2.6.10. Protein izolasyonu, protein miktar tayini ve Western Blot analiz çalışmaları

3.2.6.10.1. Protein izolasyonu

Bölüm 3.2.6.2 ve Bölüm 3.2.6.3.'de belirtildiği gibi hazırlanarak 72 saatte apoptozis ve senesensin indüklendiği hücreler kültür plaklarından alınarak Western Blot (W.B.) analizi için; 300xg'de santrifüjlenmiş, 2 kez 1xPBS ile yıkanarak pelet haline getirilmiş ve protein izolasyonu yapılmıştır. Protein izolasyonu için kullanılan RİPA lizis bufer içeriği aşağıda verilmiştir.

RİPA Lizis Buffer İçeriği (100 ml Stok İçin)

10 ml Tris-HCl (0,5M)

3 ml NaCl (5M)

10 ml Tris-HCl (0,5M)

0,5 ml EDTA (0,5M)

1 ml Na_3VO_4 (100mM)

0,1 g SDS

0,5 g Sodyum deoksikolat

Protein izolasyonu için; peletler 50-100 µl RİPA lizis bufer ile süspanse edilmiş 4°C 450 rpm'de 30 dakika çalkalayıcıda bekletilmiş süre sonunda 4°C, 13000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni ependorflara alınarak içerisindeki protein miktarları belirlenmiş peletler ise atılmıştır.

3.2.6.10.2. Protein miktar tayini

Örneklerden elde edilen protein ekstraktlarının içerisinde bulunan total protein miktarlarını belirlemek amacıyla BCA Protein Assay Kit kullanılmıştır.

Öncelikle BCA Protein Assay Kiti içerisinde hazır halde bulunan BSA stoğu kitte belirtilen oranlara göre streil bidistile saf su ile dilüe edilerek protein standartları hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan 9 standart 96 kuyucuklu plaklara yoğunluğu çok olandan az olana doğru sırasıyla her birinden 10 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Daha sonra protein miktarı belirlenmek istenen örnekler steril bidistile saf su ile total volüm 10 µl olacak şekilde 1:10 oranında dilüe edilerek standartlar ile aynı plağa konulmuştur. Kontrol olarak

da RİPA lizis bufer kullanılmış ve oda 1:10 oranında 10 µl volum olacak şekilde dilüe edilerek belirlenen kuyucuğa konulmuştur. Standart ve kontrol de dahil olmak üzere her bir örneğin üzerine 200 µl BCA karışım solüsyonu (Kit içerisinde hazır olarak bulunan protein assay reagent A ve B'den kitte belirtildiği gibi sırası ile 50:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır) eklenerek 37 °C'de 30 dakika bekletilmiş ve süre sonunda örnekler spektrofotometrede 562 nm'de ölçülmüştür.

3.2.6.10.3. Western Blot analizi

Western blot kısaca; elektroforez kullanılarak poliakrilamid jelde (SDS-PAGE jel) yürütülen proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sonrasında ise jelin destek membrana transferini ve membranda bulunan proteinlerden amaca uygun olanını görüntüleyebilmek adına özgül primer ve seconder antikorların kullanılmasını son olarak da istenilen proteinin görüntüleme işlemini içermektedir.

Western Blot analizleri sırasında kullanılmış olan buffer ve solüsyonların içeriği aşağıda belirtilmiştir.

10X TBS (1L) :

30,2 g Tris-base

43,8 g NaCl

932 mg KCl

TOWBIN Transfer Buffer (800 ml) :

3.03 g Tris-base

14,4 g Glycin

5 ml SDS (%10 luk SDS solüsyonundan)

Distile su (pH: 8,1-8,5)

Not: Kullanım önce %20 oranında metanol ilave edilir.

10X Running Buffer (1L) :

30 g Tris-base

144 g Glycin

15 g SDS

Distile su

(pH: 8,6)

Lower Buffer (500 ml) :

91 g Tris-base

20 ml SDS (%10 luk SDS solüsyonundan)

14 ml HCl (6N)

Distile su

(pH: 8,8)

Upper Buffer (500 ml) :

30,5 g Tris-base

20 ml SDS (%10 luk SDS solüsyonundan)

30 ml HCl (6N)

Distile su

(pH: 6,7)

1X TBS-t (1L) :

100 ml 10X TBS

900 ml Distile su

1 ml Tween 20

%40 Amonyum persülfat :

0,5 g APS

1 ml Distile su

% 6’ lık Süt Tozu (Skim Milk) Solüsyonu:

100 ml 1X TBS-t

5 g Skim Milk

10 ml Tris-HCl (0,5M)

% 5’lik Bovin Serum Albümin (BSA) Solüsyonu:

100 ml 1X TBS-t

5 g BSA

3.2.6.10.3.1. Poliakrilamid jelin (SDS-PAGE Jel) hazırlanması

Bu işlem için kullanılmış olan cam tabakalar öncelikle % 70 etil alkol ile silinmiş ardından distile su ile yıkanıp kurutularak düz bir zemin üzerinde bulunan jel döküm standına yerleştirilmiştir. Sonrasında ise hedeflenen proteinin moleküler ağırlığına göre uygun olan konsantrasyonda ayırıcı (separating) jel çözeltisi (ATM ve ATR’nin total (-t) ve fosforile (-p) formları için % 7,5’luk; Chk1 ve Chk2’nin total (-t) ve fosforile (-p) formları ile Wip1 için % 10’luk, γH2AX için de % 12’lik) Tablo 8.’de gösterildiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan ayırıcı jel çözeltisi cam tabakalar arasına dökülerek yüzeyi izopropanol ile kaplanarak düzleştirilmiş ve polimerizasyon için 20-30 dakika beklenilmiştir. Jelin polimerizasyonunu takiben yüzeydeki izopropanol uzaklaştırılmıştır. Sonra tüm proteinler için sabit olarak kullanılan % 5’lik paketleyici (stacking) jel çözeltisi Tablo 9.’da içeriği belirtildiği gibi hazırlanarak polimerleşmiş olan ayırıcı jel çözeltisinin üzerine dökülmüş ve cam tabakalar arasına jel tarakları yerleştirilerek polimerizasyonun gerçekleşmesi için tekrar 20-30 dakika beklenilmştir.

Tablo 8. Ayırıcı jel bileşenleri ve miktarları (belirtilen miktarlar 2 adet jel hazırlamak için kullanılır)

Bileşenler	Ayırıcı jel konsantrasyonları		
	%7,5	**%10**	**%12**
Distile su	4,7 ml	3,55 ml	2,45 ml
Lower Buffer	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
%30 Akrilamid/bisakrilamid	3,75 ml	5 ml	6 ml
%10 SDS	150 µl	150 µl	150 µl
Gliserol	2,5 ml	2.5 ml	2.5 ml
TEMED	12 µl	12 µl	12 µl
%40 APS	18 µl	18 µl	18 µl

Tablo 9. Paketleyici jel bileşenleri ve miktarları (belirtilen miktarlar 2 adet jel hazırlamada kullanılır)

Bileşenler	Miktar
Distile su	3.15 ml
Upper Buffer	1.25 ml
%30 Akrilamid/bisakrilamid	0.5 ml
TEMED	6 µl
%40 APS	12 µl

3.2.6.10.3.2. Jele yüklenecek protein örneklerinin hazırlanması

6X Loading Dye (10 ml) :

3,75 ml 1M Tris-HCl (pH: 6,8)

5 ml Gliserol+H_2O (4 ml Gliserol, 1ml Distile su karışımı)

1 g SDS

900 µl Merkaptoetanol

% 0,06 Bromfenol blue

Distile su

Western blot analizi için, Bölüm 3.2.6.'da belirtildiği gibi hazırlanan ve Bölüm 3.2.6.10.1. ile Bölüm 3.2.6.10.2.'de belirtildiği gibi total protein izolasyonu ve miktar tayini yapılan örnekler kullanılmıştır. Total protein konsantrasyonları 'BCA Protein Assay Kit' ile belirlenmiş olan örneklerden ATM-t, ATR-t, ATM-p ve ATR-p proteinlerinin analizi için 300µg alınmıştır. Diğer proteinlerin yani Wip1, γH2AX, Chk1-t, Chk2-t, Chk1-p, Chk2-p proteinlerinin analizi için ise; 100µg olacak şekilde alınmış ve jele yüklemeden önce indirgeyici bir tampon olan '6X loading dye' ile karıştırılarak 95 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Böylece örnekler jele yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

3.2.6.10.3.3. Elektroforetik yürütme işlemi

Bölüm 3.2.6.10.3.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanmış olan SDS-PAGE jel dikey elektroforez tankına yerleştirilerek içerisine '1X Running Buffer' eklenmiş ve taraklar çıkartılmıştır. Taraklar çıkartıldıktan sonra oluşan kuyucuklara, protein ağırlık belirteci

(protein marker) ve Bölüm 3.2.6.10.3.2.'de belirtildiği gibi hazırlanmış olan örnekler yüklenmiştir. Yükleme sonrası örnekler ayırıcı jele gelinceye kadar (yaklaşık 45 dakika) 70 voltta daha sonra ise 120 voltta (yaklaşık 90 dakika) yürütülmüştür.

3.2.6.10.3.4. Transfer işlemi (yarı ıslak transfer işlemi)

Jelin membrana transfer işlemine geçilmeden önce, transferde kullanılacak olan PVDF membran önce metanolde 5 dakika sonrasında ise 'Towbin Transfer Buffer' içerisinde 5 dakika bekletilerek aktive edilmiştir. Öte yandan 6 adet whatman filtre kağıdı 'Towbin Transfer Buffer' ile tamamen ıslatılmış ve transfer sistemine yerleştirilmiştir. Üzerine aktifleştirilmiş olan PVDF membran onun üzerine ise SDS-PAGE jelin ayrıştırıcı jel tabakası yerleştirilmiştir (Elektroforez sonrası SDS-PAGE jelin paketleyici kısmı uzaklaştırılmıştır). Son olarak tekrar 6 adet whatman filtre kağıdı yine 'Towbin Transfer Buffer' da ıslatılarak jelin üzerine yerleştirilmiş ve transfer modülünün kapağı kapatılarak 1A° akım ve 25V'da 30 dakika transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sırasında whatman filtre kağıtları, membran ve jel arasında hava kabarcığının kalmamasına dikkat edilmiştir.

3.2.6.10.3.5. Bloklama işlemi

Bu işlem proteinleri bağlamış olan PVDF membranda, spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için protein bağlanmamış kısımların ilgisiz proteinlerle kaplanmasını sağlamak amacı ile gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemini takiben, proteinleri bağlamış olan PVDF membran % 6'lık süt tozu (Skim Milk Solüsyonu) içerisinde 1 saat boyunca yatay çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Süre sonunda skim milk solüsyonu bir falkona alınarak seconder antikorun hazırlanması işleminde kullanılmış PVDF membran ise 1-2 dakika '1X TBS-t' solüsyonu ile yıkanmıştır.

3.2.6.10.3.6. Primer ve seconder antikor ile inkübasyon işlemleri

ATM, ATR, ATM-p, ATR-p, Wip1, Chk1, Chk2, Chk1-p, Chk2-p, p53, p53-p, γH2AX ve kontrol olarak kullanılan GAPDH primer antikorları Tablo 10.'da belirtildiği dilüsyon oranlarına göre % 5'lik BSA solüsyonunda dilüe edilerek hazırlanmıştır. Sonrasında ise PVDF membranlar primer antikorlar ile gece boyunca 4 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda primer antikorlar tekrar kullanılmak üzere 4°C'de bir süre

saklanmıştır. Membranlar ise 3 kez 5'er dakika süre ile '1X TBS-t' solüsyonu ile yıkanmıştır. Membran yıkama sonrasında ise; % 6'lık süt tozu solüsyonu içerisinde Tablo 11.'de belirtildiği oranlarda hazırlanmış olan seconder antikorda 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası membran yine 3 kez 5'er dakika 'TBS-t' solüsyonu ile yıkanmıştır.

Tablo 10. İmmunoblotlamada kullanılan birincil antikorların spesifitesi firma bilgileri ve dilüsyon oranları

Antikor	Dilüsyon Oranı
ATM-t, ATM-p	1:1000
ATR-t, ATR-p	1:1000
Chk1-t, Chk2-t	1:200
Chk1-p, Chk2-p	1:1000
Wip1	1:250
γH2AX	1:800
GAPDH	1:8000

Tablo 11. İmmunoblotlamada kullanılan ikincil antikorların ürün kodu, firma bilgileri ve dilüsyon oranları

Antikor	Dilüsyon
Anti-Mouse IgG-HRP	1:1000
Anti-Rabbit IgG-HRP	1:1000

3.2.6.10.3.7. ECL ile görüntüleme işlemi

Yıkama sonrası PVDF membran üzerindeki protein belirteçleri WesternSure Pen (Licor) kalemi ile işaretlenmiş ve membran ECL solüsyonu ile muamele edilerek ChemiDoc-ItR2 Imager (UVP) cihazında görüntülenmiştir. Elde edilen bant görüntüleri kaydedilerek yazılım programı ile analiz edilmiştir.

3.2.7. PPM1D/Wip1 Geninin RNA İnterferansı ile Hedeflenmesi

RNA interferansı (RNAi) son yıllarda geliştirilen ve gen nakavtının yerine kullanılan basit ve etkili bir yöntemdir. RNAi; çift zincirli RNA'nın hücreye girşi ile başlatılan ve homolog mRNA'ların diziye özgü yıkımına yol açarak transkripsiyon sonrası hedef gen ekspresyonunun susturulması işlemidir (Boutter ve ark, 2014, Landry ve ark, 2015). RNAi yöntemi ile gen susturma işlemlerinde; RNase III endonükleaz Dicer'in etkisiyle çift zincirli

RNA'dan türevlenen 21-23 baz çiftlik small-interfering (siRNA)'lar kullanılmaktadır (Huang ve ark; 2016).

Bu çalışmda da PPM1D/Wip1 geninin hedeflenmesi için RNA interferansı (short interfering RNA, siRNA) teknolojisinden yararlanıldı. Böylece Jurkat hücre dizilerinde PPM1D/Wip1 gen ifadesi mRNA'nın tahrip edilmesi ve protein sentezinin durdurulması ile düşürülerek bu hücre dizilerinde etoposid ve doxorubicin ile indüklenen DNA hasarı cevabı, apoptozis ve senesens üzerinde Wip1 fosfatazın etkisine bakıldı. Bu amaçla hem full length hem de truncated mutant PPM1D/Wip1' in hedeflenmesi için ticari olarak temin edilmiş olan siRNA oligoları, bir transfeksiyon ajanı olan lipofektamin kullanılarak geçici transfeksiyonla hücrelere (Kilic ve ark, 2007) tarafından tarif edildiği şekilde aktarılmıştır.

Bu işlem için öncelikle $1x10^6$/ml hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu steril plakalara 2,5ml hacimde hücreler penisilinsiz besi ortamında (% 90 RPMI 1640 ve %10 FBS ile hazırlanmıştır) 1 gün boyunca kültüre edilmiştir. Süre sonunda besi ortamı hücrelerden olabildiğince uzaklaştırılarak üzerlerine 'lipofektamin-siRNA Mix' den (Mix'in hazırlanışı bu bölümün sonunda anlatılmıştır.) 400 µl eklenmiş ve 37°C'de % 4 CO_2 içeren ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerine 400 µl optimem eklenerek 37°C'de % 4 CO_2 içeren ortamda gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine tamamlanmış RPMI 1640 besi ortamı eklenerek 1 gün boyunca 37°C'de % 4 CO_2 içeren ortamda kültüre edilmişlerdir. Süre sonunda hücreler etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile muamele edilerek 24 saat boyunca kontrol grubu da dahil olmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda öncelikle Jurkat hücrelerinde Wip1 ifadesinin susturulup susturulmadığı W.B. analizi ile kontrol edilmiştir. Sonrasında ise Bölüm 3.2.6.5, Bölüm 3.2.6.6., Bölüm 3.2.6.7., Bölüm 3.2.6.8. ve Bölüm 3.2.6.9.'da bahsedilen analiz işlemleri belirtildiği şekilde yapılarak RNA interferansı ile Wip1'in hedeflendiği Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin DNA hasarı cevabı, senesens ve apoptozis üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Lipofektamin-siRNA Mix'in Hazırlanması

Bu mix steril kabinde A ve B olmak üzere iki farklı solüsyonun karışımı ile hazırlanmıştır.

Tablo 12. A ve B solüsyon içerikleri

Optimem Medium		
A Solüsyonu	196 µl	4 µl siRNA
B Solüsyonu	196 µl	4 µl ipofektamin

A ve B solüsyonu ayrı ayrı steril 15ml'lik falkonlarda Tablo 12.'de içerikleri belirtildiği şekilde hazırlanarak 5'er dakika bekletilmişlerdir. Sonra pastör pipeti yardımı ile B solüsyonunda hava kabarcıkları oluşturularak içerisine mikro pipet yardımı ile A solüsyonu azar azar eklenmiştir. Elde edilen mix 20 dakika boyunca hareket ettirilmeden kabinde bekletilmiş süre sonunda hücrelere aktarılmıştır.

3.2.8. RNA İzolasyonu

RNA izolasyon işlemlerinde 'RNeasy Mini Kit (Quigen)' kullanılmıştır.

RNA izolasyonu için öncelikle hiç bir kemoterapi ajanı ile muamele edilmemiş olan Jurkat hücrelerinden toplamda $3x10^6$ hücre olacak şekilde bir falkona alınmış ve 3000xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine, kit içeisinde hazır olarak bulunan RLT Buffer 'dan 350 µl eklenmiş ve içeriğin karışmasını sağlamak için pipetaj yapılmıştır. Daha sonra 20G iğne ucuna sahip bir şırınga ile 5 kez lizat şırınga içerisinden geçirilip bırakılmıştır. Lizatı homojen hale getirmek amacı ile 1 ml % 70'lik etanol eklenmiştir. Pipetaj yaparak karışım sağlandıktan sonra karışımdan 700 µl alınarak kit içerisinde bulunan kolonlara aktarılmış (2 ml'lik toplama tüplerinin içerisinde bulunan RNeasy spin kolonlara) 15 saniye 8000xg' de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra aynı işlem kalan lizat için tekrar edilmiştir. 700 µl RW1 Buffer kolon üzerine eklenerek 15 saniye 8000xg' de santrifüj edilmiş ve 2 ml'lik tüp içerisinde kalan atık kısım uzaklaştırılmıştır. 500 µl Buffer RPE eklenip 15 saniye 8000xg' de santrifüj edilmiş ve tüp içerisinde ki atık kısım uzaklaştırılarak tekrar santrifüj edilmiştir. Kolon 1,5ml'lik toplama tüp (collection tüp) içerisine alınmış ve üzerine 30 µl RNase-free su eklenmiştir. 1 dakika 8000xg'de santrifüj edildikten sonra 1,5 ml'lik tüp içerisinde RNA elde edilmiştir. Elde edilen RNA hiç bekletilmeden -80 °C de saklanmıştır. Ayrıca RNA miktarını tayin etmek amacı ile Qubit ölçüm cihazı kullanılmıştır.

3.2.9. Real Time Ready Single Assay Metodu

3.2.9.1. cDNA (komplementer) sentezi

cDNA sentezi için High-Capacity cDNA Revers Transcription Kit (Appilied Biosystems) kullanılmıştır.

Aşağıda içeriği verilen 2xRT Master Mix (20 µl için) hazırlanmıştır. (Miktarlar örnek sayısı ile çarpılarak hazırlanır.)

10 x RT Buffer	2.0 µl
25 x dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10 x RT Random Primers	2.0 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0 µl
Nuclease-free H_20	4.2 µl
---	---
Final Hacim	10 µl

2x Master Mix' ten 10 µl pcr tüplerine eklenmiştir. Daha sonra Bölüm 3.2.8.'de belirtildiği gibi RNA izolasyonu ve RNA miktar tayini yapılmış olan örnekler 10 µl volüm içerisinde 1mg RNA olacak şekilde nuclease-free su ile dilüe edilmiş ve karışımın 10 µl' si pcr tüpünün içerisinde ki master mix üzerine eklenmiştir. 3 - 4 kez pipetleyerek karışması sağlanmış ve hava kabarcığı kalmaması için tüpler santrifüj edilmiştir. Hazırlanan karışım Termal Cycler hazır oluncaya kadar buz üzerinde bekletilmiştir.Tüpler daha sonra Termal Cycler'a yerleştirilmiş ve Tablo 13.'de belirtilen programda çalıştırılmıştır.

Tablo 13. cDNA sentez basamakları ile bu basamaklardaki sıcaklık ve bekleme süreleri

	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
SICAKLIK	25°C	37 °C	85 °C	4 °C
ZAMAN	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.2.9.2. Real-Time PCR aşaması

Real-Time PCR aşamasında hedeflenen RNA ekspresyon düzeyini belirlemek için ilgili gen bölgesine spesifik primer ve probları içeren 'Real-Time Ready Assay' kullanılmıştır. Referans gen yani β-actin geni PPM1D/Wip1 geninin ekspresyonunun rölatif kantitasyonunda kullanılmıştır. Real Time Ready Single Assay çalışması için reaksiyon başına cDNA ile birlikte 20 µl olacak şekilde karışım Tablo 14.'de ifade edildiği gibi hazırlanmıştır.(Miktarlar örnek sayısı ile çarpılarak hazırlanır.)

Tablo 14. PCR işleminde kullanılan malzemelerin miktarları

	Miktar
PCR Master Mix, No AmpErase UNG (2X)	10 µl
Gene Ekspression Assay Mix (20X)	1 µl
Nuclease-free water	7 µl
Nuclease-free water ile dilüe edilmiş Cdna	2 µl
SON HACİM	20 µl

Real Time Ready Assay' in çalışabilmesi için gerekli olan PCR koşulları Tablo 15.'de belirtilmiştir.

Tablo 15. PCR aşamaları ile bu aşamalardaki sıcaklık miktarları ve bekleme süreleri

	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon (1 döngü)	95°C	10 dakika
Amplifikasyon (40 döngü)	95°C 60°C	15 saniye 60 saniye

Relatif mRNAs ekspresyon düzeyleri delta C_T metoduna uygulanarak elde edilmiştir. Buna göre; $\Delta\Delta C_T$: normalize edilmiş C_T değerleri arasındaki fark olmak üzere;

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\ treatment} - \Delta C_{T\ control}$$

$\Delta\Delta C_T$ daha sonra aşağıdaki formülle folkat değişimi olarak çevrilmiştir.

$$\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

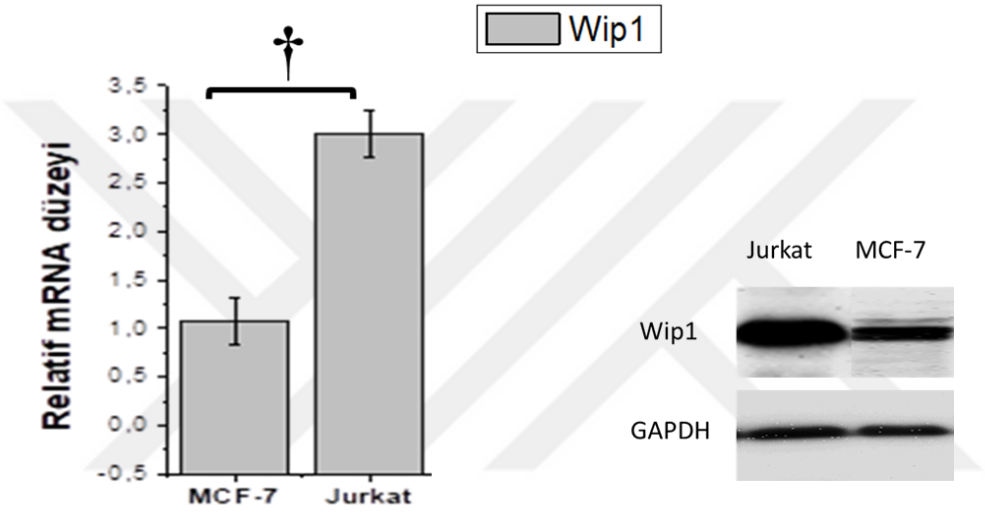
3.2.10. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi

Grafikler birbirinden bağımsız 3 tekrardan oluşan ölçüm sonuçlarının ortalamaları alınarak 'Origin 8.0' programıyla hazırlanmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde ise; gruplar arasında ki anlamlı farklılıklar 'Pair-Sample-t Testi' kullanılarak belirlenmiş olup $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Wip1'in Jurkat Hücrelerinde mRNA ve Protein Düzeyinde Belirlenmesi

Jurkat hücrelerinde Wip1'in mRNA ve protein düzeyinde ifadesinin belirlenmesi için sırasıyla 'qRT-PCR' ve 'Western Blot' analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde pozitif kontrol olarak Wip1'in aşırı ifade edildiği billinen MCF7 meme karsinoma hücre dizileri kullanılmıştır (J. Y. Song, S. H. Ryu, Y. M. Cho, Y. S. Kim, B. M. Lee, S. W. Lee and J. Choi, 2013). Elde edilen veriler Şekil 11.' de gösterilmiştir.



Şekil 11. Jurkat hücrelerinde Wip1'in mRNA ve protein düzeyinde analizi

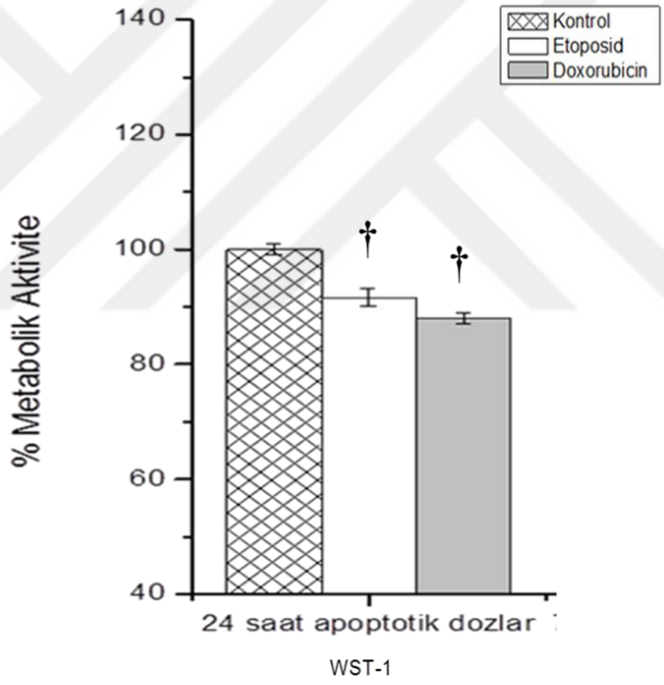
(† : Kontrol grubuna göre $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 11.'de ki grafikte gösterildiği üzere Jurkat hücrelerinde Wip1 mRNA düzeyinin MCF7 hücreleriyle kıyaslandığında daha yüksek seviyelerde olduğu saptanmıştır. Jurkat hücreleri ile MCF7 hücrelerinde qRT-PCR ile ölçülen Wip1 mRNA düzeyleri arasında ki farklılık ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,018$; $p<0,05$). Ayrıca MCF7 ve Jurkat hücrelerinde Wip1'in protein düzeylerinin karşılaştırıldığı W.B analaizleri sonucunda da yine Wip1'in Jurkat hücrelerinde MCF7 hücrelerine kıyasla daha yüksek düzeyde ifade edildiği tespit edilmiştir. Böylece hem qRT-PCR hemde W.B. analizlerinden elde edilen veriler neticesinde Wip1'in Jurkat hücrelerinde aşırı ifade edildiği belirlenmiştir.

4.2. Etoposid ve Doxorubicinin 24 Saatte Apoptozisi İndükledikleri Dozlarının Jurkat Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

4.2.1. WST-1 Testi ile 24 Saatte Hücre Canlılığının ve Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Jurkat hücrelerinde canlılığın ve sitotoksik etkinin belirlenmesi için; 5 µg/ml etoposid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 24 saat muamele edilmiş ve süre sonunda Bölüm 3.2.6.4'de belirtildiği gibi 'Wst-1 testi' protokolü uygulanmış ve veriler spektrofotometrede 450 nm' de ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu ile normalize edilerek meydana gelen metabolik aktivitede ki değişim miktarı Şekil 12.'de gösterildiği gibi % ortalama ± standart sapma olarak grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 12. Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile 24 saat inkübasyonu sonrasında meydana gelen metabolik aktivite değişiminin % olarak gösterimi

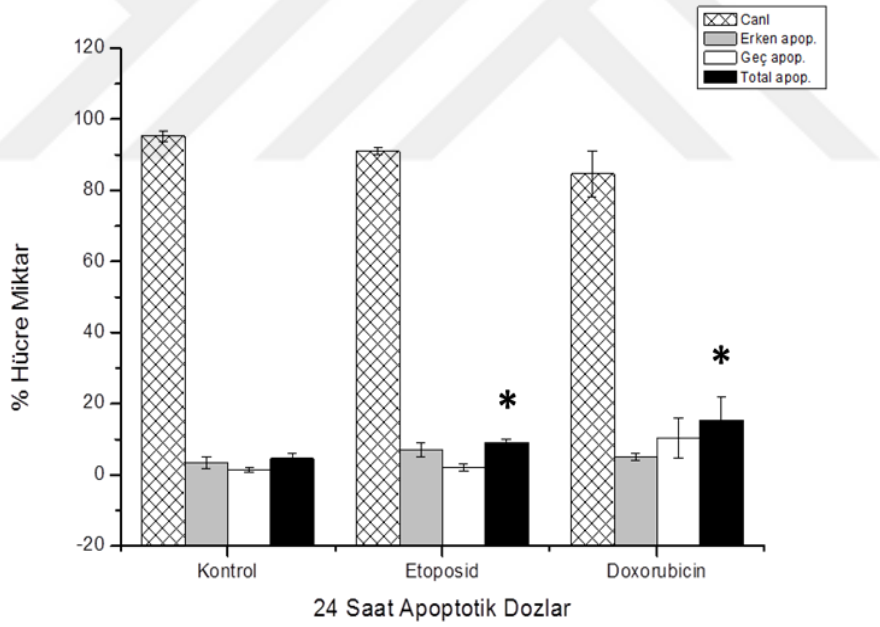
(† : Kontrol grubuna göre $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 12.'de ki grafikte gösterildiği üzere Wst-1 analizi ile kontrol grubunda ölçülen metabolik aktivitenin % 99 (±3) oranında olduğu, etoposid ve doxorubicin ile muamele

edilen gruplarda ise bu oranın sırasıyla % 92 (±2) ve % 88 (±2) olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler sonucu Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozlarının 24 saatlik inkübasyon sonrasında metabolik aktivite üzerine etki ettikeri ve kontrol grubuna kıyasla metabolik aktiviteyi azalttıkları ve azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (sırasıyla p=0,008; p< 0,05 / p=0,002; p<0,005).

4.2.2. Annexin V Testi ile 24 Saatte Hücre Canlılığın ve Apoptozisin Belirlenmesi

Jurkat hücreleri 5µg/ml etoposid ve 1 µg/ml doxorubicin ilaç dozları ile 24 saat muamele edilmiş ve meydana gelen apoptozisin belirlenmesi için Bölüm 3.2.6.6.'da belirtildiği gibi 'Annexin-V testi' gerçekleştirilmiştir. Meydana gelen appoptozis erken apoptotik, geç apoptotik ve total apoptotik hücre miktarları ile canlı hücre miktarı % olarak ölçülmüştür. Birbirinden bağımsız 3 tekrardan oluşan ölçüm sonuçlarının ortalamaları alınarak. Şekil 13.'de gösterildiği gibi % ortalama± sapma olarak grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 13. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 24 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimin % olarak gösterimi

(* : Kontrol grubuna göre p < 0,01'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir)

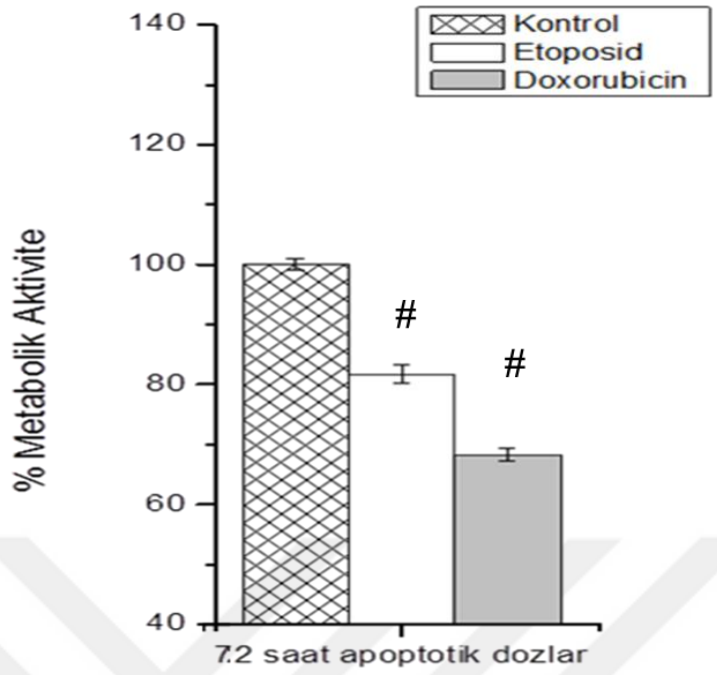
24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen veriler sonucu; kontrol grubu hücrelerinde % 5 (±2) oranında apoptozis belirlenmiş, etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda ise sırasıyla % 9 (±1) ve % 15 (±6) oranında apoptozis meydana geldiği tespit edilmiştir. Etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda meydana gelen apoptozis miktarınnın kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği de saptanmıştır (sırasıyla $p=0,09$; $p < 0,01$ / $p=0,06$; $p<0,01$).

Hem Wst-1 hem de Annexin V analizleriyle elde edilen veriler sonucunda 24 saat inkübasyon sonunda kontrol grubuna göre ilaçla muamele edilen gruplarda metabolik aktivite ve apoptozis oranlarında anlamlı bir farklılık tespit edilmesine rağmen bu oranların yine de oldukça düşük olması nedeniyle ilaç muamele süreleri 72 saate uzatılmıştır. Bu nedenle sonraki analizlerde 72 saat süre sonunda gerçekleştirilmiştir.

4.3. Jurkat Hücrelerinde Etoposid ile Doxorubicinin Apoptozisi İndükledikleri Dozlarının 72 Saatte Hücre Canlılığı ve Apoptozis Aktivasyonu Üzerine Etkileri

4.3.1. Wst-1 Testi ile 72 Saatte Hücre Canlılığının ve Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Jurkat hücrelerinde 72 saatte canlılığın ve sitotoksik etkinin belirlenmesi için; 5 µg/ml etoposid ve 1 µg/ml doxorubicin ile muamele edilmiş ve inkübasyon sonunda Bölüm 3.2.6.4'de belirtildiği gibi 'Wst-1 testi' protokolü uygulanmış ve veriler spektrofotometrede 450 nm' de ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu ile normalize edilerek meydana gelen metabolik aktivitede ki değişim miktarı Şekil 14.'de gösterildiği gibi % ortalama ± standart sapma olarak grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 14. Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile 72 saat inkübasyonu sonrasında meydana gelen metabolik aktivite değişiminin % olarak gösterimi

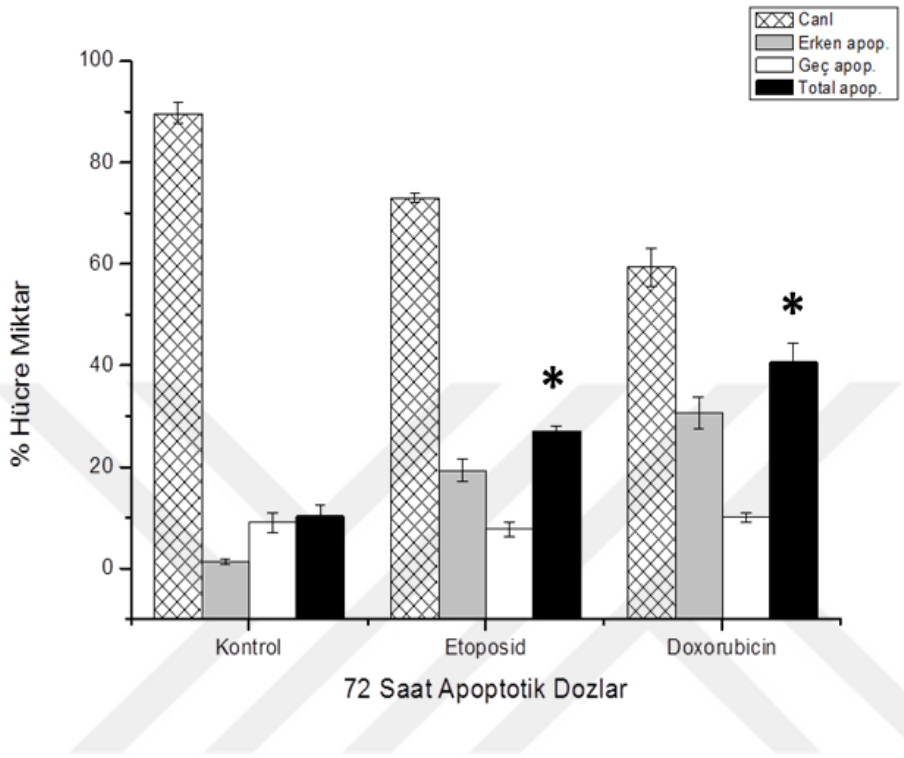
(#: Kontrol grubuna göre $p < 0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir).

Şekil 14.'de ki grafikte gösterildiği üzere Wst-1 analizi ile kontrol grubunda ölçülen metabolik aktivitenin % 99 ($\pm$3) oranında olduğu, etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda ise bu oranın sırasıyla % 82 ($\pm$3) ve % 68 ($\pm$2) olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler sonucu Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozlarının 72 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubuna kıyasla metabolik aktiviteyi önemli derecede azalttıkları ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. (sırasıyla $p=1,85 \times 10^{-4}$; $p< 0,001$ / $p=3,715 \times 10^{-4}$; $p<0,001$).

4.3.2. Annexin V Testi ile 72 Saatte Hücre Canlılığının ve Apoptozisin Belirlenmesi

Jurkat hücreleri 5µg/ml etoposid ve 1 µg/ml doxorubicin ilaç dozları ile 72 saat muamele edilmiş ve meydana gelen apoptozisin belirlenmesi için Bölüm 3.2.6.6.'da belirtildiği gibi 'Annexin-V testi' gerçekleştirilmiştir. Meydana gelen appoptozis erken

apoptotik, geç apoptotik ve total apoptotik hücre miktarları ile canlı hücre miktarı % olarak ölçülmüştür. Birbirinden bağımsız 3 tekrardan oluşan ölçüm sonuçlarının ortalamaları alınarak Şekil 15.'de gösterildiği gibi % ortalama± sapma olarak grafiğe aktarılmıştır.



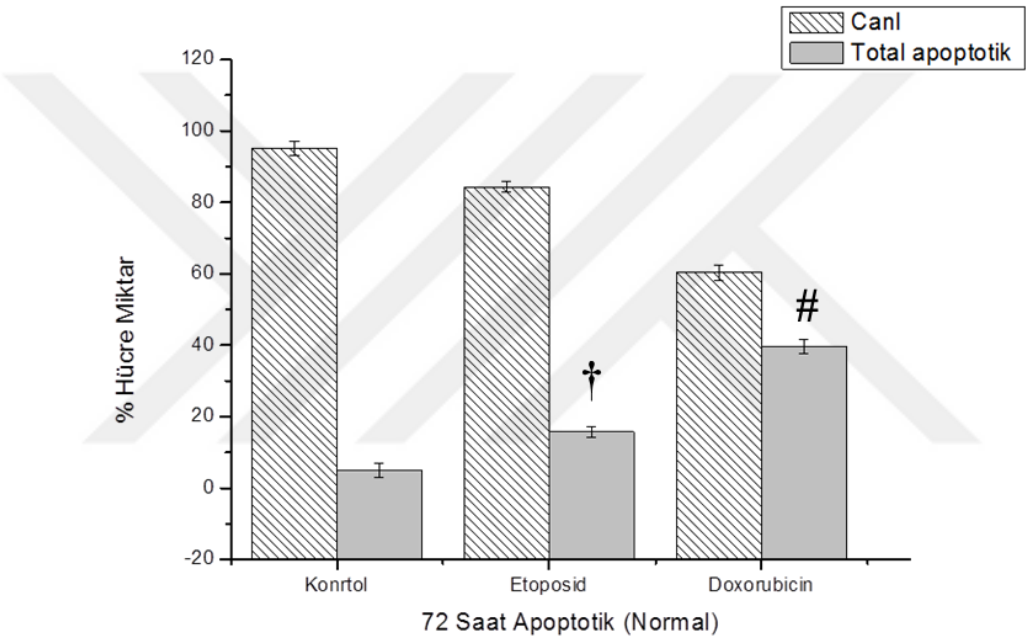
Şekil 15. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimin % olarak gösterimi

(* : Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir $p < 0,01$'de)

Şekil 15.'de gösterildiği üzere; 72 saat inkübasyon sonrası AnnexinV analizleri sonucu; total apoptotik hücre miktarının kontrol grubunda % 10 (±2) oranında, etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda ise bu miktarın sırasıyla % 27 (±1) ve % 41 (±3) oranına ulaştığı saptanmıştır. Böylece hem etoposid hemde doxorubicin ile muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0,0099$; $p < 0,01$ / $p=0,0058$; $p<0,01$).

4.3.3. Caspase 3/7 Testi ile Apoptozisin Belirlenmesi

Caspase 3 ve Caspaz 7 apoptozisin ileri evrelerinde görev alan iki önemli proteindir. Dolayısıyla bu proteinlerin aktivasyonu apoptozisin iyi bir belirteci olarak değerlendirilir. Caspase 3/7 analiz çalışmasında; etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozlarıyla 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptozisin belirlenmesi amaçlanmış ve sonuçlar 'muse hücre analiz' cihazında ölçülerek değerlendirilmiştir. Birbirinden bağımsız en az 3 tekrardan oluşan çalışmalar neticesinde edilen verilerin ortalamaları alınarak sonuçlar Şekil 16.'da gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır (% ortalama± standart sapma olarak değerlenirilmiştir).



Şekil 16. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinin Caspase 3/7 aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi

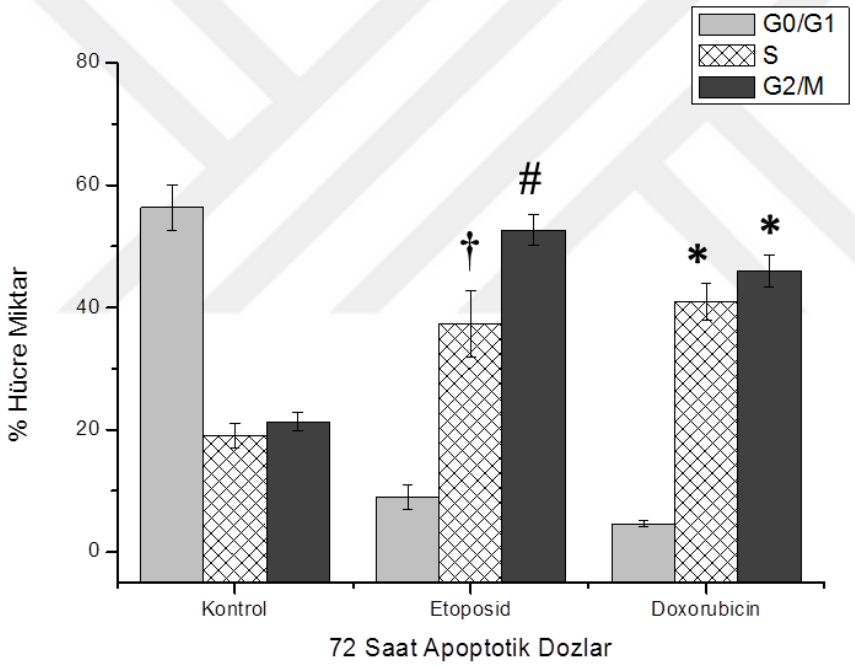
(† : Kontrol grubuna göre $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir. # : Kontrol grubuna göre $p < 0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 16.'da gösterildiği gibi 72 saat inkübasyon sonrası kontrol grubunda % 5 (±2) oranında Caspase 3/7 aktivasyonu saptanmıştır. 72 saat etoposid ile muamele edilen grupta ise bu oran % 16 (±2)' a ulaşmış ve kontrole kıyasla önemli derecede artış gösterdiği saptanmıştır ($p=0,012$; $p < 0,05$). Bununla birlikte doxorubicin ile 72 saat muamele edilen

grupta caspase 3/7 aktivasyonunun % 40 (±2) oranında olduğu ve kontrole kıyasla anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p=9,24 \times 10^{-5}$; $p < 0,001$).

4.3.4. Hücre Döngüsü Analizlerinin Değerlendirilmesi

Wip1 ifadesi aşırı artmış Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile 72 saat muamele edilmesi sonucu hücrelerin hücre döngüsü tutuklanmasını başarıp başaramadıklarını, tutuklanma gerçekleşti ise hangi fazda olduğunu belirlemek amacı ile Bölüm 3.2.6.8'de belirtildiği gibi 'hücre siklusu testi' yapılmıştır. Birbirinden bağımsız 3 tekrar şekilde gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak Şekil 17.'de gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır (% ortalama± standart sapma olarak değerlenirilmiştir).



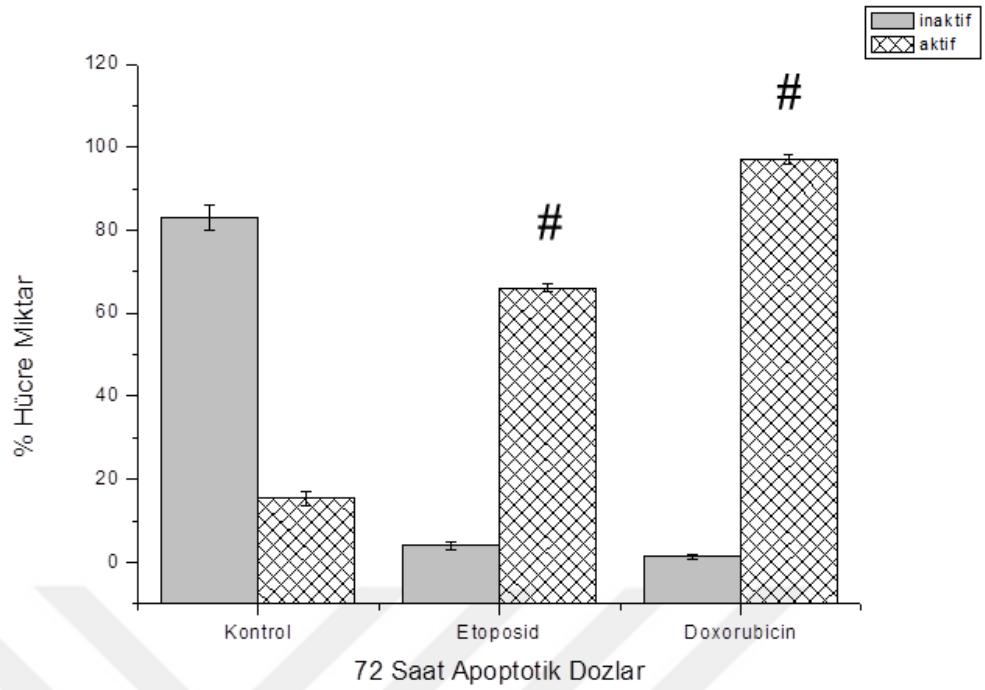
Şekil 17. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü fazlarında meydana gelen değişimin % olarak gösterimi

(*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir. †: Kontrol grubuna göre $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir. #: Kontrol grubuna göre $p < 0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 17.'de; G0/G1 fazı kontrol grubunda % 56 (±4) oranındayken bu oranın etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda ise sırasıyla % 9 (±2) ve % 5 (±1) olduğu ve kontrole kıyasla önemli derecede azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Öte yandan. S fazı oranının kontrol grubunda % 19 (±2) oranında olduğu ve etoposid ile muamele edilen grupta ise bu oranın % 37 (±5)' e ulaşarak kontrole kıyasla anlamlı bir artışın meydana geldiği tespit edilmiştir ($p=0,017$; $p < 0,05$). Doxorubicin ile muamele edilen grupta ise % 41 (±3) oranında S fazı tutuklanması saptanmış ve yine kontrole kıyasla anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p=0,003$; $p < 0,01$). G2/M fazına bakıldığında ise; etoposid ile muamele edilen grupta % 53 (±3) oranında tutuklanmanın olduğu ve kontrole kıyasla anlamlı bir artışın meydana geldiği saptanmıştır ($p=4,5 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$). % 46 (±3) oranında tutuklanmanın görüldüğü doxorubicin ile mumele edilen grupta da yine kontrole kıyasla anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p=0,008$; $p < 0,01$).

4.3.5. Etoposid ve Doxorubicinin 72 Saatte Apoptozisi İndükledikleri Dozlarıyla Muamele Edilen Jurkat Hücrelerinde DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Değerlendirilmesi

Etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozlarının 72 saatlik muamelesi sonucunda Jurkat hücrelerinde DNA hasarına sebep olup olmadıklarını tespit etmek amacı ile Bölüm 3.2.6.9'da ifade edildiği üzere 'γH2AX analizi' yapılmış elde edilen veriler grafik halinde Şekil 18.'de sunulmuştur.



Şekil 18. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi

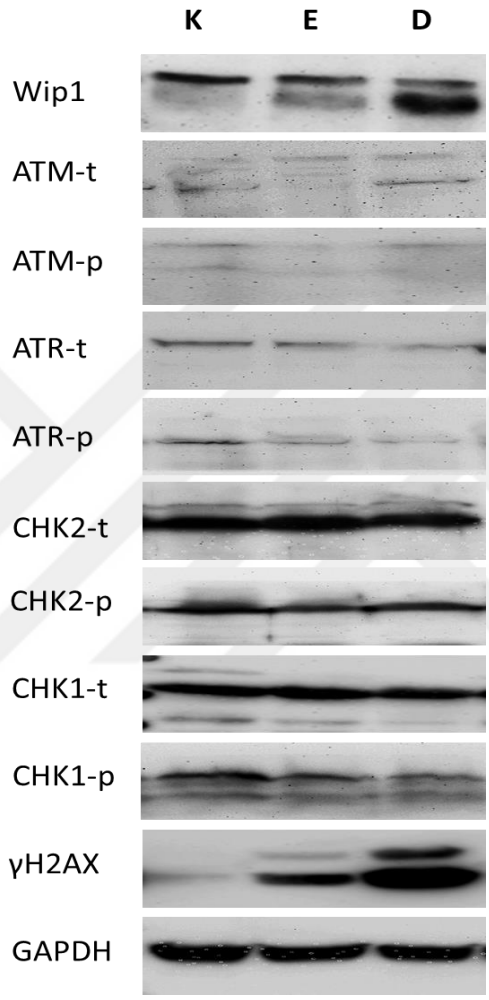
(# : Kontrol grubuna göre $p < 0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Etoposidin ve doxorubicinin apoptotik dozları ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücre gruplarının sırasıyla % 66 (±1) ve % 97 (±1) oranında γH2AX aktivasyonuna sahip oldukları saptanmıştır. Ölçülen bu değerlerin ise % 15 (±2) oranında aktif γH2AX düzeyine sahip olan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla anlamlılık oranında ki artış; $p = 3,46 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$ / $p = 1,08 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$).

4.3.6. Etoposid ve Doxorubicinin 72 Saatte Apoptozisi İndükledikleri Dozlarının DDR Elemanları Üzerine Etkilerinin Western Blot Analizi ile Belirlenmesi

Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücrelerinde 5µg/ml etopositin ve 1µg/ml doxorubicinin (apoptotik dozlarının) 72 saat inkübasyon sonrası DDR'de rol alan ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerinin total ve fosforile formlarının ifade düzeylerine etkilerini analiz etmek için 'Western Blot (WB) analiz' çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca DNA çift zincir kırıklarının bir belirteci olan γH2AX proteininin de ifade düzeyine bakılmıştır.

Her bir analiz sonrası yüklenen protein miktarlarının ne derece eşit olduğunu göstermek amacıyla house-keeping bir gen (herhangi bir çevresel koşuldan etkilenmeyerek hücre içerisinde ki ekspresyonu sabit olan genler) olan GAPDH'in ifade düzeyi de analiz edilmiştir. WB sonrası analizi gerçekleştirilen proteinlere ait bant görüntüleri Şekil 19.'da gösterilmiştir.



Şekil 19. Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozlarının 72 saatte DDR elemanları üzerine etkileri

(Şekilde gösterilen **K**: kontrol grubunu, **E**: 5µg/ml etoposid ile muamele edilen grubu, **D**: 1µg/ml doxorubicin ile muamele edilen grubu, **-t**: proteinlerin total formlarını, **-p**: proteinlerin fosforile formlarını ifade etmektedir.)

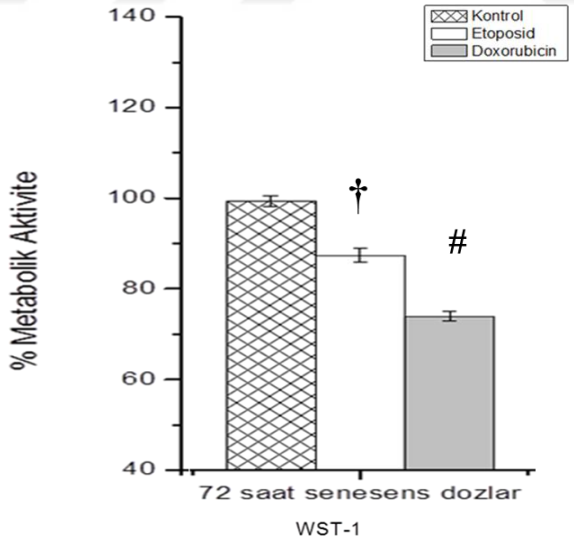
Şekil 19.'da gösterildiği üzere WB analizi ile 72 saatte; ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerinin total ve fosforile formları ayrı ayrı GAPDH ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde kontrol grubu ile etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplar

arasında önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Ancak DNA hasarının önemli bir belirteci olan γH2AX proteinine bakıldığında etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış olduğu saptanmıştır.

4.4. Jurkat Hücrelerinde Etoposid ve Doxorubicinin Senesens Aktivasyonu Üzerine Etkileri

4.4.1. Wst-1 Testi ile Etoposid ve Doxorubicinin Jurkat Hücrelerinde Senesensi İndükledikleri Dozlarının 72 Saatte Metabolik Aktivite Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Jurkat hücrelerinde canlılığın ve sitotoksik etkinin belirlenmesi için; 1 µg/ml etoposid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilmiş ve süre sonunda Bölüm 3.2.6.4'de belirtildiği gibi 'Wst-1 testi' protokolü uygulanmış ve veriler spektrofotometrede 450 nm' de ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu ile normalize edilerek meydana gelen metabolik aktivitede ki değişim miktarı Şekil 20.'de gösterildiği gibi % ortalama ± standart sapma olarak grafiğe aktarılmıştır.



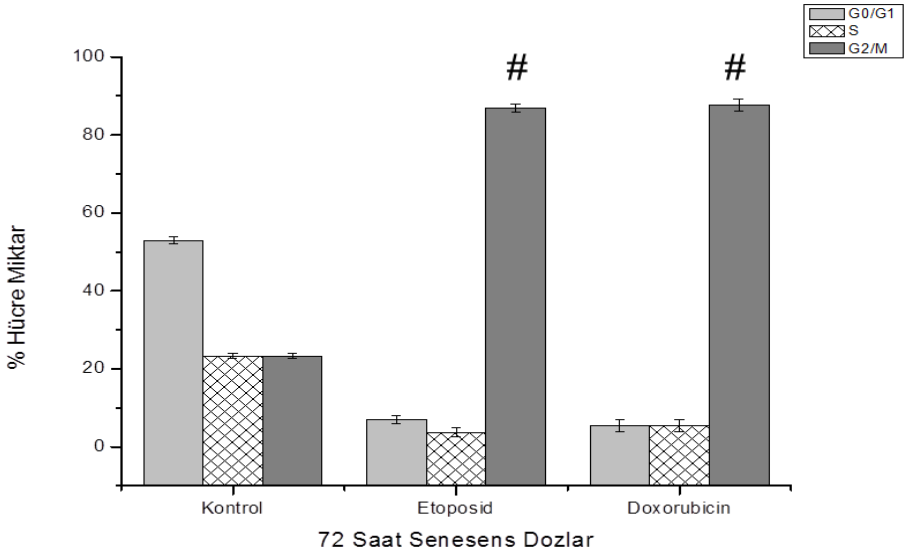
Şekil 20. Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinin senesens dozları ile 72 saat inkübasyonu sonrasında meydana gelen metabolik aktivite değişiminin % olarak gösterimi

(#: Kontrol grubuna göre $p < 0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.† : Kontrol grubuna göre $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 20.'de ki grafikte gösterildiği üzere Wst-1 analizi ile kontrol grubunda ölçülen metabolik aktivitenin % 99 ($\pm$3) oranında olduğu, etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda ise bu oranın sırasıyla % 88 ($\pm$2) ve % 74 ($\pm$4) olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler sonucu Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozlarının 72 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubuna kıyasla metabolik aktiviteyi önemli derecede azalttıkları ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. (anlamlılık derecesi sırasıyla $p = 0,0012$; $p < 0,05$ ve $p = 2,46 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$'dir).

4.4.2. Etoposid ve Doxorubicinin 72 Saatte Jurkat Hücrelerinde Senesensi İndükledikleri Dozlarının Hücre Döngüsü Dağılımı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Wip1 ifadesi artmış olan Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicinin senesens dozları ile muamele edilmesi sonucu hücrelerin hücre döngüsü tutuklanmasını başarıp başaramadıkları ve tutuklanma gerçekleşti ise hangi fazda olduğunu belirlemek amacı ile Bölüm 3.2.6.8'de anlatıldığı gibi 'hücre siklusu testi' yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 21. 'de grafik olarak gösterilmiştir.



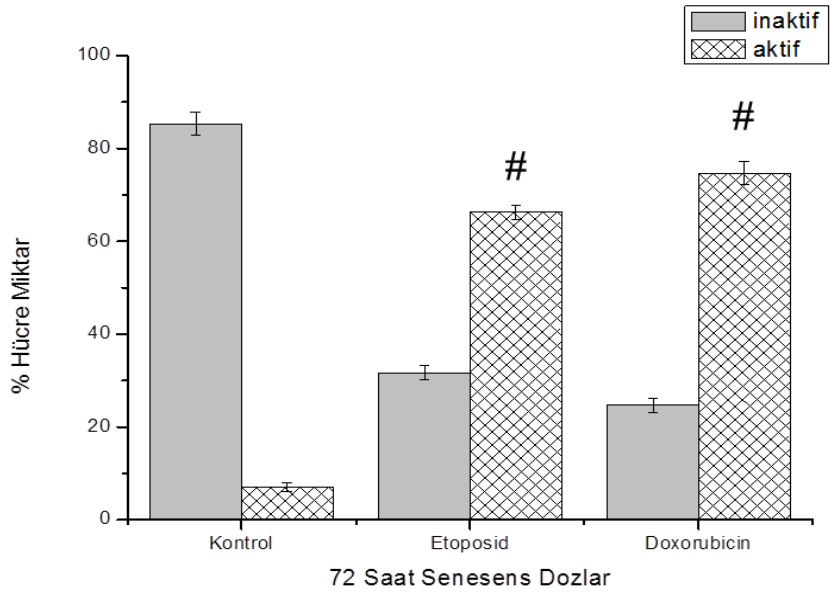
Şekil 21. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü fazlarında meydana gelen değişimin % olarak gösterimi.

(#: Kontrol grubuna göre $p < 0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Elde edilen veriler sonucunda etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen grupların kontrol grubu ile kıyaslandığında G0/G1 ve S fazı oranlarında azalma meydana geldiği buna karşılık aynı gruplarda kontrole kıyasla G2/M fazında önemli derecede bir artış meydana gelerek tutuklanmanın gerçekleştiği tespit edilmiştir. G2/M fazında etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda meydana gelen tutukltnma miktarının sırasıyla % 87 ($\pm$1) ve % 88 ($\pm$2) oranlarında olduğu ve kontrole kıyasla bu artışların anlamlı olduğu bulunmuştur (sırasıyla $p = 1,09 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$ / $p = 1,8 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$).

4.4.3. Etoposid ve Doxorubicinle 72 Saatte Senesensin İndüklendiği Jurkat Hücrelerinde Meydana Gelen DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Değerlendirilmesi

DNA'da meydana gelen hasar sonucu fosforillenerek aktive olan H2AX (γH2AX), DNA hasarının özellikle de DNA çift zincir kırıklarının önemli bir belirtecidir. Etoposid ve doxorubicinin senesens dozlarının 72 saatlik muamelesi sonucunda Jurkat hücrelerinde DNA hasarına sebep olup olmadıklarını tespit etmek amacı ile Bölüm 3.2.6.9'da ifade edildiği üzere 'γH2AX analizi' yapılmış elde edilen veriler grafik halinde Şekil 22.'de sunulmuştur.



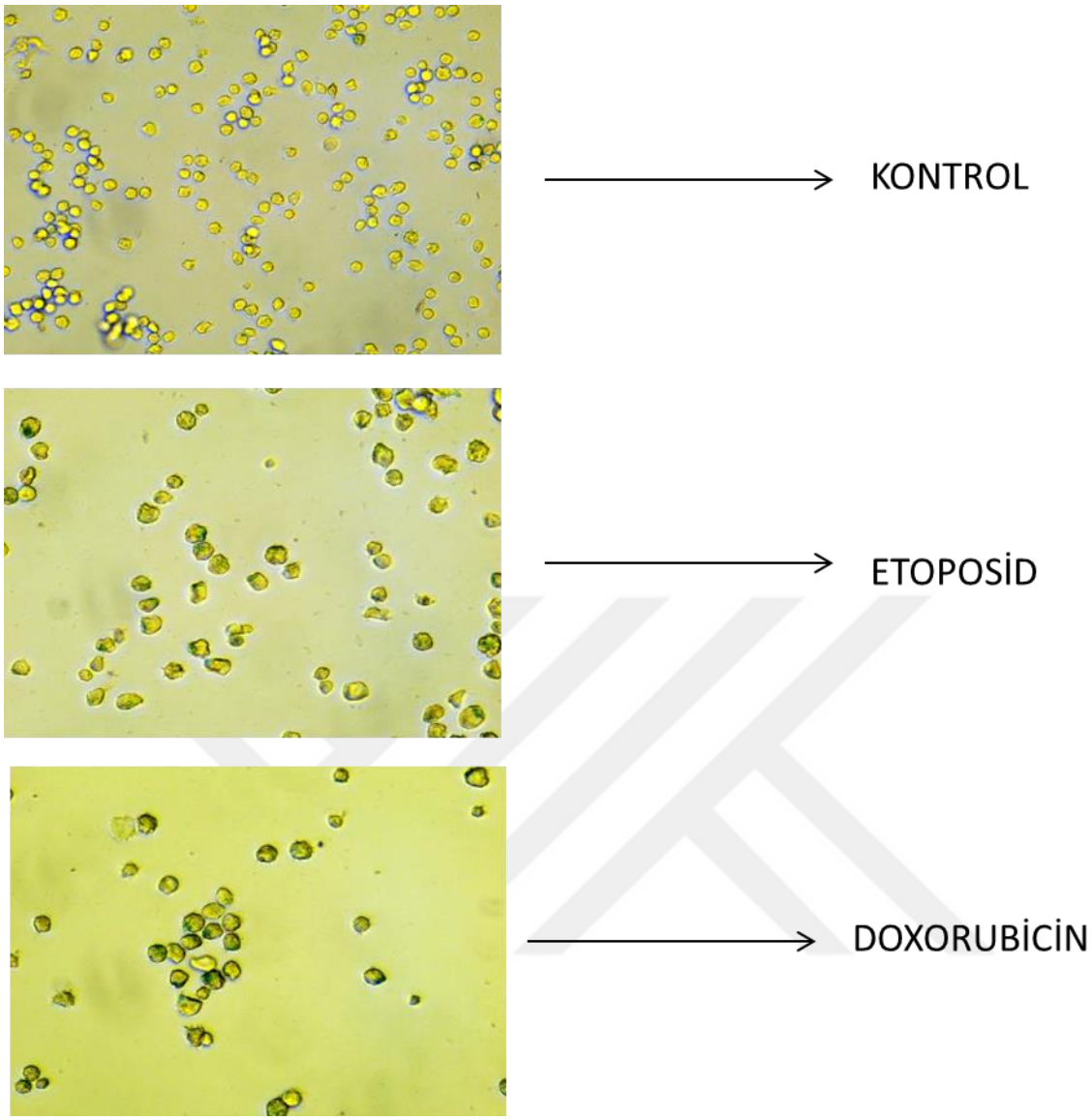
Şekil 22. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi
(# : Kontrol grubuna göre $p<0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Etoposid ve doxorubicinin senesens dozları ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücre gruplarının sırasıyla % 67 (±2) ve % 75 (±3) oranında γH2AX aktivasyonuna sahip oldukları saptanmış ve ölçülen bu değerlerin % 7 (±1) oranında aktif γH2AX düzeyine sahip olan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. (anlamlılık artışı sırasıyla $p = 5,4 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$ / $p = 8,9 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$).

4.4.4. Senesense Bağlı Olarak Artış Gösteren β-galaktozidaz Aktivitesi

Senesensin biyokimyasal bir karakteristiği olarak bilinen SA-β-gal (senescence associated β-galactosidase), β-galaktozidaz aktivitesinde görülen aşırı artışı ifade etmektedir. Biyokimyasal olarak bu aktiviteye sahip olan senesense uğramış hücreler mikroskopda bakıldığında normal hücrelere göre çok daha genişlemiş, granüler ve transparan bir görünüme sahip oldukları görülmektedir.

Jurkat hücrelerinin 72 saat etoposid (1 µg/ml) ve doxorubicinin (0,2 µg/ml) senesens dozları ile muamele edilmesinden sonra Bölüm 3.2.6.5.'de ifade edildiği gibi gerçekleştirilen SA-β-galaktozidaz boyama testi ile senesense uğrayan hücrelerde SA-β-gal aktivitesi tespit edilmiştir. Şekil 23.'de görüldüğü üzere etoposid ve doxorubicin ile muamele edilerek senesense uğramış olan hücrelerin mikroskop görüntülerine bakıldığında kontrol grubuna göre daha genişlemiş ve mavi renkli görünüme sahip oldukları tespit edilmiştir.

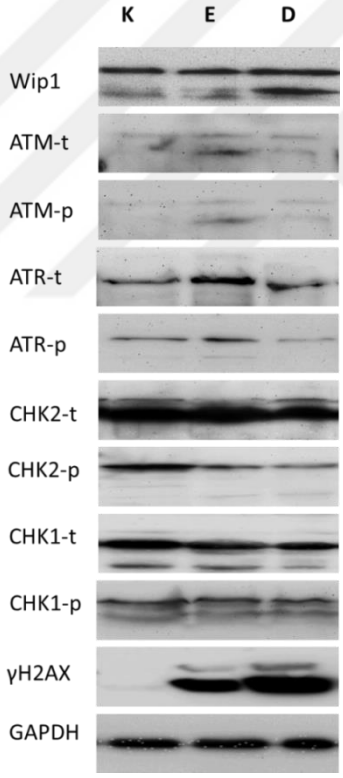


Şekil 23. 72 saat etoposid (1 µg/ml) ve doxorubicin (0,2 µg/ml) ile muamele edilen Jurkat hücrelerinin mikroskop altında SA-β-gal boyama görüntüleri

Analiz sonucu; kontrol grubu hücrelerinde senesensin meydana gelmediği buna rağmen etoposid ile muamele edilen hücrelerde % 66 (±2) oranında, doxorubicin ile muamele edilen hücrelerde ise % 74 (±3) oranında senesensin meydana geldiği tespit edilmiştir.

4.4.5. Etoposid ve Doxorubicinin 72 Saatte Jurkat Hücrelerinde Senesensi İndüklediği Dozlarının DDR Elemanları Üzerine Etkileri

Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücrelerinde 1 µg/ml etopositin ve 0,2 µg/ml doxorubicinin (senesens dozlarının) 72 saat inkübasyon sonrası DDR'de rol alan ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerinin total ve fosforile formlarının ifade düzeylerine etkilerini analiz etmek için 'W.B. analiz' çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca DNA çift zincir kırıklarının bir belirteci olan γH2AX proteininin de ifade düzeyine bakılmıştır. Her bir analiz sonrası yüklenen protein miktarlarının ne derece eşit olduğunu göstermek amacıyla bir house-keeping gen (herhangi bir çevresel koşuldan etkilenmeyerek hücre içerisinde ki ekspresyonu sabit olan genler) olan GAPDH'in ifade düzeyi de analiz edilmiştir. WB sonrası analizi gerçekleştirilen proteinlere ait bant görüntüleri Şekil 24.'de gösterilmiştir.



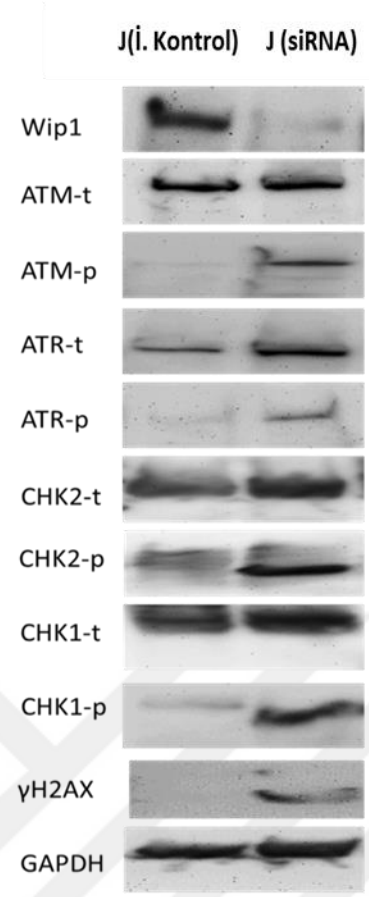
Şekil 24. Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin senesens dozlarının 72 saatte DDR elemanları üzerine etkileri.

(Şekilde gösterilen **K**: kontrol grubunu, **E**: 1 µg/ml etoposid ile muamele edilen grubu, **D**: 0,2 µg/ml doxorubicin ile muamele edilen grubu, **-t**: proteinlerin total formlarını, **-p**: proteinlerin fosforile formlarını ifade etmektedir.)

Şekil 24.'de gösterildiği üzere WB analizi ile; ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerinin total ve fosforile formları ayrı ayrı GAPDH bant yoğunlukları ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde kontrol grubu ile etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplar arasında önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Ancak DNA hasarının önemli bir belirteci olan γH2AX proteinine bakıldığında etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış olduğu saptanmıştır.

4.5. Western Blot Analizi ile Jurkat Hücrelerinde Wip1'in DDR Elemanları Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Wip1'in Jurkat hücrelerinde DDR elemanları üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu belirlemek amacı ile 'WB analiz' çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada *wt*-Jurkat hücreleri ile Wip1'in siRNA oligoları ile baskılandığı Jurkat hücreleri karşılaştırılmıştır. Burada ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerinin total (t) ve fosforile (p) formları ile γH2AX proteinlerinin ifadelerine bakılarak Wip1'in DDR üzerine etkileri değerlendirilmiştir. WB analizinden elde edilen görüntüler Şekil 25.'de gösterilmiştir.



Şekil 25. Wip1'in DDR'de rol oynayan proteinlerin ifade düzeyleri üzerine etkisi.

(Şekilde gösterilen **J(İ. Kontrol)**: Wip1'in aşırı ifade edildiği ve hiçbir proteini hedef almayan siRNA oligolarının transfekte edildiği invert kontrol grubu olan Jurkat hücrelerini, **J(siRNA)**: Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerini, **-t:** proteinlerin total formlarını, **-p:** proteinlerin fosforile formlarını ifade etmektedir.)

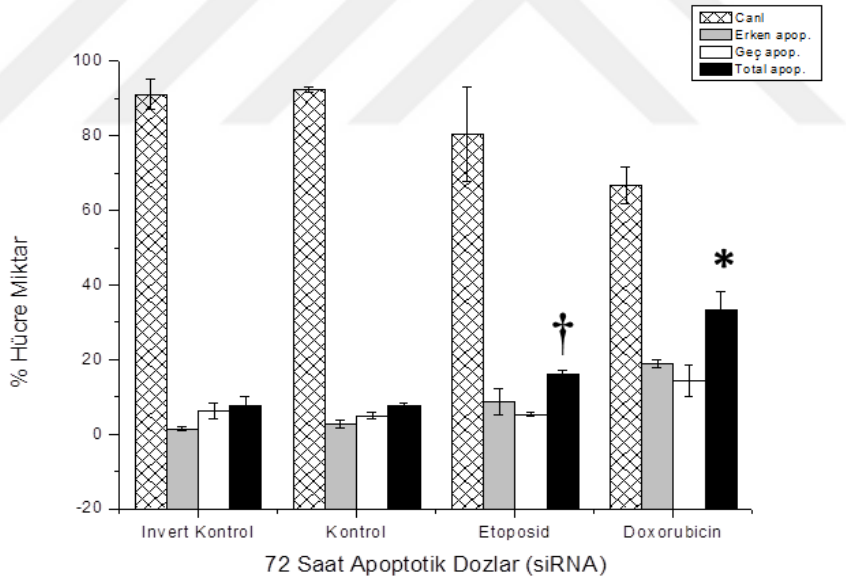
Şekil 25.'de gösterildiği üzrere RNAi yöntemi ile Wip1 ifadesinin Jurkat hücrelerinde baskılandığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte normal Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri karşılaştırıldığında ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerinin total formlarında belirgin bir fark olmadığı saptanmıştır. Ancak; Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerinin fosforile fomları ile γH2AX proteinine bakıldığında normal Jurkat hücrelerine kıyasla artış meydana geldiği tespit edilmiştir.

4.6. siRNA Oligoları ile Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Apoptozisin Değerlendirilmesi

RNA interferansı yöntemi ile Wip1'in hedeflenerek geçici olarak baskılandığı Jurkat hücreleri etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile 72 saat muamele edilerek AnnexinV, hücre siklusu ve γH2AX testleri uygulanmış böylece azalan Wip1 ifadesinin Jurkat hücrelerinde apoptozisi ne şekilde etkilediği değerlendirilmiştir. Çalışmalarda invert kontrol olarak da; hiçbir proteini hedef almayan siRNA oligolarının transfekte edildiği Jurkat hücreleri kullanılmıştır.

4.6.1 Wip1 ifadesi Baskılanmış Hücrelerde Annexin V Testi ile Apoptozisin Belirlenmesi

Bu test ile elde edilen veriler Şekil 26.'de gösterildiği gibi grafik halinde sunulmuştur.



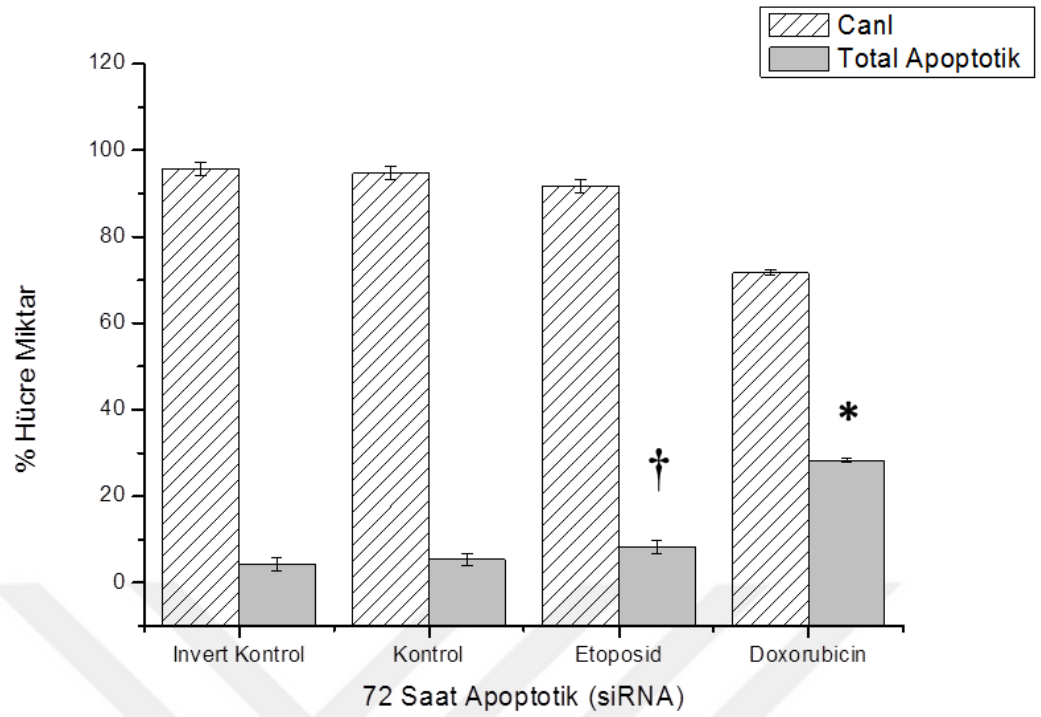
Şekil 26. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimin % olarak gösterimi

(*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir. †: Kontrol grubuna göre $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 26.'de gösterildiği gibi elde edilen veriler sonucu kontrol grubunda % 8 (±1) ve invert kontrol grubunda ise % 8 (±2) oranında total apoptotik hücre miktarı tespit edilmiş ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). Wip1 ifadesi baskılanarak etoposid ile 72 saat muamele edilen gruplarda total apoptotik hücre miktarının % 14 (±4) oranında olduğu ve kontrole kıyasla bu artışın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p=0,018$; $p<0,05$). Wip1 ifadesi baskılanarak doxorubicin ile 72 saat muamele edilen gruplarda ise; total apoptotik hücre miktarının % 33 (±5) oranında olduğu ve yine kontrole kıyasla anlamlı bir artışın meydana geldiği tespit edilmiştir ($p=0,0082$; $p < 0,01$).

4.6.2 Wip1 ifadesi Baskılanmış Hücrelerde Caspase 3/7 Testi ile Apoptozisin Belirlenmesi

Caspase 3 ve Caspase 7 proteinlerinin aktivasyonu apoptozisin iyi bir belirteci olarak değerlendirilir. Caspase 3/7 testi ile Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinin etoposid ve doxorubicin ile muamele edilerek meydana gelen apoptozisin belirlenmesi amaçlanmış ve sonuçlar 'muse hücre analiz' cihazında ölçülerek tespit edilmiştir. Elde edilen verilerin ortalamaları alınarak sonuçlar Şekil 27.'de gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır (% ortalama± sapma olarak).



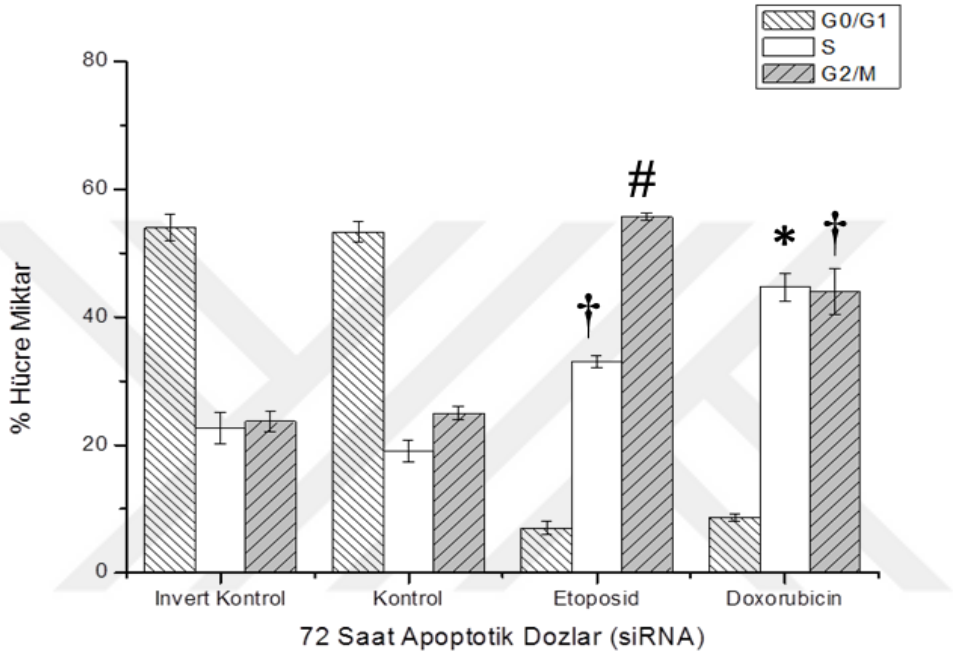
Şekil 27. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinin Caspase 3/7 aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi

(*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir. †: Kontrol grubuna göre $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 27.'de gösterildiği üzere Wip1 ifadesi baskılanmış kontrol grubu ile invert kontrol grubu kıyaslandığında caspase 3/7 aktivasyonuyla meydana gelen apoptozis miktarları arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). 72 saat inkübasyon sonrası kontrol grubunda ölçülen caspase 3/7 aktivasyonu (apoptozis miktarı) % 3 ($\pm$1) olarak saptanmıştır. Wip1 ifadesi baskılanarak 72 saat etoposid ile muamele edilen grubun Caspase 3/7 aktivasyonunun % 8 ($\pm$2) oranında olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın meydana geldiği tespit edilmiştir ($p=0,095$; $p<0,05$). Öte yandan; Wip1 ifadesi baskılanarak 72 saat doxorubicin ile muamele edilen grubun Caspase 3/7 aktivasyonunun % 28 ($\pm$1) oranında olduğu ve kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($p=0,0014$; $p < 0,01$).

4.6.3. Wip1 ifadesi Baskılanmış Hücrelerde Hücre Siklusu Analizlerinin Değerlendirilmesi

siRNA oligoları ile Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri 72 saat etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile muamele edilmiş ve bu hücrelerde 'hücre döngüsü analizi' yapılarak sonuçlar yüzde ortalama olarak Şekil 28.'daki gibi grafik haline getirilmiştir.



Şekil 28. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü dağılımında meydana gelen değişimin % olarak gösterimi

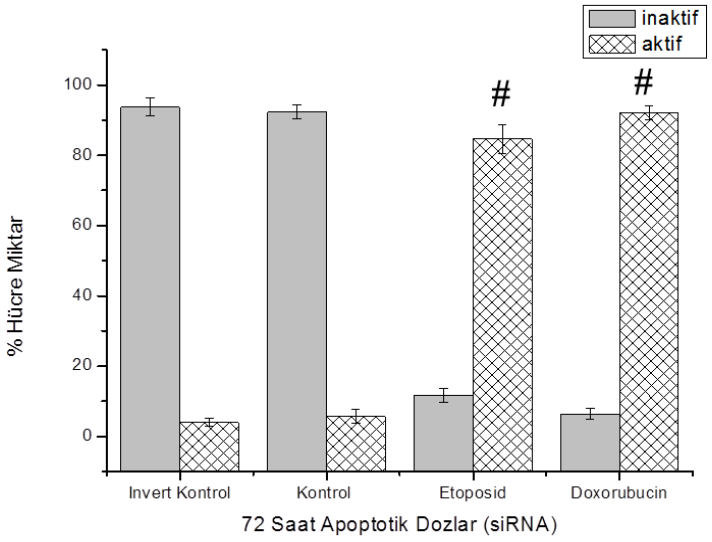
(*: Kontrol grubuna göre $p < 0,01$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir. †: Kontrol grubuna göre $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir. #: Kontrol grubuna göre $p < 0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 28.'da gösterildiği gibi Wip1 ifadesi baskılanmış kontrol grubu ile invert kontrol grubu arasında G0/G1, S ve G2/M fazlarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). G0/G1 fazı kontrol grubunda % 53 ($\pm$2) oranındayken bu oranın Wip1 ifadesi baskılanarak etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen gruplarda ise sırasıyla % 7 ($\pm$1) ve % 8 ($\pm$1) olduğu ve kontrole kıyasla oldukça azaldığı görülmektedir. Öte yandan S fazının; etoposid ile muamele edildiği grupta % 33 ($\pm$1) oranında olduğu ve kontrole kıyasla anlamlı

bir artışın meydana geldiği tespit edilmiştir (p=0,013; p < 0,05). Yine S fazı oranının doxorubicin ile muame edilen grupta % 45 (±2) olduğu ve kontrole göre meydana gelen artışın anlamlı olduğu saptanmıştır (p= 0,008; p < 0,01). G2/M fazına bakıldığında ise; etoposid ile muamele edilen grupta % 55 (±1) oranında tutuklanmanın olduğu ve kontrole göre anlamlı bir artışın meydana geldiği saptanmıştır ($p=8,2 \times 10^{-4}$; p < 0,001). Bununla birlikte % 44 (±4) oranında G2/M tutuklanmasının görüldüğü doxorubicin ile muamele edilen grupta da yine kontrole kıyasla anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (p=0,019; p<0,05).

4.6.4. Etoposid ve Doxorubicinin Apoptozisi İndükledikleri Dozlarla Muamele Edilen Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Değerlendirilmesi

Aktif γH2AX DNA hasarının önemli bir belirtecidir. Bu sebeple etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozlarının Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde DNA hasarına sebep olup olmadıklarını tespit etmek amacı ile Bölüm 3.2.6.9'da ifade edildiği gibi 'γH2AX analizi' gerçekleştirilmiş olup elde edilen veriler grafik halinde Şekil 29.'de sunulmuştur.



Şekil 29. 5µg/ml etopopsid ve 1µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi

(# : Kontrol grubuna göre p < 0,001'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 29.'de gösterildiği üzere elde edilen veriler sonucunda kontrol grubu ile invert kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücre gruplarının sırasıyla % 85 ($\pm$4) ve % 92 ($\pm$2) oranında γH2AX aktivasyonuna sahip oldukları saptanmıştır. Ölçülen bu değerler ise; % 6 ($\pm$2) oranında aktif γH2AX düzeyine sahip olan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdikleri tespit edilmiştir (anlamlı artış sırasıyla $p=5,2x10^{-4}$; $p < 0,001$).

4.7. siRNA Oligoları ile Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Senesensin Değerlendirilmesi

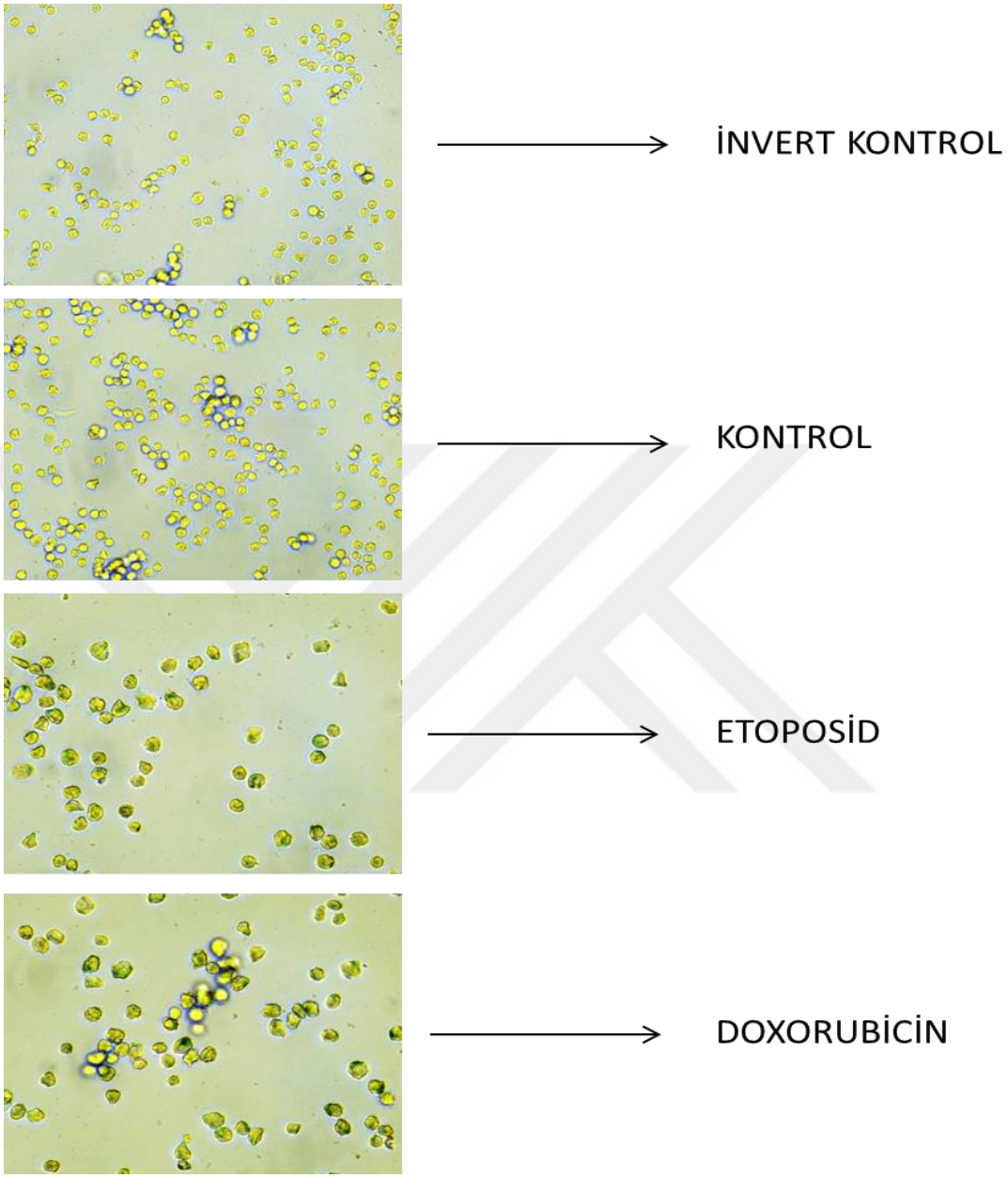
Lipofektamin aracılığıyla Wip1'i hedefleyen siRNA oligolarının transfekte edildiği böylece Wip1'in geçici olarak baskılandığı Jurkat hücreleri ile 1µg/ml etoposid ve 0,2µg/ml doxorubicin 72 saat muamele edilerek 'hücre siklusu testi' ve 'γH2AX analizleri' gerçekleştirilmiştir. Böylece azalan Wip1 ifadesinin Jurkat hücrelerinde senesensi etkileyip etkilemediği tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmalar için; hiçbir proteini hedef almayan siRNA oligolarının lipofektamin aracılığıyla Jurkat hücrelerine transfekte edildiği bir grup daha oluşturulmuş ve bu grup invert kontrol olarak kullanılmıştır.

4.7.1. Senesense Bağlı Olarak Artış Gösteren β-galaktozidaz Aktivitesi

Senesensin biyokimyasal bir karakteristiği olarak bilinen SA-β-gal (senescence associated β-galactosidase), β-galaktozidaz aktivitesinde görülen aşırı artışı ifade etmektedir. Biyokimyasal olarak bu aktiviteye sahip olan senesense uğramış hücreler mikroskopda bakıldığında normal hücrelere göre çok daha genişlemiş, granüler ve transparan bir görünüme sahip oldukları görülmektedir.

RNA interferansı yöntemi ile Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinin 72 saat etoposid (1µg/ml) ve doxorubicinin (0,2µg/ml) senesens dozları ile muamele edilmesinden sonra Bölüm 3.2.6.5.'de ifade edildiği gibi gerçekleştirilen SA-β-galaktozidaz boyama testi gerçekleştirilmiştir. Boyama sonrası senesense uğrayan hücrelerde SA-β-gal aktivitesi tespit edilmiştir. Şekil 30.'de görüldüğü üzere etoposid ve doxorubicin ile muamele edilerek

senesense uğramış olan hücre grupları kontrol grubuna göre daha genişlemiş ve mavi renkli görünüme sahiptir.

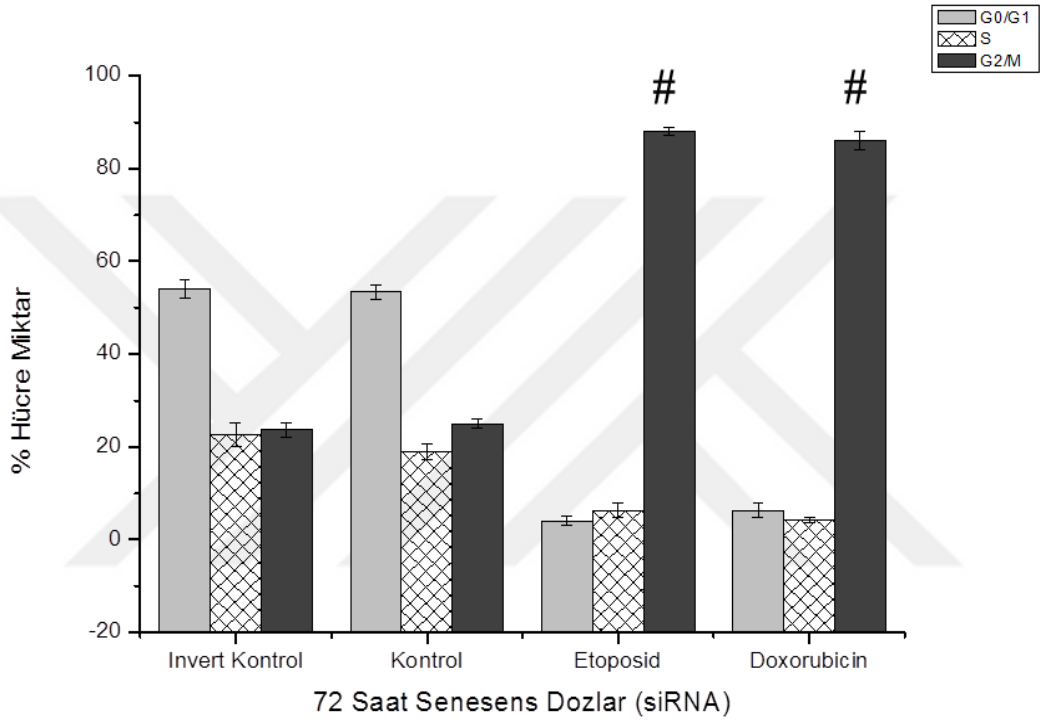


Şekil 30. 72 saat etoposid (1µg/ml) ve doxorubicin (0,2µg/ml) ile muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinin mikroskop altında SA-β-gal boyama görüntüleri

Analiz sonucunda; invert kontrol ile kontrol grubu hücrelerinde senesensin meydana gelmediği buna rağmen etoposid ile muamele edilen hücrelerde % 77 (±3) oranında ve doxorubicin ile muamele edilen hücrelerde ise % 80 (±2) oranında senesensin meydana geldiği tespit edilmiştir.

4.7.2. Wip1 ifadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Hücre Siklusu Analizlerinin Değerlendirilmesi

siRNA oligoları ile Wip1 ifadesi susturulmuş Jurkat hücreleri, etoposid ve doxorubicinin senesens dozları ile 72 saat muamele edilmiş ve bu hücrelerde 'hücre siklusu analizi' yapılarak sonuçlar yüzde ortalama olarak Şekil 31.'daki gibi grafik haline getirilmiştir.



Şekil 31. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü dağılımında meydana gelen değişimin % olarak gösterimi

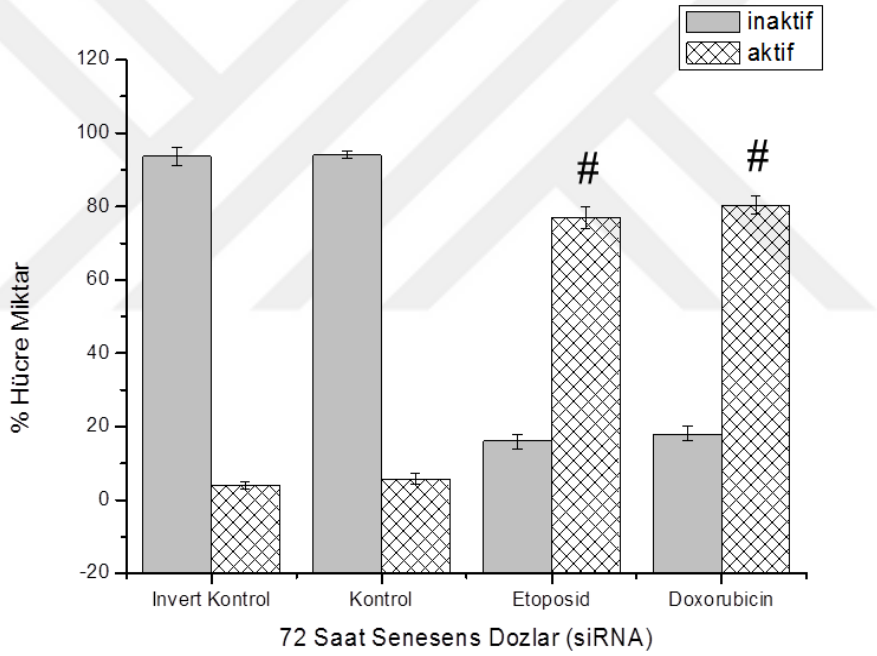
(#: Kontrol grubuna göre $p < 0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Elde edilen veriler sonucunda invert kontrol ile kontrol grubunun hücre dögüsü dağılımlarına bakıldığında aralarında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen grupların kontrol grubu ile kıyaslandığında G0/G1 ve S fazı oranlarında azalma meydana geldiği buna karşılık aynı gruplarda kontrole kıyasla G2/M fazında yüksek derecede bir artış meydana gelerek tutuklanmanın gerçekleştiği ise tespit edilmiştir. G2/M fazında etoposid ve doxorubicin ile muamele edilen

gruplarda meydana gelen tutuklanma miktarının sırasıyla % 88 (±1) ve % 86 (±2) oranlarında olduğu ve kontrole kıyasla bu artışların anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,001$).

4.7.3. Etoposid ve Doxorubicinin Senesensi İndükledikleri Dozlarla Muamele Edilen siRNA ile Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Değerlendirilmesi

Aktif γH2AX DNA hasarının önemli bir belirtecidir. Bu sebeple etoposid ve doxorubicinin senesens dozlarının Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde DNA hasarına sebep olup olmadıklarını tespit etmek amacı ile Bölüm 3.2.6.9'da ifade edildiği üzere 'γH2AX analizi' yapılmış elde edilen veriler grafik halinde Şekil 32.'da sunulmuştur.



Şekil 32. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin % olarak gösterimi

(# : Kontrol grubuna göre $p < 0,001$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

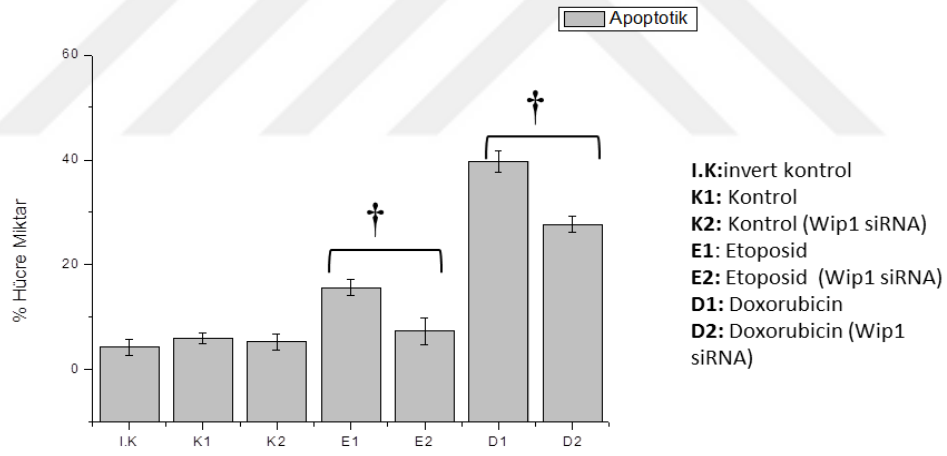
Şekil 32.'da gösterildiği üzere elde edilen veriler sonucunda kontrol grubu ile invert kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p=0,18$; $p > 0,05$). Etoposid ve doxorubicinin apoptotik dozları ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücre gruplarının

sırasıyla % 77 (±3) ve % 80 (±3) oranında γH2AX aktivasyonuna sahip oldukları saptanmıştır. Ölçülen bu değerlerin % 6 (±2) oranında aktif γH2AX düzeyine sahip olan kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (sırasıyla $p=1,74 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$ / $p=3,6 \times 10^{-4}$; $p < 0,001$).

4.8. Wip1'i Aşırı İfade Eden ve Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Apoptozis Analizlerinin Karşılaştırılması

4.8.1. Annexin V Testi Sonuçlarının Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi

Jurkat hücreleri ile siRNA oligoları transfekte edilerek Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri 5 µg/ml etoposid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilmiş ve bu hücrelerde 'AnnexinV analizi' yapılarak sonuçlar yüzde ortalama olarak Şekil 33.'de gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 33. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış normal Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptotik değişimin karşılaştırılması

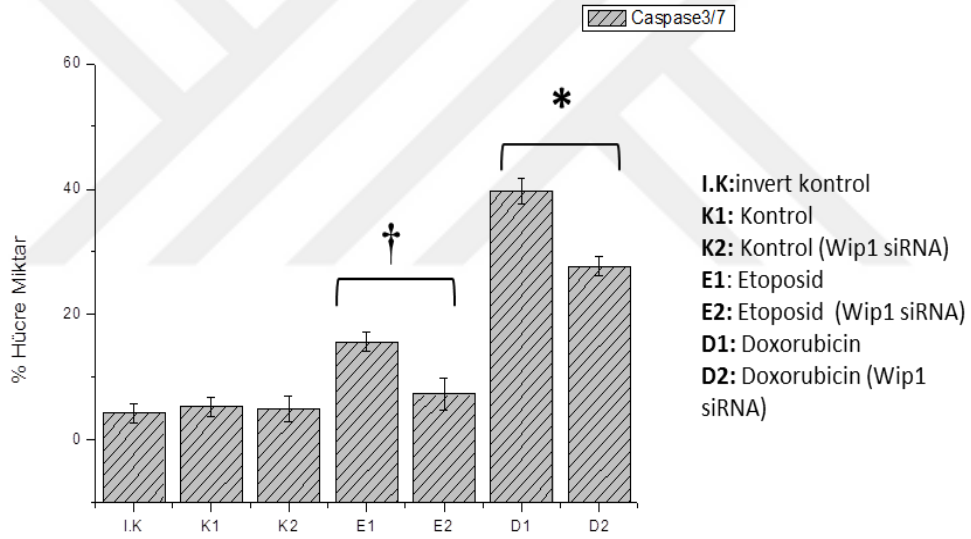
(†: Gruplar arasında $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Şekil 33.'de gösterildiği üzere 72 saatte siRNA ile Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat, invert kontrol ile transfekte edilmiş Jurkat ve Wip1'i aşırı ifade eden Jurkat hücrelerinin kontrol gruplarında tespit edilen apoptotik miktarlar arasında anlamlı bir fark olamadığı

saptanmıştır (p > 0,05). Bununla birlikte gerek etoposid gerekse doxorubicin ile muamele edilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Wip1'in baskılanmasının total apoptotik hücre miktarlarında azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Bu azalmanın etoposid ile muamele edilen gruplar arasında % 13 (p=0,02; p<0,05) oranında, doxorubicin ile muamele edilen gruplar arasında ise % 7 (p=0,076; p<0,05) oranında olduğu belirlenmiş ve bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

4.8.2. Caspase 3/7 Testi ile Apoptozisin Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi

Jurkat hücreleri ile siRNA oligoları transfekte edilerek Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri 5 µg/ml etoposid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilmiş ve bu hücrelerde 'Caspase 3/7 analizi' yapılarak sonuçlar yüzde ortalama olarak şekil 34.'de gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 34. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin Caspase 3/7 aktivasyonunda meydana gelen değişimin karşılaştırılması

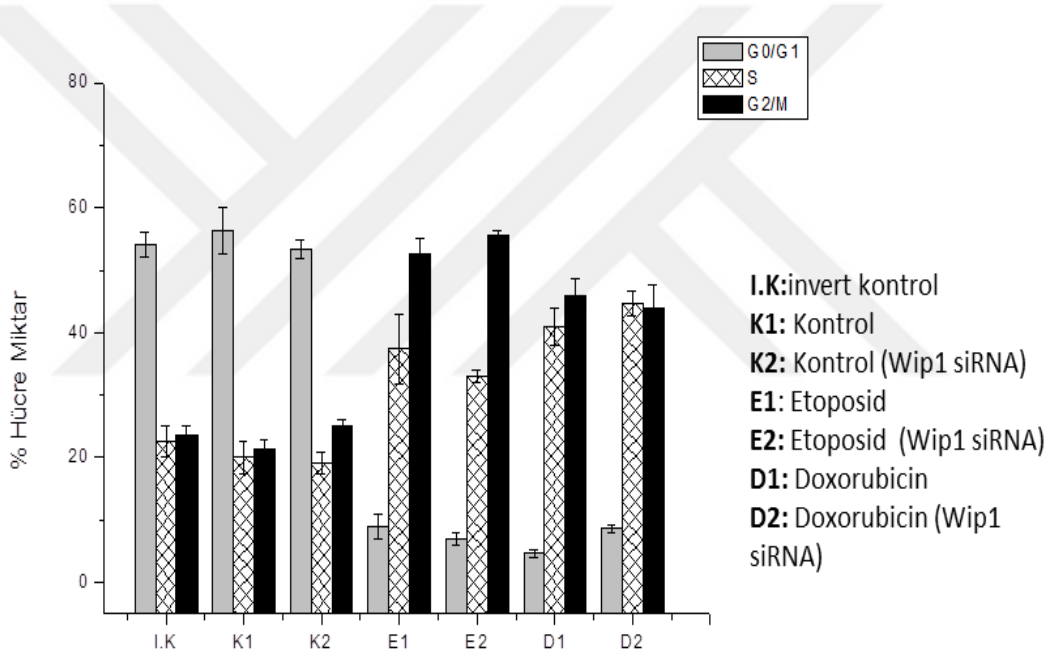
(*: Gruplar arasında p < 0,01'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir. †: Gruplar arasında p < 0,05'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Elde edilen veriler sonucunda etoposid ve doxorubicin ile muamle edilen gruplar kendi aralarında kıyaslandığında Wip1'in baskılanmasının 'Caspase 3/7' aktivasyonunda azalmaya sebep olduğu saptanmıştır. Bu azalma; Wip1'i aşırı ifade eden Jurkat hücreleri ile

Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri kıyaslandığında etoposid ile muamele edilen gruplar arasında % 9 oranında anlamlı bir azalmanın (p=0,046; p< 0,05) olduğu saptanmıştır. Doxorubicin ile muamele edilen gruplar arasında ise % 12 oranında anlamlı bir azalmanın meydana geldiği (p=0,0023; p < 0,01) tespit edilmiştir.

4.8.3. Hücre Döngüsü Analizlerinin Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi

Normal Jurkat hücreleri ile siRNA oligoları transfekte edilerek Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri 5 µg/ml etoposid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilmiş ve bu hücrelerde 'Hücre döngüsü analizi' yapılarak sonuçlar yüzde ortalama olarak Şekil 35.'de gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır.

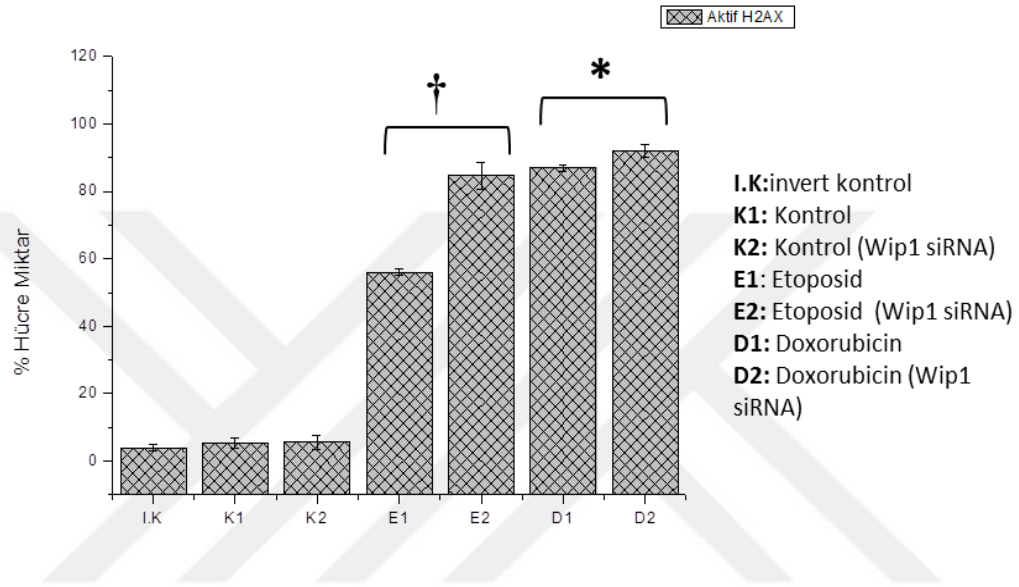


Şekil 35. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin hücre döngüsü dağılımında meydana gelen değişimin karşılaştırılması

Elde edilen veriler sonucunda Wip1'i aşırı ifade eden Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı birbiri ile kıyaslandığında ne etoposid ne de doxorubicin ile muamele edilen gruplar arasında G0/G1, S ve G2/M fazlarında anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (p > 0,05).

4.8.4. DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi

Normal Jurkat hücreleri ile siRNA oligoları transfekte edilerek Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri 5 µg/ml etoposid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilmiş ve bu hücrelerde 'γH2AX analizi' yapılarak sonuçlar yüzde ortalama olarak Şekil 36.'de gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 36. 5 µg/ml etopopsid ve 1 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin karşılaştırılması

(*: Gruplar arasında $p < 0,01$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir. †: Gruplar arasında $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

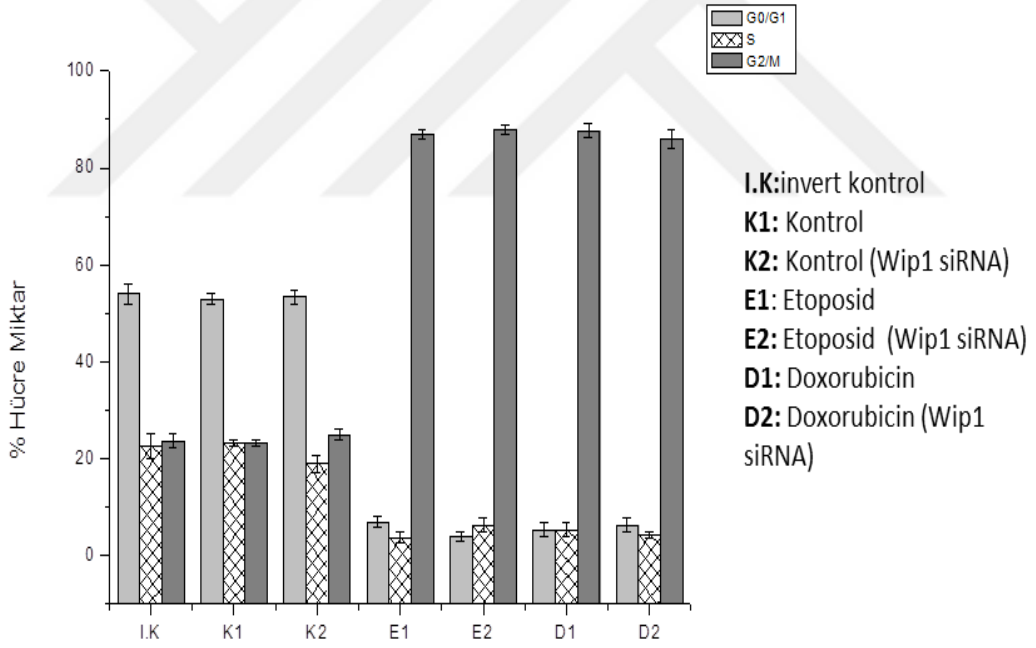
Elde edilen veriler sonucunda Wip1'i aşırı ifade eden Jurkat hücrelerine kıyasla Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde gerek etoposid ve gerekse doxorubicin ile muamle edilen gruplarda DNA hasarıyla meydana gelen γH2AX aktivasyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. Etoposid ile muamele edilen normal Jurkat hücrelerinde meydana gelen γH2AX miktarı % 56 ($\pm$1) oranındayken bu oran Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde % 84 ($\pm$4) oranında olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir artışın meydana geldiği saptanmıştır ($p=0,026$; $p < 0,05$). Benzer şekilde doxorubicin ile muamele edilen Wip1'i aşırı ifade eden Jurkat hücrelerinde % 87 ($\pm$1) oranında aktif γH2AX saptanmışken

bu oran Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde % 92 (±1) oranında olduğu ve Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücrelerine kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (p=0,007; p < 0,01).

4.9. Wip1'i Aşırı İfade Eden ve Wip1 İfadesi Baskılanmış Jurkat Hücrelerinde Senesens Analizlerinin Karşılaştırılması

4.9.1. Hücre Döngüsü Analizlerinin Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi

Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücreleri ile siRNA oligoları transfekte edilerek Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri 1 µg/ml etoposid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilmiş ve bu hücrelerde 'Hücre döngüsü analizi' yapılarak sonuçlar yüzde ortalama olarak Şekil 37.'de gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır.



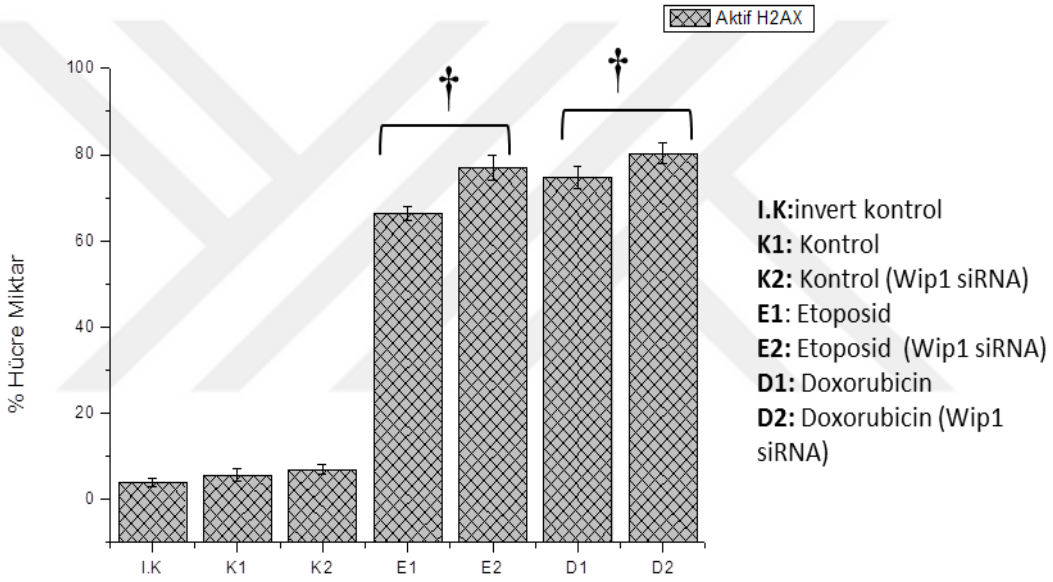
Şekil 37. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin hücre döngüsü dağılımında meydana gelen değişimin karşılaştırılması

Elde edilen veriler sonucunda normal Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı birbiri ile kıyaslandığında ne etoposid ne de

doxorubicin ile muamele edilenler arasında G0/G1, S ve G2/M fazlarında anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$).

4.9.2. DNA Hasarının γH2AX Analizi ile Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi

Normal Jurkat hücreleri ile siRNA oligoları transfekte edilerek Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri 1 µg/ml etoposid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilmiş ve bu hücrelerde 'γH2AX analizi' yapılarak sonuçlar yüzde ortalama olarak Şekil 38.'da gösterildiği gibi grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 38. 1 µg/ml etopopsid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmamış Jurkat hücrelerinin γH2AX aktivasyonunda meydana gelen değişimin karşılaştırılması

(†: Gruplar arasında $p < 0,05$'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

Elde edilen veriler sonucunda Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücrelerine kıyasla Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde gerek etoposid ve gerekse doxorubicinin senesens dozları ile muamle edilen gruplarda DNA hasarıyla meydana gelen γH2AX aktivasyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. Etoposid ile muamele edilen artmış Wip1 ifadeli Jurkat hücrelerinde meydana gelen γH2AX miktarı % 66 (± 2) oranındayken bu oran

Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde % 77 (±3) oranında olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir artışın meydana geldiği saptanmıştır ($p=0,015$; $p < 0,05$). Benzer şekilde doxorubicin ile muamele edilen Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücrelerinde % 74 (±3) oranında aktif γH2AX saptanmışken bu oran Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde % 80 (±2) oranında olduğu ve artmış Wip1'e sahip Jurkat hücrelerine kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0,003$; $p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

İnsan kanserlerinin yarıdan fazlasında p53'ün tümör süpresör fonksiyonunun kaybı meydana gelmekte ve böylece büyüme, genetik istikrar, hücre ölümü ve anti-kanser tedavisine duyarlılık gibi pekçok yolak bu durumdan etkilenmektedir (Qian and Chen, 2010; Goloudina ve ark, 2016). Bu tez çalışması ile akut lenfoblastik lösemide p53 negatif Jurkat hücre dizilerinde aşırı ifade edilen Wip1 fozfataz enziminin kemoterapi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında da kemoterapi ilaçlarından etoposit ve doxorubicine cevaben Wip1 fosfatazı aşırı ifade eden ve RNA interferansı ile Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinin DNA hasarı cevabı aktivasyonu ve bu hücrelerin apoptozis ve senesensi indükleme yetenekleri araştırılmıştır.

Çalışmada öncelikle 5µg/ml etoposidin ve 1µg/ml doxorubicinin 24 ve 72 saat inkübasyon sonrası Jurkat hücrelerinde meydana getirdiği metabolik aktivite değişimleri Wst-1 testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda etoposid ve doxorubicin ile ayrı ayrı muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla zaman artışına bağlı olarak metabolik aktivitede azalma olduğu tespit edilmiştir. Jurkat hücrelerinde metabolik aktivitede meydana gelen bu azalma hücre çoğalmasının olmadığına ve hücre ölümünün gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Ayrıca etoposid ve doxorubicinle 24 ve 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde meydana gelen apoptozisin zamana bağlı olarak artış gösterdiği'Annexin V' ve 'Caspase 3/7' analizleri sonucunda tespit edilmiştir. 'Annexin V' ve 'Caspase 3/7' analizleriyle elde edilen apoptozis verileri 'Wst-1' sonuçlarına göre zaman artışına paralel olarak meydana gelen metabolik aktivitede ki azalmayı destekler nitelikte olup benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu konu ile ililşkili olarak Sokolouskaya ve ark (2000) tarafından gerçekleştirilen bir çalışma da Jurkat hücreleri 0.1 µg/ml, 0.3 µg/ml, 0.5 µg/ml doxorubicin ve 1 µg/ml, 5 µg/ml etoposid ile 24 ve 48 saat muamele edilerek inkübasyon süreleri sonunda apoptozis miktarları karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler sonucu Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicine cevaben indüklenen apoptozis oranlarının doz ve zaman artışına bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Bununla birlikte Bonhoure ve ark (2005) gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada da; 1 µM doxorubicin ve 5 µM etoposid ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilen HL-60 akut miyeloid lösemi hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla zaman artışına bağlı olarak apoptozis oranlarında artış meydana geldiği saptanmıştır. Jurkat hücreleriyle bu tez çalışmasından elde edilen verilerin ise literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Ayrıca bu tez çalışmasının devamında Jurkat hücrelerinde siRNA oligolarıyla Wip1 ifadesi baskılanrak etoposid ve doxorubicinle 72 saat muamele edilmiş ve süre sonunda 'Annexin V' testiyle meydana gelen apoptozis miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Wip1 ifadesi artmış Jurkat hücrelerinden elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır. Jurkat hücrelerinde Wip1 ifadesinin baskılanmasının etoposid ve doxorubicine karşı duyarlılığı azalttığı yani apoptozis miktarlarında azalmanın olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte 'Annexin V' analiziyle elde edilen bulgular 'Caspase 3/7' analiz sonuçlarıyla da desteklenmiştir. Elde edilen bu bulgular literatürlede uyumludur. Konu ile ilişkili olarak yapılan çalışmalar şöyle özetlenebilir;

Goloudina ve ark. (2012a) gerçekleştirdikleri bir çalışmada; *wt*-p53'e sahip U2OS osteosarkoma hücreleri ile HCT116 kolon kanseri hücrelerinde Wip1 inhibisyonunun kemoterapötik bir ajan olan cisplatine duyarlılığı arttırdığı ancak p53-/- HCT116 hücre dizileri ile p53 negatif Saos-2 osteosarkomada ise Wip1 inhibisyonunun cisplatine olan duyarlılığı arttırmadığı saptanmıştır. Öte yandan U2OS ile Saos-2 hücreleri doksisiklinle muamele edilerek Wip1'in aşırı ifade edilmesi sağlanmış ve bu hücreler 48 saat cisplatin ile muamele edilmiştir. Süre sonunda Wip1'in aşırı ekspresyonunun *wt-p*53'e sahip U2OS hücrelerinde cisplatine direnç oluşturarak apoptozisi azalttığı, Saos-2 hücrelerinde ise cisplatine duyarlılığı arttırarak apoptozis oranında artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte sadece Saos-2 hücrelerinde aynı çalışma farklı anti kanser ilaçları kullanılarak da gerçekleştirilmiştir. Etoposid, 5-fluorourasil ve camptotherin ilaçlarının ayrı ayrı kullanıldığı çalışma sonuçlarının ise cisplatin ile parelellik gösterdiği saptanmış böylece Wip1'in aşırı ifadesinin p53 negatif hücrelerde sadece cisplatine değil diğer kemoterapi ilaçlarına karşı da duyarlılığı arttırarak apoptozis artışına sebep olduğu bildirilmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada ise, *wt*-p53'e sahip IMR-32, NGP, NB-19,CHLA-255, SH-SY5Y ve LA-N-6 hücreleri ile p53 mutant SK-N-AS hücresi olmak üzere toplamda 7 nöroblastoma hücre hattında GSK2830371 aracılığıyla Wip1 ifadesi baskılanmıştır. Sonuç olarak *wt*-p53'e sahip hücre dizilerinde apoptozisin arttığı ancak p53 mutant SK-N-AS hücre dizilerinde ise bu artışın gerçekleşmediği saptanmıştır. Çalışmanın devamında ise; yine GSK2830371 ile Wip1 ifadesinin baskılandığı p53 mutant SK-N-AS hücreleri etoposid ve doxorubicinle muamele edilmiş ancak etoposid ve doxorubicinin bu hücrelerde apoptozis artışını indüklemediği tespit edilmiştir (Chen ve ark, 2016).

Wip1'in aşırı ifade edilerek onkogen özelliği kazandığı tümör hücrelerinin çoğunda p53 geni wild-type'dır (Xia ve ark, 2017). p53'ün fonksiyonel olarak pozitif olduğu tümörlerde Wip1'in hedeflenerek baskılanması kemoterapiye olan duyarlılığı arttırmakta ve

apoptozisi teşvik etmektedir (Pechackova ve ark, 2017). Hem bizim hem de diğerlerinin gerçekleştirmiş olduğu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde ise; p53 negatif tümörlerde Wip1'in aşırı ifadesinin *wt*-p53 barındıran tümörlerdekinden farklı bir işleve sahip olduğu ve p53'ün işlevsiz olduğu bu tümörlerde Wip1 inhibisyonunun apoptozisi arttırmadığı görülmektedir. Bu durum Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde DNA tamir mekanizmasının aktive olduğunu düşündürmektedir. Çünkü Wip1 DNA tamir mekanizmasında görev alan önemli proteinlerin ifadesini baskılamakta ve DNA tamirini inhebe edebilmektedir. Bir diğer ihtimal ise; Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde apoptozis miktarında ki azalmanın Goloudina ve ark (2012a.)'nın Saos2 hücrelerinde gerçekleştirdiği çalışmaya benzer şekilde meydana gelebileceği yönündedir. Goloudina ve ark (2012a.) gerçekleştirdiği çalışmayla; Wip1 ifadesinin baskılanmasının Saos2 hücrelerinde NF-κB aktivasyonunu arttırdığı ve artan NF-κB'nin Bcl_{XL} artışını indükleyerek Bax'ı inhibe ettiği böylece Bax/Bcl_{XL} oranının azalarak apoptozis miktarında azalma meydana geldiği kanıtlanmıştır.

Etoposid ve doxorubicine cevaben apoptozisin indüklendiği Jurkat hücrelerinde Wip1'in hücre döngüsü üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla 'Hücre Döngüsü' analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücrelerinden elde edilen 'Hücre döngüsü ' analizleri sonucu ilaçla muamele edilen grupların kontrol grubuna kıyasla S ve G2/M fazlarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Wip1 ifadesinin baskılandığı Jurkat hücrelerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Wip1'in aşırı ifade edildiği ve baskılandığı hücrelerden elde edilen analiz sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Böylece Wip1 ifadesinin p53 negatif Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır.

Wip1'in hücre döngüsü üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan birinde *wt*-NPC sinir kökü/öncü hücreleri ile Wip1 knock-out (KO) NPC hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı karşılaştırılmış ve Wip1-KO-NPC hücrelerinin daha yüksek G2/M oranına sahip olduğunu tespit edilmiştir. Böylece Wip1'in NPC hücrelerinde hücre döngüsü üzerinde etkili olduğunu gösterilmiştir. Çalışmanın devamında ise p53-KO-NPC ile Wip1/p53-KO-NPC (p53 ve Wip1 knock-out) hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı karşılaştırılmış ve aralarında farklılık olmadığı saptanmıştır. Böylece Wip1'in p53 pozitif NPC hücrelerinde hücre döngüsü üzerinde etkili olduğunu ancak p53 negatif NPC hücrelerinde ise Wip1'in hücre döngüsü üzerine etki etmediği belirlenmiştir (Zhu ve ark, 2009).

Wip1'in hücre döngüsü üzerine etkilernin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, p53-KO-MCF7 ve p21-KO-MCF7 hücreleri GSK2830371 ile muamele ederek Wip1'i inhibe

edilmiş ve bu hücrelerde Wip1'in hücre döngüsü üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır. Böylece Wip1'in hücre döngüsü dağılımı üzerindeki etkisinin p53/p21'e bağlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir (Pechackova ve ark, 2016).

Tüm bu veriler doğrultusunda bu çalışmada Jurkat hücrelerinde gerçekleştirilen 'hücre döngüsü analiz' sonuçlarının literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hem bu tez çalışmasından elde edilen veriler hem de diğerlerinin elde ettiği veriler p53 negatif hücrelerde Wip1'in hücre döngüsü dağılımı üzerinde etkili olmadığını göstermektedir.

Wip1'in DDR üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için bu çalışmada 'Western Blot' analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinle indüklenen gruplarda apoptozis ve senesens sırasında DDR'de rol oynayan ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerinin total formlarının ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla herhangi bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Bu durum beklenen sonuçlarla uyumludur. γH2AX fosforilasyonu DDR'nin önemli bir belirtecidir. DNA'da özellikle çift zincir kırıklarıyla meydana gelen hasarlar sonucu γH2AX fosforillenerek aktive olur ve böylece DDR faktörlerinin hasarlı bölgeye gitmesini teşvik ederek DDR'yi başlatır (V. Clausse et al., 2016). Bu tez çalışmasında Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinle indüklenen apoptozis ve senesens sırasında kontrol grubuna kıyasla γH2AX düzeyinde artış olduğu 'W. B.' analizlerinde tespit edilmiştir. Bu durum ise etoposid ve doxorubicinin apoptozis ve senesensi indükledikleri dozların Jurkat hücrelerinde DNA çift zincir kırıklarını meydana getirdiklerini ve bu hücrelerde DNA hasarının algılandığını göstermektedir. Ancak DNA hasarının algılanmasına rağmen bu hücrelerde W.B. analizleriyle elde edilen sonuçlara göre DDR'de yer alan ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerin fosforilasyon düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla artış olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar bu durumun Jurkat hücrelerinde aşırı artmış Wip1 ifadesinden kaynaklanabileceğine işaret etmektedir. Literatürden de bilindiği üzere DDR'nin en önemli elemanlarından olan ATM, ATR, Chk1 ve Chk2'nin fosforile formları Wip1'in hedef proteinleri arasında yer almakta ve Wip1 tarafından defosforile edilerek DDR'nin baskılanmasına yol açmaktadır. Wip1'in aşırı ifade edildiği ve Wip1'in baskılandığı Jurkat hücrelerinde gerçekleştirilen WB analizleri karşılaştırıldığında ATM, ATR, Chk1, Chk2 proteinlerinin total formlarının eşit düzeyde ifade edildiği ancak aktif olan fosforile formlarının ise Wip1 ifadesi baskılanmış hücrelerde arttış gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum Wip1 ifadesi artmış Jurkat hücrelerinde bu proteinlerin fosforilasyonlarının Wip1 tarafından baskılandığına işaret etmektedir.

DNA hasarı oluşturan ajanlarla veya radyoterapi ile indüklenen senesens; kemoterapiye yanıt olarak apoptozisin yanında bir diğer önemli hücresel cevap olarak yerini almaktadır (Kilic Eren ve Tabor, 2014). Senesensin önemli belirteçlerinden biri olan SA-β galaktozidaz aktivitesinin kemoterapötik ilaç muamelesi sonrası özellikle solid tümörlerde p53'ün varlığına bağlı olarak artış gösterdiği bilinmektedir. Chang ve ark (1999) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 6'sı p53 mutant, 6'sı ise p53 wild-type olan toplamda 12 tümör hücresi orta dozda doxorubicin (30nM) ile muamele edilmiş ve bu hücrelerde SA-β-gal aktivite testi gerçekleştirilmiştir. Elde ettikleri veriler sonucunda *wt*-p53'e sahip olan tümör hücrelerinin tamamında, p53 mutant hücrelerin ise sadece 3'ünde senesensin meydana geldiği saptanmıştır. Bu durum senesensin sadece p53'e bağlı olarak gerçekleşmediğini ve p53'ten bağımsız bir mekanizmayla da senesensin indüklenebileceğini göstermektedir (Chang ve ark, 1999).

Hücresel senesensin bir biyobelirteci olarak değerlendirilen γH2AX aktivasyonunun artışı, DDR'ye yanıt olarak hücresel senesensin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Nüklear DNA hasarının birikimi γH2AX'in aktivasyonunu uyararak hücresel senesensin başlamasını tetikler. Bununla birlikte Wip1 gen kaybı γH2AX aktivasyonunu arttırarak hem prematüre senesensi hemde endojen DDR sinyallemesini teşvik etmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda He ve ark (2016) gerçekleştirdiği bir çalışma da; orta derecede stres uygulanan Wip1-KO farelerin hipokampus hücrelerinde kontrol grubu farelere kıyasla γH2AX aktivasyonunun ve hücresel senesensin arttığı 'Western Blot' analizi ve 'SA-β-gal boyamaları' ile tespit edilmiştir. Böylece fare hipokampusunda Wip1 eksikliğinin γH2AX fosforilasyonunun artışına sebep olarak hücresel senesensin tetiklendiği bildirilmiştir (He ve ark, 2016).

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilmiş olan hem 'Western Blot' hem de 'γH2AX' analizleri sonucunda Wip1 ifadesinin baskılanmasının Jurkat hücrelerinde γH2AX seviyesinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca; p53 negatif Jurkat hücrelerini 72 saat 1 µg/ml etoposid ve 0.2 µg/ml doxorubicin ile muamele edilerek SA-β-gal boyama testi gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler sonucu hem Wip1'in aşırı ifade edildiği hem de Wip1'in baskılandığı Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicin indüklü senesensin gerçekleştiği saptanmıştır. Bununla birlikte Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde meydana gelen senesens miktarının Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücrelerine kıyasla daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. Literatür ve bu çalışmadan elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde bu durumun Wip1'in baskılanması sonucu γH2AX seviyesinde meydana gelen artışa bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Bununla birlikte p53'den

bağımsız olarak senesensin gerçekleştiği $p16^{INK4A}$ –Rb yolağında rol oynayan $p16^{INK4A}$ proteini de Wip1'in fonksiyonel hedeflerinden biridir (Wip1 bu proteinin ifadesini baskılamktadır). Bu sebeple Wip1'in baskılandığı Jurkat hücrelerinde bu yolağın aktivasyonunda artış meydana gelerek bu hücrelerde senesensin indüklenmiş olabileceği de ihtimaller arasındadır.

Etoposid ve doxorubicinle apoptozisin indüklendiği Jurkat hücrelerinde Wip1'in hücre döngüsü dağılımında etkili olmadığı daha önce belirtilmişti. 'Hücre Döngüsü' analizi benzer şekilde etoposid ve doxorubicine cevaben 72 saatte meydana gelen senesens çalışmaları sonrasında da gerçekleştirilmiş ve yine Wip1'in p53 negatif Jurkat hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir.

Kemoterapi ilaçları hücrenin hayatta kalma sinyallerini inhibe ederek hücre döngüsü tutuklanmalarını indükleyebilmektedirler (Suppipat ve ark, 2012). Bu çalışmada hem apoptozis hem de senesens çalışmaları sonrasında gerçekleştirilen 'Hücre Döngüsü' analizleri sonucu; ilaçla muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla G2/M fazında artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Wip1 ifadesi baskılanmış hücrelerde de benzer sonuçlar elde edilmiş olup meydana gelen bu değişimin çalışmalarda kullanılan kemoterapi ilaçlarının Jurkat hücreleri üzerinde ki etkisinden kaynaklanabileceğine işaret etmektedir. Bu konu ile ilişkili olarak gerçekleştirilen çalışmalardan bazıları şöyle özetlenebilir;

Aytac ve ark (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada Jurkat hücre dizileri 24 saat 0,25-0,5 µM dozlarda etoposid ve 0,10-0,25 µM dozlarda da doxorubicin ile muaumele edilmiş süre sonunda ise kontrole kıyasla G2/M faz tutuklanmalarında artış olduğu saptanmıştır (U. Aytac et al., 2003). Bununla birlikte başka bir çalışmada; 24, 48 ve 72 saat 2,1 ($\pm$0,2) µg/ml, 1,8 ($\pm$0,5) µg/ml ve 1,5 ($\pm$0,3) µg/ml dozlarda doxorubicin ile muamele edilen Jurkat hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla artmış G2/M tutuklanmasının gerçekleştiği tespit edilmiştir (Rahman ve ark, 2014). Ayrıca farklı kemoterapi ilaçları ile muame edilen Jurkat hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bununla iligili olarak Suppipat ve ark (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada; 7,5 µM sulforaphane ile 24 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde yine artmış G2/M tutuklanması olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde farklı dozlarda zerumbone ile muamele edilen Jurkat hücrelerinde yine G2/M artışı olduğunu saptanmıştır (Rahman ve ark, 2014). Öte yandan HL-60 insan lösemi hücrelerinin 72 saat 0,5-5-10 µM dozlarda doxorubicin ve 0,2-2-20 µM dozlarda etoposid ile muamele edildiği bir çalışma sonucunda da HL-60 hücrelerinde etoposid ve doxorubicin indüklü G2/M fazında artış olduğu

saptanmıştır (Zuryn ve ark, 2007). Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu çalışma ile elde edilen verilerin literatür ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada aşırı artmış Wip1 ifadesinin p53 negatif Jurkat hücre dizilerinde tümör süpresör bir bariyer olan DDR ve kemoterapi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Sonuç olarak;

1) Jurkat hücrelerinde etoposid ve doxorubicinin 72 saatte doz artışına bağlı olarak metabolik aktiviteyi azalttığı Wst-1 testi ile tespit edilmiştir.

2) 5µg/ml etoposid ve 1µg/ml doxorubicin ile muamele edilen Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücrelerinde 24 ve 72 saatte apoptozisin indüklendiği ve zaman artışına bağlı olarak apoptozis miktarında artış olduğu saptanmıştır. Öte yandan p53 negatif Jurkat hücrelerinde Wip1'in baskılanmasının kemoterapiye direnç oluşturarak apoptozis miktarında azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir.

3) p53 negatif Jurkat hücrelerinde Wip1'in hücre döngüsü üzerinde etkisiz olduğu saptanmıştır.

4) Etoposid ve doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Jurkat hücrelerinde Wip1'in baskılanmasının apoptozis ve senesens sırasında γH2AX seviyesinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir.

5) 1µg/ml etoposid ve 0,2 µg/ml doxorubicin ile 72 saat muamele edilen Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücreleri ile Wip1 ifadesi baskılanmış Jurkat hücrelerinde senesensin meydana geldiği SA-β galaktozidaz aktivite testi ile tespit edilmiştir. Wip1 ifadesinin baskılanmasının ise senesens indüksiyonunu arttırdığı saptanmıştır.

6) Wip1'in aşırı ifade edildiği Jurkat hücrelerinde apoptozis ve senesens çalışmaları sonrası DDR'de rol oynayan ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 proteinlerinin total ve fosforile formlarının ifade düzeylerinde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bununla birlikte γH2AX proteininde artış olduğu belirlenmiştir. Wip1'in baskılanmasının ise ATM, ATR, Chk1 ve Chk2 fosforilasyonunda artışa sebep olduğu saptanmıştır.

p53-/- tümörlerde Wip1 ifadesindeki değişimin kemoterapi üzerine etkilerinin ne olduğu ve hangi mekanizmalarla bu etkilerin açığa çıktığına dair yapılan birkaç çalışmadan başka kapsamlı çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma hematolojik kanserlerde Wip1'in kemoterapiye cevaben *wt*-p53'e sahip tümörlerden farklı olarak p53 negatif tümörlerde apoptozise duyarlılığı arttırdığını göstermesi bakımından oldukça önemlidir. Ayrıca gelecekte Wip1'i hedefleyecek kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesi sırasında mutant p53' e sahip tümörlerde bu durumun dikkatli değerlendirilmesi gerektiği konusunda önemli

bir veri sağlaması açısından dikkat çekici bir çalışmadır. p53'ün işlevsel olduğu tümörlerin aksine p53 negatif tümörlerde Wip1 ifadesindeki artışın hangi mekanizmaları etkileyerek ilaça duyarlılığı arttırmakta olduğu ilerde kapsamlı araştırmalarla aydınlatılmayı bekleyen konulardan biridir.

KAYNAKLAR

Ashton, N. W.; N. Paquet; S. L. Shirran; E. Bolderson; R. Kariawasam; C. Touma; A. Fallahbaghery; R. Gamsjaeger; L. Cubeddu; C. Botting, et al. "Hssb1 Phosphorylation Is Dynamically Regulated by DNA-Pk and Ppp-Family Protein Phosphatases." *DNA Repair (Amst)* 2017, 54, 30-39.

Aytac, U.; K. Sato; T. Yamochi; T. Yamochi; K. Ohnuma; G. B. Mills; C. Morimoto and N. H. Dang. "Effect of Cd26/Dipeptidyl Peptidase Iv on Jurkat Sensitivity to G2/M Arrest Induced by Topoisomerase Ii Inhibitors." *Br J Cancer* 2003, 88(3), 455-62.

Bartek, J. and J. Lukas. "Chk1 and Chk2 Kinases in Checkpoint Control and Cancer." *Cancer Cell* 2003, 3(5), 421-9.

Bartkova, J.; N. Rezaei; M. Liontos; P. Karakaidos; D. Kletsas; N. Issaeva; L. V. Vassiliou; E. Kolettas; K. Niforou; V. C. Zoumpourlis, et al. "Oncogene-Induced Senescence Is Part of the Tumorigenesis Barrier Imposed by DNA Damage Checkpoints." *Nature* 2006, 444(7119), 633-7.

Bhattacharjee, S. and S. Nandi. "DNA Damage Response and Cancer Therapeutics through the Lens of the Fanconi Anemia DNA Repair Pathway." *Cell Commun Signal* 2017, 15(1), 41.

Blackford, A. N. and S. P. Jackson. "Atm, Atr, and DNA-Pk: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response." *Mol Cell* 2017, 66(6), 801-17.

Boutter, J.; Y. Huang; B. Marovca; A. Vonderheit; M. A. Grotzer; C. Eckert; G. Cario; B. Wollscheid; P. Horvath; B. C. Bornhauser, et al. "Image-Based Rna Interference Screening Reveals an Individual Dependence of Acute Lymphoblastic Leukemia on Stromal Cysteine Support." *Oncotarget* 2014, 5(22), 11501-12.

Broustas, C. G. and H. B. Lieberman. "DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis." *Radiat Res* 2014, 181(2), 111-30.

Bulavin, D. V.; O. N. Demidov; S. Saito; P. Kauraniemi; C. Phillips; S. A. Amundson; C. Ambrosino; G. Sauter; A. R. Nebreda; C. W. Anderson, et al. "Amplification of Ppm1d in Human Tumors Abrogates P53 Tumor-Suppressor Activity." *Nat Genet* 2002, 31(2), 210-5.

Bulavin, D. V.; C. Phillips; B. Nannenga; O. Timofeev; L. A. Donehower; C. W. Anderson; E. Appella and A. J. Fornace, Jr. "Inactivation of the Wip1 Phosphatase Inhibits Mammary Tumorigenesis through P38 Mapk-Mediated Activation of the P16(Ink4a)-P19(Arf) Pathway." *Nat Genet* 2004, 36(4), 343-50.

Cadet, J. and K. J. A. Davies. "Oxidative DNA Damage & Repair: An Introduction." *Free Radic Biol Med* 2017, 107, 2-12.

Caldecott, K. W. "The Yin and Yang of Daxx Regulation." *Cell Cycle* 2015, 14(3), 295-6.

Cartwright, T.; N. D. Perkins and L. Wilson C. "Nfkb1: A Suppressor of Inflammation, Ageing and Cancer." *FEBS J* 2016, 283(10), 1812-22.

Ceccaldi, R.; B. Rondinelli and A. D. D'Andrea. "Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break." *Trends Cell Biol* 2016, 26(1), 52-64.

Cha, H.; J. M. Lowe; H. Li; J. S. Lee; G. I. Belova; D. V. Bulavin and A. J. Fornace, Jr. "Wip1 Directly Dephosphorylates Gamma-H2ax and Attenuates the DNA Damage Response." *Cancer Res* 2010, 70(10), 4112-22.

Chang, B. D.; E. V. Broude; M. Dokmanovic; H. Zhu; A. Ruth; Y. Xuan; E. S. Kandel; E. Lausch; K. Christov and I. B. Roninson. "A Senescence-Like Phenotype Distinguishes Tumor Cells That Undergo Terminal Proliferation Arrest after Exposure to Anticancer Agents." *Cancer Res* 1999, 59(15), 3761-7.

Chao, M. P. "Treatment Challenges in the Management of Relapsed or Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma - Novel and Emerging Therapies." *Cancer Manag Res* 2013, 5, 251-69.

Chen, Z.; L. Wang; D. Yao; T. Yang; W. M. Cao; J. Dou; J. C. Pang; S. Guan; H. Zhang; Y. Yu, et al. "Wip1 Inhibitor Gsk2830371 Inhibits Neuroblastoma Growth by Inducing Chk2/P53-Mediated Apoptosis." *Sci Rep* 2016, 6, 38011.

Cheng, C.; L. M. Li; P. Alves and M. Gerstein. "Systematic Identification of Transcription Factors Associated with Patient Survival in Cancers." *BMC Genomics* 2009, 10, 225.

Chew, J.; S. Biswas; S. Shreeram; M. Humaidi; E. T. Wong; M. K. Dhillion; H. Teo; A. Hazra; C. C. Fang; E. Lopez-Collazo, et al. "Wip1 Phosphatase Is a Negative Regulator of Nf-Kappab Signalling." *Nat Cell Biol* 2009, 11(5), 659-66.

Chock, K.; J. M. Allison and W. M. Elshamy. "Brca1-Iris Overexpression Abrogates Uv-Induced P38mapk/P53 and Promotes Proliferation of Damaged Cells." *Oncogene* 2010, 29(38), 5274-85.

Choi, J.; B. Nannenga; O. N. Demidov; D. V. Bulavin; A. Cooney; C. Brayton; Y. Zhang; I. N. Mbawuike; A. Bradley; E. Appella, et al. "Mice Deficient for the Wild-Type P53-Induced Phosphatase Gene (Wip1) Exhibit Defects in Reproductive Organs, Immune Function, and Cell Cycle Control." *Mol Cell Biol* 2002, 22(4), 1094-105.

Clausse, V.; A. R. Goloudina; B. Uyanik; E. Y. Kochetkova; S. Richaud; O. A. Fedorova; A. Hammann; M. Bardou; N. A. Barlev; C. Garrido, et al. "Wee1 Inhibition Potentiates Wip1-Dependent P53-Negative Tumor Cell Death During Chemotherapy." *Cell Death Dis* 2016, 7, e2195.

Crescenzi, E.; Z. Raia; F. Pacifico; S. Mellone; F. Moscato; G. Palumbo and A. Leonardi. "Down-Regulation of Wild-Type P53-Induced Phosphatase 1 (Wip1) Plays a Critical Role in Regulating Several P53-Dependent Functions in Premature Senescent Tumor Cells." *J Biol Chem* 2013, 288(23), 16212-24.

Dayaram, T.; F. J. Lemoine; L. A. Donehower and S. J. Marriott. "Activation of Wip1 Phosphatase by Htlv-1 Tax Mitigates the Cellular Response to DNA Damage." *PLoS One* 2013, 8(2), e55989.

Di Benedetto, A.; C. Ercolani; M. Mottolese; F. Sperati; L. Pizzuti; P. Vici; I. Terrenato; A. M. Shaaban; M. P. Humphries; L. Di Lauro, et al. "Analysis of the Atr-Chk1 and Atm-Chk2 Pathways in Male Breast Cancer Revealed the Prognostic Significance of Atr Expression." *Sci Rep* 2017, 7(1), 8078.

Elias, J.; L. Dimitrio; J. Clairambault and R. Natalini. "The P53 Protein and Its Molecular Network: Modelling a Missing Link between DNA Damage and Cell Fate." *Biochim Biophys Acta* 2014, 1844(1 Pt B), 232-47.

Emelyanov, A. and D. V. Bulavin. "Wip1 Phosphatase in Breast Cancer." *Oncogene* 2015, 34(34), 4429-38.

Feng, Y.; F. Liu; Z. Du; D. Zhao; J. Cheng and W. Guo. "Wip1 Regulates Skov3 Cell Apoptosis through the P38 Mapk Signaling Pathway." *Mol Med Rep* 2017, 15(6), 3651-57.

Ferbeyre, G.; E. de Stanchina; E. Querido; N. Baptiste; C. Prives and S. W. Lowe. "Pml Is Induced by Oncogenic Ras and Promotes Premature Senescence." *Genes Dev* 2000, 14(16), 2015-27.

Fiscella, M.; H. Zhang; S. Fan; K. Sakaguchi; S. Shen; W. E. Mercer; G. F. Vande Woude; P. M. O'Connor and E. Appella. "Wip1, a Novel Human Protein Phosphatase That Is Induced in Response to Ionizing Radiation in a P53-Dependent Manner." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(12), 6048-53.

Fortune, J. M. and N. Osheroff. "Topoisomerase Ii as a Target for Anticancer Drugs: When Enzymes Stop Being Nice." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000, 64, 221-53.

Freire, R. "Wip1 Regulation: Who Controls a Reset Button?" *Cell Cycle* 2013, 12(3), 390.

Gillet, N.; A. Carpentier; P. Y. Barez and L. Willems. "Wip1 Deficiency Inhibits Htlv-1 Tax Oncogenesis: Novel Therapeutic Prospects for Treatment of Atl?" *Retrovirology* 2012., 9, 115.

Gilmartin, A. G.; T. H. Faitg; M. Richter; A. Groy; M. A. Seefeld; M. G. Darcy; X. Peng; K. Federowicz; J. Yang; S. Y. Zhang, et al. "Allosteric Wip1 Phosphatase Inhibition through Flap-Subdomain Interaction." *Nat Chem Biol* 2014, 10(3), 181-7.

Gohler, T.; S. Sabbioneda; C. M. Green and A. R. Lehmann. "Atr-Mediated Phosphorylation of DNA Polymerase Eta Is Needed for Efficient Recovery from Uv Damage." *J Cell Biol* 2011, 192(2), 219-27.

Goloudina, A. R.; E. Y. Kochetkova; T. V. Pospelova and O. N. Demidov. "Wip1 Phosphatase: Between P53 and Mapk Kinases Pathways." *Oncotarget* 2016, 7(21), 31563-71.

Goloudina, A. R.; S. J. Mazur; E. Appella; C. Garrido and O. N. Demidov. "Wip1 Sensitizes P53-Negative Tumors to Apoptosis by Regulating the Bax/Bcl-Xl Ratio." *Cell Cycle* 2012a, 11(10), 1883-7.

Goloudina, A. R.; K. Tanoue; A. Hammann; E. Fourmaux; X. Le Guezennec; D. V. Bulavin; S. J. Mazur; E. Appella; C. Garrido and O. N. Demidov. "Wip1 Promotes Runx2-Dependent Apoptosis in P53-Negative Tumors and Protects Normal Tissues During Treatment with Anticancer Agents." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012b, 109(2), E68-75.

Han, E. H.; H. G. Kim; Y. P. Hwang; G. Y. Song and H. G. Jeong. "Prostaglandin E2 Induces Cyp1b1 Expression Via Ligand-Independent Activation of the Eralpha Pathway in Human Breast Cancer Cells." *Toxicol Sci* 2010, 114(2), 204-16.

Hartlerode, A. J. and R. Scully. "Mechanisms of Double-Strand Break Repair in Somatic Mammalian Cells." *Biochem J* 2009, 423(2), 157-68.

He, Z. Y.; W. Y. Wang; W. Y. Hu; L. Yang; Y. Li; W. Y. Zhang; Y. S. Yang; S. C. Liu; F. L. Zhang; R. Mei, et al. "Gamma-H2ax Upregulation Caused by Wip1 Deficiency Increases Depression-Related Cellular Senescence in Hippocampus." *Sci Rep* 2016, 6, 34558.

Hershko, T.; K. Korotayev; S. Polager and D. Ginsberg. "E2f1 Modulates P38 Mapk Phosphorylation Via Transcriptional Regulation of Ask1 and Wip1." *J Biol Chem* 2006, 281(42), 31309-16.

Hosoya, N. and K. Miyagawa. "Targeting DNA Damage Response in Cancer Therapy." *Cancer Sci* 2014, 105(4), 370-88.

Huang, H. P.; W. J. Liu; Q. L. Guo and Y. Q. Bai. "Effect of Silencing Hoxa5 Gene Expression Using Rna Interference on Cell Cycle and Apoptosis in Jurkat Cells." *Int J Mol Med* 2016, 37(3), 669-78.

Huang, Y.; P. Wu; B. Liu and J. Du. "Successful Personalized Chemotherapy for Metastatic Gastric Cancer Based on Quantitative Brca1 Mrna Expression Level: A Case Report." *Oncol Lett* 2016, 11(6), 4183-86.

Hurley, P. J. and F. Bunz. "Atm and Atr: Components of an Integrated Circuit." *Cell Cycle* 2007, 6(4), 414-7.

Issler, M. V. C. and J. C. M. Mombach. "Microrna-16 Feedback Loop with P53 and Wip1 Can Regulate Cell Fate Determination between Apoptosis and Senescence in DNA Damage Response." *PLoS One* 2017, 12(10), e0185794.

Jackson, M. D. and J. M. Denu. "Molecular Reactions of Protein Phosphatases--Insights from Structure and Chemistry." *Chem Rev* 2001, 101(8), 2313-40.

Jaiswal, H.; J. Benada; E. Mullers; K. Akopyan; K. Burdova; T. Koolmeister; T. Helleday; R. H. Medema; L. Macurek and A. Lindqvist. "Atm/Wip1 Activities at Chromatin Control Plk1 Re-Activation to Determine G2 Checkpoint Duration." *EMBO J* 2017, 36(14), 2161-76.

Kilic Eren, M. and V. Tabor. "The Role of Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha in Bypassing Oncogene-Induced Senescence." *PLoS One* 2014, 9(7), e101064.

Kilic, M.; H. Kasperczyk; S. Fulda and K. M. Debatin. "Role of Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha in Modulation of Apoptosis Resistance." *Oncogene* 2007, 26(14), 2027-38.

Kilic, M. and C.A. Schmitt. " Tumor Senescence in Cancer Treatment. Part 6. Chapter Iii. "Exploiting Drug Induced Senescence in Transgenic Mouse Models" Beyond Apoptosis: Cellular Outcomes of Cancer Therapy,," New York: Informa Health Care USA, 2008, 273.

Kim, H. and A. D. D'Andrea. "Regulation of DNA Cross-Link Repair by the Fanconi Anemia/Brca Pathway." *Genes Dev* 2012, 26(13), 1393-408.

Kleiblova, P.; I. A. Shaltiel; J. Benada; J. Sevcik; S. Pechackova; P. Pohlreich; E. E. Voest; P. Dundr; J. Bartek; Z. Kleibl, et al. "Gain-of-Function Mutations of Ppm1d/Wip1 Impair the P53-Dependent G1 Checkpoint." *J Cell Biol* 2013, 201(4), 511-21.

Landry, B.; J. Valencia-Serna; H. Gul-Uludag; X. Jiang; A. Janowska-Wieczorek; J. Brandwein and H. Uludag. "Progress in Rnai-Mediated Molecular Therapy of Acute and Chronic Myeloid Leukemia." *Mol Ther Nucleic Acids* 2015, 4, e240.

Le Guezennec, X. and D. V. Bulavin. "Wip1 Phosphatase at the Crossroads of Cancer and Aging." *Trends Biochem Sci* 2010, 35(2), 109-14.

Lee, J. S.; M. O. Lee; B. H. Moon; S. H. Shim; A. J. Fornace, Jr. and H. J. Cha. "Senescent Growth Arrest in Mesenchymal Stem Cells Is Bypassed by Wip1-Mediated Downregulation of Intrinsic Stress Signaling Pathways." *Stem Cells* 2009, 27(8), 1963-75.

Liang, Y.; S. Y. Lin; F. C. Brunicardi; J. Goss and K. Li. "DNA Damage Response Pathways in Tumor Suppression and Cancer Treatment." *World J Surg* 2009, 33(4), 661-6.

Lindqvist, A.; M. de Bruijn; L. Macurek; A. Bras; A. Mensinga; W. Bruinsma; O. Voets; O. Kranenburg and R. H. Medema. "Wip1 Confers G2 Checkpoint Recovery Competence by Counteracting P53-Dependent Transcriptional Repression." *EMBO J* 2009, 28(20), 3196-206.

Lowe, J.; H. Cha; M. O. Lee; S. J. Mazur; E. Appella and A. J. Fornace, Jr. "Regulation of the Wip1 Phosphatase and Its Effects on the Stress Response." *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012, 17, 1480-98.

Lowe, J. M.; H. Cha; Q. Yang and A. J. Fornace, Jr. "Nuclear Factor-Kappab (Nf-Kappab) Is a Novel Positive Transcriptional Regulator of the Oncogenic Wip1 Phosphatase." *J Biol Chem* 2010, 285(8), 5249-57.

Lu, X.; T. A. Nguyen; S. H. Moon; Y. Darlington; M. Sommer and L. A. Donehower. "The Type 2c Phosphatase Wip1: An Oncogenic Regulator of Tumor Suppressor and DNA Damage Response Pathways." *Cancer Metastasis Rev* 2008, 27(2), 123-35.

Macurek, L.; J. Benada; E. Mullers; V. A. Halim; K. Krejcikova; K. Burdova; S. Pechackova; Z. Hodny; A. Lindqvist; R. H. Medema, et al. "Downregulation of Wip1 Phosphatase Modulates the Cellular Threshold of DNA Damage Signaling in Mitosis." *Cell Cycle* 2013, 12(2), 251-62.

Madrid, M.; A. Nunez; T. Soto; J. Vicente-Soler; M. Gacto and J. Cansado. "Stress-Activated Protein Kinase-Mediated Down-Regulation of the Cell Integrity Pathway Mitogen-Activated Protein Kinase Pmk1p by Protein Phosphatases." *Mol Biol Cell* 2007, 18(11), 4405-19.

Martin-Millan, M.; M. Almeida; E. Ambrogini; L. Han; H. Zhao; R. S. Weinstein; R. L. Jilka; C. A. O'Brien and S. C. Manolagas. "The Estrogen Receptor-Alpha in Osteoclasts Mediates the Protective Effects of Estrogens on Cancellous but Not Cortical Bone." *Mol Endocrinol* 2010, 24(2), 323-34.

Massey, A. J. "Inhibition of Atr-Dependent Feedback Activation of Chk1 Sensitises Cancer Cells to Chk1 Inhibitor Monotherapy." *Cancer Lett* 2016, 383(1), 41-52.

Medema, R. H. and L. Macurek. "Checkpoint Control and Cancer." *Oncogene* 2012, 31(21), 2601-13.

Mirzayans, R.; B. Andrais; A. Scott; Y. W. Wang and D. Murray. "Ionizing Radiation-Induced Responses in Human Cells with Differing Tp53 Status." *Int J Mol Sci* 2013, 14(11), 22409-35.

Oliva-Trastoy, M.; V. Berthonaud; A. Chevalier; C. Ducrot; M. C. Marsolier-Kergoat; C. Mann and F. Leteurtre. "The Wip1 Phosphatase (Ppm1d) Antagonizes Activation of the Chk2 Tumour Suppressor Kinase." *Oncogene* 2007, 26(10), 1449-58.

Parssinen, J.; E. L. Alarmo; S. Khan; R. Karhu; M. Vihinen and A. Kallioniemi. "Identification of Differentially Expressed Genes after Ppm1d Silencing in Breast Cancer." *Cancer Lett* 2008, 259(1), 61-70.

Pechackova, S.; K. Burdova; J. Benada; P. Kleiblova; G. Jenikova and L. Macurek. "Inhibition of Wip1 Phosphatase Sensitizes Breast Cancer Cells to Genotoxic Stress and to Mdm2 Antagonist Nutlin-3." *Oncotarget* 2016, 7(12), 14458-75.

Pechackova, S.; K. Burdova and L. Macurek. "Wip1 Phosphatase as Pharmacological Target in Cancer Therapy." *J Mol Med (Berl)* 2017, 95(6), 589-99.

Pommier, Y. "DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology, and Interfacial Inhibition." *Chem Rev* 2009, 109(7), 2894-902.

Qian, Y. and X. Chen. "Tumor Suppression by P53: Making Cells Senescent." *Histol Histopathol* 2010, 25(4), 515-26.

Rahman, H. S.; A. Rasedee; M. S. Chartrand; H. H. Othman; S. K. Yeap and F. Namvar. "Zerumbone Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis Via Mitochondrial Pathway in Jurkat Cell Line." *Nat Prod Commun* 2014, 9(9), 1237-42.

Rauta, J.; E. L. Alarmo; P. Kauraniemi; R. Karhu; T. Kuukasjarvi and A. Kallioniemi. "The Serine-Threonine Protein Phosphatase Ppm1d Is Frequently Activated through Amplification in Aggressive Primary Breast Tumours." *Breast Cancer Res Treat* 2006, 95(3), 257-63.

Rendtlew Danielsen, J. M.; D. H. Larsen; K. B. Schou; R. Freire; J. Falck; J. Bartek and J. Lukas. "Hclk2 Is Required for Activity of the DNA Damage Response Kinase Atr." *J Biol Chem* 2009, 284(7), 4140-7.

Ronchetti, L.; E. Melucci; F. De Nicola; F. Goeman; B. Casini; F. Sperati; M. Pallocca; I. Terrenato; L. Pizzuti; P. Vici, et al. "DNA Damage Repair and Survival Outcomes in Advanced Gastric Cancer Patients Treated with First-Line Chemotherapy." *Int J Cancer* 2017, 140(11), 2587-95.

Roos, W. P. and B. Kaina. "DNA Damage-Induced Cell Death by Apoptosis." *Trends Mol Med* 2006, 12(9), 440-50.

Rossi, M.; O. N. Demidov; C. W. Anderson; E. Appella and S. J. Mazur. "Induction of Ppm1d Following DNA-Damaging Treatments through a Conserved P53 Response Element Coincides with a Shift in the Use of Transcription Initiation Sites." *Nucleic Acids Res* 2008, 36(22), 7168-80.

Ruark, E.; K. Snape; P. Humburg; C. Loveday; I. Bajrami; R. Brough; D. N. Rodrigues; A. Renwick; S. Seal; E. Ramsay, et al. "Mosaic Ppm1d Mutations Are Associated with Predisposition to Breast and Ovarian Cancer." *Nature* 2013, 493(7432), 406-10.

Shaltiel, I. A.; L. Krenning; W. Bruinsma and R. H. Medema. "The Same, Only Different - DNA Damage Checkpoints and Their Reversal Throughout the Cell Cycle." *J Cell Sci* 2015, 128(4), 607-20.

Shen, X. F.; Y. Zhao; J. P. Jiang; W. X. Guan and J. F. Dux "Phosphatase Wip1 in Immunity: An Overview and Update." *Front Immunol* 2015, 8, 8.

Shi, Y.; S. L. Venkataraman; G. E. Dodson; A. M. Mabb; S. LeBlanc and R. S. Tibbetts. "Direct Regulation of Creb Transcriptional Activity by Atm in Response to Genotoxic Stress." *Proc Natl Acad Sci U S A,* 2004, 101(16), 5898-903.

Shiloh, Y. "Atm and Related Protein Kinases: Safeguarding Genome Integrity." *Nat Rev Cancer* 2003, 3(3), 155-68.

Shimada, M. and M. Nakanishi. "Response to DNA Damage: Why Do We Need to Focus on Protein Phosphatases?" *Front Oncol* 2013, 3, 8.

Shreeram, S.; W. K. Hee; O. N. Demidov; C. Kek; H. Yamaguchi; A. J. Fornace, Jr.; C. W. Anderson; E. Appella and D. V. Bulavin. "Regulation of Atm/P53-Dependent Suppression of Myc-Induced Lymphomas by Wip1 Phosphatase." *J Exp Med* 2006, 203(13), 2793-9.

Song, J. Y.; S. H. Ryu; Y. M. Cho; Y. S. Kim; B. M. Lee; S. W. Lee and J. Choi. "Wip1 Suppresses Apoptotic Cell Death through Direct Dephosphorylation of Bax in Response to Gamma-Radiation." *Cell Death Dis* 2013, 4, e744.

Sriraman, A.; Y. Li and M. Dobbelstein. "Fortifying P53 - Beyond Mdm2 Inhibitors." *Aging (Albany NY)* 2016, 8(9), 1836-37.

Sun, B.; S. M. Ross; S. Rowley; Y. Adeleye and R. A. Clewell. "Contribution of Atm and Atr Kinase Pathways to P53-Mediated Response in Etoposide and Methyl Methanesulfonate Induced DNA Damage." *Environ Mol Mutagen* 2017, 58(2), 72-83.

Suppipat, K.; C. S. Park; Y. Shen; X. Zhu and H. D. Lacorazza. "Sulforaphane Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells." *PLoS One* 2012, 7(12), e51251.

Takekawa, M.; M. Adachi; A. Nakahata; I. Nakayama; F. Itoh; H. Tsukuda; Y. Taya and K. Imai. "P53-Inducible Wip1 Phosphatase Mediates a Negative Feedback Regulation of P38 Mapk-P53 Signaling in Response to Uv Radiation." *EMBO J* 2000, 19(23), 6517-26.

Terwilliger, T. and M. Abdul-Hay. "Acute Lymphoblastic Leukemia: A Comprehensive Review and 2017 Update." *Blood Cancer J* 2017, 7(6), e577.

Uyanik, B.; B. B. Grigorash; A. R. Goloudina and O. N. Demidov. "DNA Damage-Induced Phosphatase Wip1 in Regulation of Hematopoiesis, Immune System and Inflammation." *Cell Death Discov* 2017, 3, 17018.

Vesela, E.; K. Chroma; Z. Turi and M. Mistrik. "Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies." *Biomolecules* 2017, 7(1).

Wamsley, J. J.; N. Issaeva; H. An; X. Lu; L. A. Donehower and W. G. Yarbrough. "Lzap Is a Novel Wip1 Binding Partner and Positive Regulator of Its Phosphatase Activity in Vitro." *Cell Cycle* 2017, 16(2), 213-23.

Wang, H. Y.; Z. S. Liu; L. Qiu; J. Guo; Y. F. Li; J. Zhang; T. J. Wang and X. D. Liu. "Knockdown of Wip1 Enhances Sensitivity to Radiation in Hela Cells through Activation of P38 Mapk." *Oncol Res* 2014, 22(4), 225-33.

Wang, Z. P.; Y. Tian and J. Lin. "Role of Wild-Type P53-Induced Phosphatase 1 in Cancer." *Oncol Lett* 2017, 14(4), 3893-98.

Weagel, E. G.; W. Meng; M. H. Townsend; E. J. Velazquez; R. A. Brog; M. W. Boyer; K. S. Weber; R. A. Robison and K. L. O'Neill. "Biomarker Analysis and Clinical Relevance of Tk1 on the Cell Membrane of Burkitt's Lymphoma and Acute Lymphoblastic Leukemia." *Onco Targets Ther* 2017, 10, 4355-67.

Xia, Y.; P. Ongusaha; S. W. Lee and Y. C. Liou. "Loss of Wip1 Sensitizes Cells to Stress- and DNA Damage-Induced Apoptosis." *J Biol Chem* 2009, 284(26), 17428-37.

Xia, Z. S.; D. Wu; W. Zhong; X. J. Lu; T. Yu and Q. K. Chen. "Wip1 Gene Silencing Enhances the Chemosensitivity of Human Colon Cancer Cells." *Oncol Lett* 2017, 14(2), 1875-83.

Yanada, M.; M. Suzuki; K. Kawashima; H. Kiyoi; T. Kinoshita; N. Emi; H. Saito and T. Naoe. "Long-Term Outcomes for Unselected Patients with Acute Myeloid Leukemia Categorized According to the World Health Organization Classification: A Single-Center Experience." *Eur J Haematol* 2005, 74(5), 418-23.

Yang, D. H.; J. A. He; J. Li; W. F. Ma; X. H. Hu; S. J. Xin and Z. Q. Duan. "[Expression of Proto-Oncogene Wip1 in Breast Cancer and Its Clinical Significance]." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2010, 90(8), 519-22.

Yang, F.; Y. Yin; F. Wang; Y. Wang; L. Zhang; Y. Tang and S. Sun. "Mir-17-5p Promotes Migration of Human Hepatocellular Carcinoma Cells through the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Heat Shock Protein 27 Pathway." *Hepatology* 2010, 51(5), 1614-23.

Yin, S.; P. Wang; L. Yang; Y. Liu; Y. Wang; M. Liu; Z. Qi; J. Meng; T. Y. Shi; G. Yang, et al. "Wip1 Suppresses Ovarian Cancer Metastasis through the Atm/Akt/Snail Mediated Signaling." *Oncotarget* 2016, 7(20), 29359-70.

Yoda, A.; K. Toyoshima; Y. Watanabe; N. Onishi; Y. Hazaka; Y. Tsukuda; J. Tsukada; T. Kondo; Y. Tanaka and Y. Minami. "Arsenic Trioxide Augments Chk2/P53-Mediated Apoptosis by Inhibiting Oncogenic Wip1 Phosphatase." *J Biol Chem* 2008, 283(27), 18969-79.

Zannini, L.; D. Delia and G. Buscemi. "Chk2 Kinase in the DNA Damage Response and Beyond." *J Mol Cell Biol* 2014, 6(6), 442-57.

Zhao, M.; H. Zhang; G. Zhu; J. Liang; N. Chen; Y. Yang; X. Liang; H. Cai and W. Liu. "Association between Overexpression of Wip1 and Prognosis of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer." *Oncol Lett* 2016, 11(4), 2365-70.

Zhong, H.; L. Cui; F. Xu; L. Chen; L. Jiang; H. Huang; J. Xu; X. Zhao; L. Li; S. Zeng, et al. "Up-Regulation of Wip1 Involves in Neuroinflammation of Retinal Astrocytes after Optic Nerve Crush Via Nf-Kappab Signaling Pathway." *Inflamm Res* 2016, 65(9), 709-15.

Zhu, Q. and A. A. Wani. "Nucleotide Excision Repair: Finely Tuned Molecular Orchestra of Early Pre-Incision Events." *Photochem Photobiol* 2017, 93(1), 166-77.

Zhu, Y. H. and D. V. Bulavin. "Wip1-Dependent Signaling Pathways in Health and Diseases." *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012, 106, 307-25.

Zhu, Y. H.; C. W. Zhang; L. Lu; O. N. Demidov; L. Sun; L. Yang; D. V. Bulavin and Z. C. Xiao. "Wip1 Regulates the Generation of New Neural Cells in the Adult Olfactory Bulb through P53-Dependent Cell Cycle Control." *Stem Cells* 2009, 27(6), 1433-42.

Zuryn, A.; A. Grzanka; A. Stepien; D. Grzanka; R. Debski and D. Smolinski. "Expression of Cyclin a in Human Leukemia Cell Line Hl-60 Following Treatment with Doxorubicin and Etoposide: The Potential Involvement of Cyclin a in Apoptosis." *Oncol Rep* 2007, 17(5), 1013-9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı **:** Nur Betül KARTAL
Uyruk **:** T.C.
Doğum yeri ve tarihi **:** Bursa 16.12.1986
Telefon : 0 (553) 822 91 39
E-mail : 25nur09@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi	
Yüksek Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı	Devam ediyor	
Yüksek Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor	
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010	

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

214S200 no'lu "Protein fosfataz PPM1D/WİP-1'in İnsan Hodgkin Dışı (Non-Hodgkin) LenfomadaOnkogen Potansiyelinin Araştırılması" konulu 1001 Tübitak Öğrenci Bursu

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2014-2015	Adnan Menderes Üniversite Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı	Biyolog

AKADEMİK YAYINLAR

1. PROJELER

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Yılı	Görev	Proje Türü
Akut lenfoblastik lösemide Wip1 fosfatazın kemoterapi üzerine etkileri	Adnan Menderes Üniversitesi	8.500 ₺	2015	Araştırmacı	Kurumsal (G. Ferbeyre et al.)

2. BİLDİRİLER

A) Ulusal Kongrelerde

Wip1 Fosfatazın İnsan Non-Hodgkin Lenfomada DNA Hasarı Cevabının Modülasyonu ve Hücresel Sters Cevaplarının Aktivasyonuna Dirençte Rolü, Mehtap KILIÇ EREN**, Nur Betül KARTAL**, Hatice PİLEVNELİ, Didem KOZACI. **XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 26-29 Ekim 2017, Fethiye**, Poster Bildirisi

Wip1 Fosfatazın İnsan Non –Hodgkin Lenfomada Onkogen Potansiyeli**,** Mehtap KILIÇ EREN, Hatice PİLEVNELİ, **Nur Betül KARTAL**, Didem KOZACI, Firuzan DOGER. **XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 26-29 Ekim 2017, Fethiye**, Poster Bildirisi

Invertase Production by *Aspergillus niger* Using Mulberry (Morus) Pulp, Özden CANLI, **Nur Betül KARTAL**, Yağmur ÜNVER, Esabi Başaran KURBANOĞLU, Ömer Faruk ALGUR, Mehmet Nuri AYDOĞAN.**21. Ulusal Biyoloji Kongresi 3-7 Eylül 2012**, İzmir, Poster Bildirisi

B) Uluslararası Kongrelerde

The Oncogenic Potential Of PPM1D/Wip-1 Phosphatase and It's Role in Modulation Of Cellular Stress Responses In Non-Hodgkin Lymphoma, Mehtap Kilic Eren**, Nur Betul Kartal**, Hatice Pilevneli, Didem Kozaci, Firuzan Doger. **ECDO 2017: 25th Conference of**

the European Cell Death Organization, 'Cell Death and Immunity in Disease: from molecules to translational medicine.'

Wıp-1 Phosphatase Is Overexpressed, Amplıfied and Mutated In Human Non-hodgkın LymphomaMehtap KILIC EREN, Hatice PILEVNELI, **Nur Betul KARTAL**, Didem KOZACI, Firuzan DOGER. **Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fate and decisions.**

Ppm1d/Wip1 Phosphatase Modulates DNA Damage Response and Confers Resistance to Cellular Stress Responses in Human Non-Hodgkin Lymphoma Cell Lines Mehtap KILIC EREN, **Nur Betul KARTAL**, Hatice PILEVNELI, Didem KOZACI **Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fate and decisions.**