T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMA MULTİFORME'DE IRS4 PROTEİNİNİN RADYOTERAPİ ÜZERİNDEKİ ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Moleküler Biyolog Aysun ARSLAN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Gökhan GÖRGİŞEN

VAN-2021

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMA MULTİFORME'DE IRS4 PROTEİNİNİN RADYOTERAPİ ÜZERİNDEKİ ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Moleküler Biyolog Aysun ARSLAN
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Gökhan GÖRGİŞEN

VAN-2021

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2020-8778 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum *''Glioblastoma Multiforme'de IRS4 Proteininin Radyoterapi Üzerindeki Rolünün Belirlenmesi''* başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Aysun ARSLAN
Tarih:
İmza:

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında desteğini ve özverisini esirgemeyen, bilimsel bir bakış açısı kazanmam için göstermiş olduğu çaba nedeniyle çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Gökhan GÖRGİŞEN'e

Lisansüstü sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim, bölümümüzün saygıdeğer hocaları; Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE, Prof. Dr. Halil ÖZKOL ve Dr. Öğr. Üyesi Zehra KAYA'ya

Bu tezin gerçekleştirilmesinde ve çalışmalarımı tamamlayabilmem için laboratuvar imkânlarından sonuna kadar yararlanmamı sağlayan ve kıymetli vakitlerini ayıran; Tıbbi Parazitoloji bölümünden değerli hocam Doç. Dr. Yunus Emre BEYHAN'a ve Biyofizik Anabilim Dalı hocalarımdan Doç. Dr. Tahir ÇAKIR'a

Akademik hayatımın ilk basamağında beraber emek verdiğimiz değerli arkadaşım Yılmaz ECER'e

Yüksek lisans süreci boyunca birlikte vakit geçirdiğimiz arkadaşlarım sevgili; Elif Sena ŞAHİN, Seren DURAN, Müjdat ÇAMLI, Rıdvan DURGUN, Sedat KÖSTEKÇİ ve Uğur KARATAŞ'a

Hayatımın her anında ilgi ve hoşgörülerini eksik etmeyen çok kıymetli annem, babam ve sevgili aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ARSLAN A, Glioblastoma Multiforme'de IRS4 Proteininin Radyoterapi Üzerindeki Rolünün Belirlenmesi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2021. İnsülin reseptör substrat (IRS) proteinleri, insülin sinyalinde rol alan adaptör moleküllerdir. İnsülin benzeri büyüme faktör reseptörü (IGFR) veya insülin reseptörü (IR) aktivasyonu aracılığı ile etkilerini göstermektedir. IRS proteinlerinin ekspresyon artışları kanser gelişimi ile ilişkilidir. Aynı zamanda kanserde uygulanan kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yaklaşımlarının etkinliği üzerinde de önemli rol oynamaktadırlar. IRS1 ve IRS2 proteinleri insanda yaygın ekspresyon gösterirken IRS4 karaciğer, timus ve beyin gibi dokularda sınırlı ekspresyon gösterir. IRS proteinleri aynı dokuda ifade edilse bile özgün tirozin motifleri sayesinde farklı sinyal yolaklarını uyararak farklı hücresel fonksiyonları düzenleyebilir. Glioblastoma multiforme (GBM) erişkinlerde yaygın görülen en malign beyin tümörüdür. Radyoterapi GBM'de standart tedavi yaklaşımıdır. Bu çalışmada GBM hücrelerinde IRS4'ün radyoterapi üzerindeki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda LN229 hücrelerine pcDNA3.1-flag-tagged-insan IRS4 ekspresyon vektörü lipofektamin aracılığı ile transfekte edilerek ektopik IRS4 ekspresyonu western blot ile doğrulanmıştır. LN229 hücreleri 5, 8, 10 Gy radyoterapi dozu ile ışınlandıktan sonra IRS4'ün radyoterapi üzerindeki fonksiyonel etkisi MTT ve koloni oluşum testleri ile belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre artan IRS4 ekspresyonunun GBM hücrelerinde radyoterapi duyarlılığının artmasına yol açtığı belirlenmiştir. GBM hücre hattında artan IRS4 ekspresyonunun hücre sağ kalım oranları ve koloni oluşum oranlarında azalmaya neden olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma Multiforme (GBM), İnsülin Reseptör Substrat 4 (IRS4), Radyoterapi Direnci.

ABSTRACT

ARSLAN A, Understanding the Role of IRS4 Protein in Radiotherapy in Glioblastoma Multiforme, Van Yuzuncu Yıl University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, M.Sc. Thesis, Van, 2021. Insulin receptor substrate (IRS) proteins are the main adapter molecules in insulin signaling. They show their effects through the activations of insulin like growth factor receptor (IGFR) or insulin receptor (IR). Overexpression of IRS proteins are associated with cancer development. They also have a pivotal role in the effectiveness of therapeutic approaches such chemotherapy or radiotherapy. IRS1 and IRS2 are widely expressed in human tissues while IRS4 shows tissue-specific expression pattern such as liver, thymus, and brain. Although they are expressed in the same tissues, they can regulate different cellular functions through inducing the different signaling pathways via their specific tyrosine phosphorylation motifs. Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common malignant form of brain tumors in adult and radiotherapy is the standard treatment option for GBM. In this study, it was aimed to understand the role of IRS4 in radiotherapy in GBM. Therefore, LN229 cells were transfected with the expression vector pcDNA3.1-flag-tagged-human IRS4 using lipofectamine and the ectopic expression of IRS4 was confirmed by western blot. LN229 cells were treated with different radiotherapy doses 5, 8 and 10 Gy and levels of cell survival and colony forming properties were determined by MTT analyses and colony forming assay. According to our results overexpression of IRS4 induced the sensitivity of GBM cells to the radiotherapy. Survival rates and colony formations significantly decreased in IRS4 overexpressed GBM cells compared to untransfected cells after radiotherapy treatment.

Keywords: Glioblastoma Multiforme (GBM), Insulin Receptor Substrate 4 (IRS4), Radiotherapy Resistance.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY II
ETİK BEYAN III
TEŞEKKÜR IV
ÖZET V
ABSTRACT VI
İÇİNDEKİLER VII
SİMGELER VE KISALTMALAR X
ŞEKİLLER LİSTESİ XI
TABLOLAR LİSTESİ XII
1.GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Glioblastoma Multiforme 3
2.1.1. GBM risk faktörleri 4
2.1.2. GBM sınıflandırılması 4
2.1.3. GBM tedavileri 5
2.1.4. GBM kök hücreleri ve tedaviye etkileri 7
2.2. Radyoterapi 8
2.2.1. GBM kök hücrelerinin radyoterapiye adaptif cevabı 10
2.2.2. Radyoterapi direnç belirteci: H2AX 11
2.3. GBM'de Etkili Sinyal Yolakları 13
2.3.1. GBM ve insülin sinyali 14
2.4. İnsülin Reseptör Substrat (IRS) 17
2.5. Radyoterapi Direnci ve İnsülin Sinyal İlişkisi 21
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24

3.1. pcDNA Flag Tagged İnsan IRS4 Ekspresyon Vektörünün Filtre Kağıdından Sökülmesi 24
3.2. Kompetan Hücre Hazırlanması 24
3.3. E. Coli DH5α Suşunun Transformasyonu 25
3.4. Plazmid İzolasyonu 25
3.5. Hücre Kültürü 26
3.5.1. LN229 hücrelerinin çözdürülmesi 26
3.5.2. LN229 hücrelerinin beslenmesi 27
3.5.3. LN229 hücrelerinin pasajlanması 27
3.5.4. LN229 hücrelerinin dondurulması 27
3.5.5. Hücrelerin sayılması 28
3.5.6. LN229 hücrelerine plazmid transfeksiyonu 28
3.6. LN229 Hücrelerine Verilecek Radyoterapi Dozunun Belirlenmesi 29
3.7. MTT (Hücre Canlılık Testi) 31
3.8. LN229 Hücrelerinin Koloni Oluşum Testi 32
3.9. Proteinlerin Lizatlarının Hazırlanması 32
3.10. Protein Miktar Tayini (Bradford Analizi) 32
3.11. Western Blotting 33
3.11.1. Jel hazırlanması 34
3.11.2. Protein lizatlarının jelde yürütülmesi 35
3.11.3. Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi 35
3.11.4. PVDF membranının primer antikor işaretlenmesi 36
3.11.5. PVDF membranın görüntülenmesi 36
4. BULGULAR 38
4.1. LN229 Hücre Hattına Verilecek Optimum Radyoterapi Doz Miktarının Belirlenmesi 38

4.2. LN229 Hücrelerinde Radyoterapi Doz Miktarlarının H2AX Fosforilasyonu Üzerine Etkisi 39
4.3. Yabanıl Tip IRS4 Proteininin LN229 Hücrelerinde Ektopik Ekspresyonunun Gösterilmesi 40
4.4. Ektopik IRS4 Ekspresyonu Yapan LN229 Hücrelerinde Radyoterapinin γH2AX İfadesi Üzerine Etkisi 40
4.5. Ektopik IRS4 Ekspresyonu Yapan LN229 Hücrelerinde Radyoterapi Tedavisinin Hücre Sağ Kalımına Etkisi 41
4.6. Ektopik IRS4 Ekspresyonu Yapan LN229 Hücrelerinde Radyoterapi Tedavisinin Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi 42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 45
KAYNAKLAR 49
ÖZGEÇMİŞ 58
EKLER 59
EK 1. Tez Orijinallik Raporu 59

SİMGELER VE KISALTMALAR

CSC : Kanser Kök Hücresi
DSB : DNA Çift Zincir Kırığı
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
EGFR : Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
GBM : Glioblastoma Multiforme
γH2AX : Gamma H2AX
Gy : Gray
HR : Homolog Rekombinasyon
IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFR : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
IR : İnsülin Reseptörü
IRS : İnsülin Reseptör Substrat
KBB : Kan Beyin Bariyeri
kDa : Kilodalton
µg : Mikrogram
µl : Mikrolitre
mTOR : Rapamisin memeli hedefi
NHEJ : Homolog Olmayan Rekombinasyon
PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi
PH : Pleckstrin Homoloji
PI3K : Fostatidilinositol 3 kinaz
PKC : Protein Kinaz C
PTB : Fosfotirozin bağlanma bölgesi
PTEN : Fosfataz tensin homoloğu
PVDF : Poliviniliden diflorid
rpm : Dakikadaki dönüş sayısı
RT : Radyoterapi
RTK : Reseptör Tirozin Kinaz
SDS : Sodyum Dodesil Sülfat
SH2 : Src Homoloji 2
TMZ : Temozolomid

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Glioblastoma multiforme histolojik görüntüsü. 3
Şekil 2. Gliomalarda moleküler belirteçlerin tümör sınıflandırmasında kullanımı. 5
Şekil 3. GBM tedavisinde kombinasyon tedavilerinin şematik gösterimi. 6
Şekil 4. Glioblastoma mikro ortamının hücresel heterojenliği 8
Şekil 5. DNA hasarının hücresel cevabı. 10
Şekil 6. H2AX'in nüklozomdaki yeri ve C-terminal bölgesindeki serin 139 pozisyonu 11
Şekil 7. Klinik ve ilaç keşfinde biyobelirteç olarak γH2AX. 12
Şekil 8. EGFR ve IGFR ortak sinyalizasyonu. 14
Şekil 9. Tirozin kinaz reseptör yolakları 16
Sekil 10. İnsan IRS1, IRS2 ve IRS4'ün şematik diyagramı 19
Şekil 11. RT direncine yol açan IGF-IR ile tetiklenen ana sinyal yolakları 22
Şekil 12. 96 kuyulu plaka doz ayarlaması. 30
Şekil 13. 6 kuyulu plaka doz ayarlaması. 31
Şekil 14. LN229 hücrelerinin 5, 8, 10 Gy radyoterapi dozu muamelesi sonunda sağ kalım oranları. 38
Şekil 15. 5, 8, 10 Gy radyoterapi dozu muamelesi sonucunda LN229 hücrelerinin H2AX fosforilasyon seviyeleri 39
Şekil 16. LN229 hücrelerinde transfeksiyon sonrası ektopik IRS4 ekspresyon seviyeleri 40
Şekil 17. Ektopik IRS4 ekpresyonu yapan LN229 hücrelerinin 10 Gy RT dozu sonrasında γH2AX ekpresyon seviyeleri 41
Şekil 18. Ektopik IRS4 ekpresyonu yapan LN229 hücrelerinin 10 Gy RT dozu sonrasında hücre sağ kalım oranları 42
Şekil 19. Ektopik IRS4 ekspresyonu yapan LN229 hücrelerinde 10 Gy RT dozu sonrasında koloni oluşumlarının görüntüsü. 43
Şekil 20. Ektopik IRS4 ekspresyonu yapan LN229 hücrelerinde 10 Gy RT dozu sonrasında koloni oluşumlarının oranları 44

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. İnsan kanserlerinde IRS ifadesi ……...20
Tablo 2. Western blot jel hazırlama protokolü……...34

1.GİRİŞ

Glioblastoma Multiforme (GBM) standart tedavilere dirençli, kötü prognozlu, agresif bir sinir sistemi tümörüdür. GBM tümörlerinin tedavisinde cerrahi müdahale sonrasında radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonları kullanılmaktadır. Tüm bu tedavilere rağmen GBM'nin ölümcüllüğü altında yatan hücresel mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (Heddleston ve ark., 2009).

Radyoterapi birçok kanserde olduğu gibi GBM tedavisinde de DNA çift zincir kırıklarına (DSB) neden olarak tümör hücresinde apoptotik yolakları indükleme temeline dayanmaktadır. Radyoterapi direncine neden olan en büyük etkenin DNA tamir mekanizmasından sorumlu gen ifadelerinde ve sinyal yolaklarındaki etkileşimlerin artışı olduğu düşünülmektedir (Prise, 2006).

Kanserde, reseptör tirozin kinazlarda (RTK) meydana gelen moleküler ve epigenetik değişimler radyoterapi direnci ile ilişkilendirilmektedir. Radyoterapi direnci ile ilişkilendirilen RTK elemanlarının başında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR) sinyal yolakları gelmektedir (Gong ve ark., 2016).

İnsülin reseptör substrat (IRS) olarak bilinen protein ailesi, insülin sinyal yolağının temel adaptör molekülleridir. IRS proteinleri başta insülin reseptörü substratı olarak tanımlanmasına rağmen kanser oluşumunda ve radyoterapi direncinde önemli rol oynayan IGFR ve EGFR gibi büyüme faktörleri ile de etkileşime geçebilmektedir. Günümüzde IRS proteinlerinin ifadelerindeki artışlar kanser gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Mardilovich ve ark., 2009).

IRS aile elemanlarından IRS1 ve IRS2 insan dokularında yaygın ifade edilmesine rağmen IRS4 ifadesi karaciğer, timüs ve beyin gibi dokularda sınırlı olup, yapılan son çalışmalarda IRS4'ün indüklediği sinyal yolaklarının diğer aile elemanlarından farklı olabileceği bildirilmiştir. Bu durumun temelinde IRS4'ün yapısında protein fosfataz olan SHP2 bağlanma bölgesinin bulunmaması yatmaktadır (Sesti ve ark., 2001).

IRS ailesinde IRS1'in DNA tamir mekanizmasından sorumlu protein RAD51 ile etkileşime geçebildiği, DNA tamir mekanizmasını hızlandırdığı ve DNA onarım etkinliğini arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca Görgişen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ektopik olarak IRS1 ifadesi arttırılmış GBM hücrelerinde radyoterapi direncinin geliştiği gösterilmiştir (Tojanek ve ark., 2003).

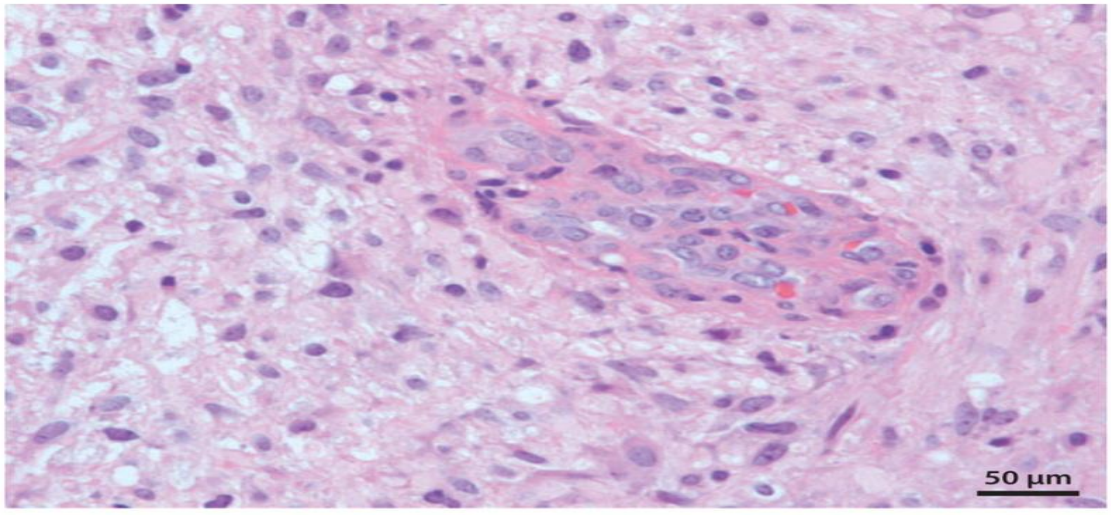
Literatürde kanser gelişimi ve tedavisine yönelik IRS1 ve IRS2'ye ait birçok çalışma bulunmasına rağmen IRS4 proteini hakkındaki bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. IRS4 ifade artışı birçok kanser gelişimi ile ilişkilendirilmesine rağmen kanser tedavisine yanıtındaki rolüne yönelik çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmamızın amacı GBM hücrelerinde IRS4 proteininin radyoterapi yanıtındaki rolünü ortaya çıkarmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma Multiforme (GBM) erişkinlerde sık rastlanan ve bilinen en agresif beyin tümörüdür (Witthayanuwat ve ark., 2018). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yapılan sınıflandırmada GBM, IV. derecede ve astrositik farklılaşmaya sahip bir tümör olarak kabul edilmiştir. GBM genellikle 45-70 yaş aralığında erkeklerde görülmektedir. İlk bulguları baş ağrısı, unutkanlık, sebepsiz kişilik değişikliği, cümle kurmada zorluk gibi birçok mental değişiklik olabilmektedir (Dağıstan ve ark., 2012).

GBM'ler belirgin anjiyogenez, beyin parankimine geniş infiltrasyon, apoptoza karşı iç direnç, yüksek metastaz yeteneği ve genomik istikrarsızlık ile karakterizedir (Khosla, 2016). Histolojik olarak; pleomorfik, belirgin nükleer atipi, mitotik aktivite yanında vasküler tromboz ve nekroz içermektedir. Vasküler hiperproliferasyon ve nekroz GBM'yi düşük dereceli gliomalardan ayıran temel tanı özellikleridir (Kalkan ve Atlı, 2014).



Şekil 1. Glioblastoma multiforme histolojik görüntüsü (Gladson ve ark., 2010).

GBM tümör hücreleri radyoterapi ve kemoterapi tedavilerine karşı yüksek duyarlılık gösterirler. Ancak kan beyin bariyeri (KBB) tedavi etkinliğini sınırlayan bir faktördür. KBB, kemoterapi ilaçlarının geçişini kısıtlayarak kemoterapinin terapötik etkinliğini göstermesini zorlaştırır (Sasmita ve ark., 2018).

GBM en ölümcül kanserlerden biri olmasının yanında hücresel ve genetik düzeyde heterojenite göstermesi nedeniyle tedavi seçenekleri sınırlıdır (Qazi ve ark., 2017). Bu anlamda GBM tanısı konulan hastaların, ortalama sağ kalım süresi 2 yıl veya daha azdır (Burri ve ark., 2018).

2.1.1. GBM risk faktörleri

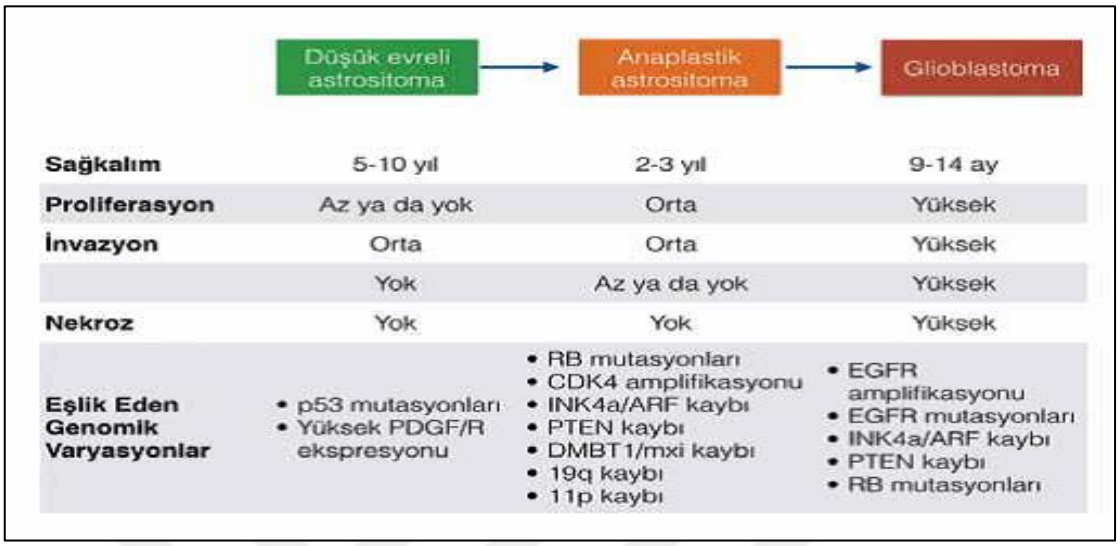
GBM'de birçok çevresel ve genetik faktör çalışılmış olup, tek bir genetik değişikliğin veya çevresel maruziyetin yalnız başına risk faktörü teşkil etmeyeceği sonucuna varılmıştır (Thakkar ve ark., 2014). Radyasyon, GBM'ye neden olan en önemli çevresel faktör olarak belirlenmiş olsa da vinil klorür, sigara içme, böcek ilaçlarına maruziyetin de GBM gelişiminde etkin olabileceği bildirilmiştir (Davis, 2016).

Genetik değişimlerin başında gen mutasyonları ve epigenetik faktörler gelmektedir. DNA metilasyonu heterojenliği GBM'in temel özelliklerinden bir tanesidir. GBM ve normal doku örnek karşılaştırılmasında GBM genomunda CpG adacıklarının yaklaşık %80' ninde DNA metilasyonu varlığı saptanmıştır (Jia ve ark., 2019). Epigenetik heterojenitenin yanı sıra GBM'de izositrat dehidrogenaz (IDH) mutasyonu, telomeraz ters transkriptaz (TERT) promotor mutasyonu, p53 mutasyonu ve EGFR gen kopya sayısı artışı gibi birçok genetik değişiklik tespit edilmiştir. Bu genomik değişiklikler GBM patogenezinde önemli olup tümör biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2019).

2.1.2. GBM sınıflandırılması

Gliomaların önceki yıllarda yaygın kullanılan sınıflandırması 2000 yılında revize edilerek sunulan DSÖ'nün sınıflandırmasıdır. Bu sınıflandırma diffüz gliomları astrositik tümörler, oligodenrogliomalar ve oligoastrositomlara ayırır (Louis ve ark., 2001). DSÖ tarafından 2016 yılında tekrar revize edilen santral sinir sistemi (SSS) tümörleri, kanser oluşumuna neden olan moleküler değişiklikler (TP53 veya BRAF mutasyonları) ya da tümör türüne özgü mutasyonlar (IDH1/2 mutasyonu veya delesyon, duplikasyon, translokasyon gibi kromozomal anomaliler) gibi moleküler parametreler temel alınarak sınıflandırılmıştır.

Aynı zamanda gen ifade profilini etkileyen epigenetik modifikasyonlar incelenerek hastaya özgü spesifik mekanizmalar da analiz edilmektedir (Louis ve ark., 2016).



	Düşük evreli astrositoma	Anaplastik astrositoma	Glioblastoma
Sağkalım	5-10 yıl	2-3 yıl	9-14 ay
Proliferasyon	Az ya da yok	Orta	Yüksek
İnvazyon	Orta	Orta	Yüksek
	Yok	Az ya da yok	Yüksek
Nekroz	Yok	Yok	Yüksek
Eşlik Eden Genomik Varyasyonlar	• p53 mutasyonları • Yüksek PDGF/R ekspresyonu	• RB mutasyonları • CDK4 amplifikasyonu • INK4a/ARF kaybı • PTEN kaybı • DMBT1/mxi kaybı • 19q kaybı • 11p kaybı	• EGFR amplifikasyonu • EGFR mutasyonları • INK4a/ARF kaybı • PTEN kaybı • RB mutasyonları

Şekil 2. Gliomalarda moleküler belirteçlerin tümör sınıflandırmasında kullanımı (Avşar ve Kılıç, 2017).

GBM tümörlerinin hücresel kökenlerinin ve moleküler patogenezinin anlaşılması tedavi seçenekleri için yeni hedeflerin belirlenmesini sağlar (Phillips ve ark., 2006). GBM gelişiminde farklı genetik faktörlerin sorumlu olması, hastalığın farklı yaşlardaki insanları etkilemesinin yanı sıra primer ve sekonder alt tiplerinin de oluşumuna neden olmaktadır (Ohgaki ve Kleihues, 2007).

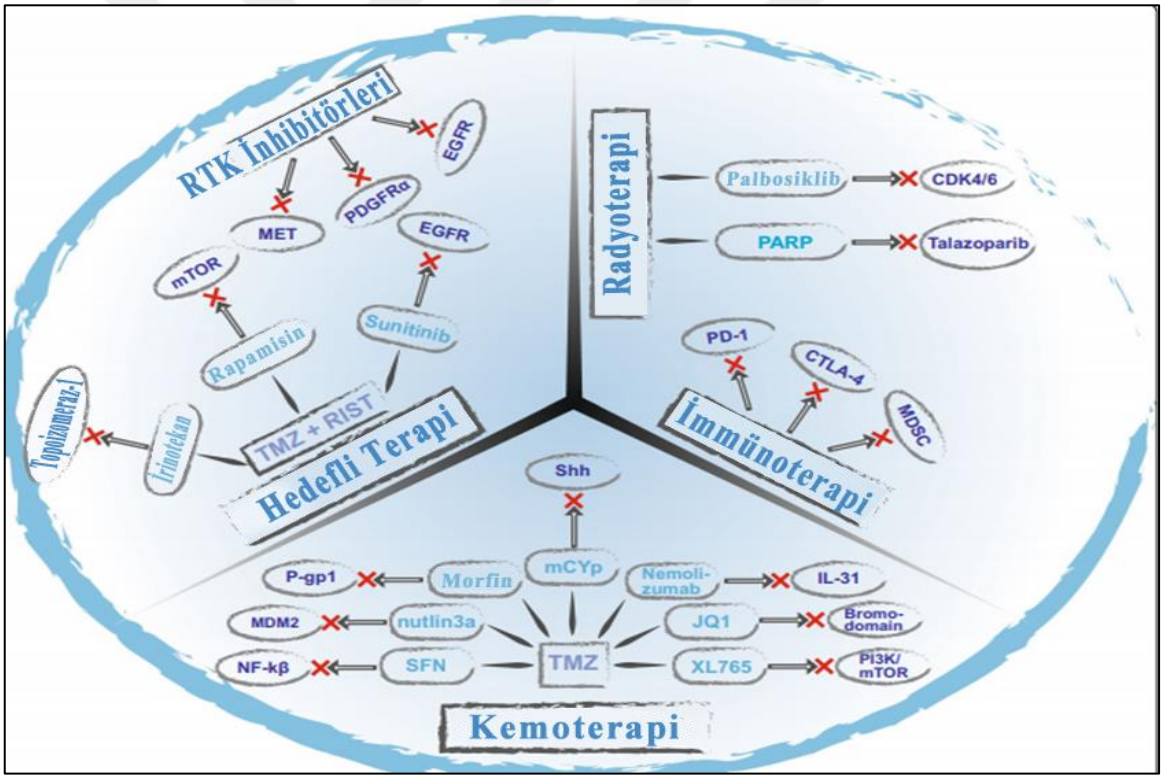
Günümüzde primer ve sekonder gliomalarda ayırıcı özellikte olan bazı gen mutasyonları ve gen ekspresyon profili farklılıkları da tanımlanmıştır. Primer GBM için tipik görülen genetik değişiklikler; EGFR gen kopya sayısının artışı, fosfataz ve tensin homolog (PTEN) mutasyonları ve 10q kromozom kaybıdır. Sekonder GBM ise IDH1 mutasyonları, p53 mutasyonları ve kromozom 19q kaybı sıklıkla görülmektedir (Brennan, 2011).

2.1.3. GBM tedavileri

Glioblastoma en yaygın görülen primer beyin tümörü olup sağ kalım süresi genellikle 15 aydır. Standart tedavi protokolü, makul derecede güvenli olduğu kadar tümörün cerrahi olarak çıkarılması ve ardından kemoterapinin radyoterapi ile kombine

olarak uygulanmasıdır (Delgado-Martin ve Medina, 2020). Bu tedavilerin yanı sıra GBM'de tespit edilen biyobelirteçlere (EGFR, VEGF, RTK) yönelik monoklonal antikor üretimi, immünterapi, onkolitik virüsler ve epigenetik mekanizmaları düzenleyen bireye özgü tedavi yöntemleri de kullanılmaya çalışılmıştır. Ancak bu tedavilere rağmen GBM'de sağ kalım oranı henüz arttırılamamıştır (Carlsson ve ark., 2014).

Moleküler hedeflere yönelik tedaviler arasında, VEGF'e karşı nötralize edici bir antikor olan Bevacizumab (Avastin) hariç klinik denemeler büyük ölçüde başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Önemli araştırma çabalarına rağmen, glioblastomaların ezici ölümcüllüğünün altında yatan mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır (Heddleston ve ark., 2009).



Şekil 3. GBM tedavisinde kombinasyon tedavilerinin şematik gösterimi (Ghosh ve ark., 2018).

Temozolomid (TMZ), yeni teşhis edilen gliomalarda radyoterapi ile kombine kullanılan standart kemoterapi yöntemidir. Alkilleyici bir ajan olan TMZ, DNA'nın kritik bölgelerindeki guanin'in O6 pozisyonuna metil grubu ekleyerek hasar oluşturur.

Bu hasarlar kanser hücrelerinin G2/M evresinde durdurulmasını sağlayarak apoptozise yönlenmesine yol açarlar (Lee, 2016). Ancak GBM hastalarının uygulanan TMZ kemoterapisine verdikleri yanıtta da farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir (Stupp ve ark., 2005).

2.1.4. GBM kök hücreleri ve tedaviye etkileri

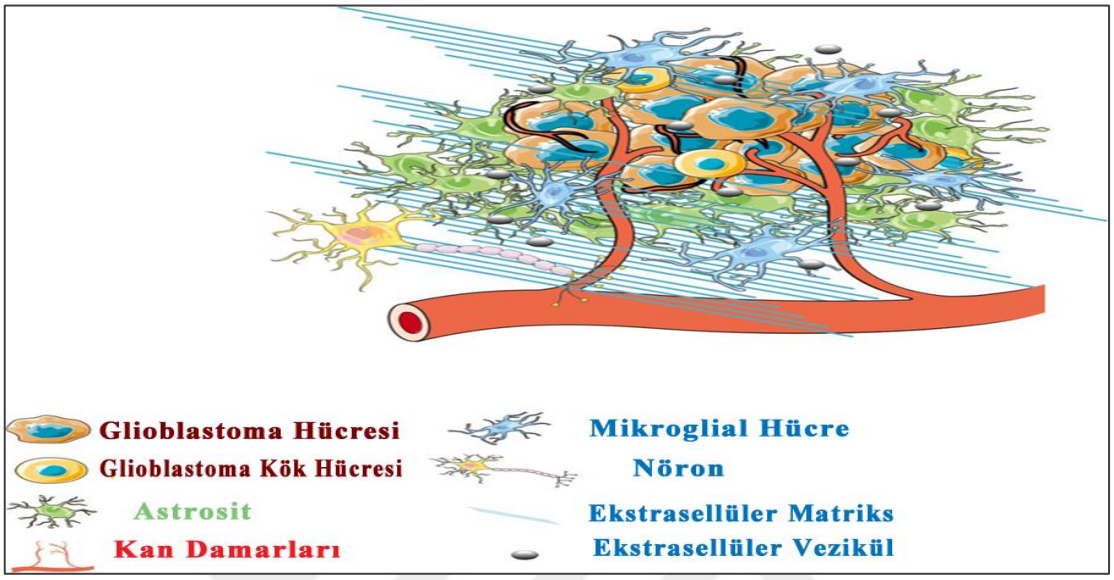
GBM'ler heterojen bir hücre popülasyonu içermektedir. Kendini yenileme özelliği olan bu hücreler kanser kök hücreleri (CSC) olup tümör hücrelerinin rejenerasyonuna, tedavi direncine ve tümörün nüksüne neden olmaktadır (Howard ve ark., 2017). Tekrarlayan hücre bölünmeleri sonucunda meydana gelen mutasyon birikimleri heterojen tümör kitlelerinin oluşumuna neden olmaktadır (McGranahan ve Swanton, 2017). Kanserde artan hipoksi, intratümöral pH, terapötik stres gibi mikro çevre faktörlerinden etkilenen tümör hücrelerinde CD133 ve HIF-2α gibi kanser kök hücre belirteçlerinin gen ifadelerinde de artış olduğu gösterilmiştir (Hjelmeland ve ark., 2011).

CD133 ve HIF-2α, hipoksik koşullarda ifade edilen transkripsiyon faktörleridir. Bu transkripsiyon faktörleri hedef genlerin ifadesini düzenleyerek hücrelerde sağ kalım, çoğalma, motilite, metastaz, metabolizma, pH düzenlenmesi, anjiyogenez, kemoterapötik direnç ile ilişkilendirilir (Ahmed ve ark., 2018).

HIF-2α, insülin reseptörü (IR) ve IGFR ile etkileşime geçebilmesinin yanı sıra bu sinyal yolağının alt efektör moleküllerinden olan rapamisin memeli hedefi (mTOR) ile de hipoksik koşullarda etkileşim içinde olabilmektedir (Soeda ve ark., 2009). CD133 en fazla çalışılan CSC biyobelirtecidir. Aynı zamanda tümör yayıcı ve tümör başlatıcı hücreleri tanımlamak veya zenginleştirmek için deneysel aşamalarda da kullanılır (Tang, 2012).

CSC'ler in vitro ortamda kendini yenileme kabiliyeti ile karakterizedir. CSC' lerde CD133 ve HIF-2α' nın yanı sıra Nestin, SOX2 ve Olig2 gibi kök hücre belirteçleri ve Nanog, Gli1, ve Oct4 gibi transkripsiyon faktörlerinin de ekspresyonlarında artış olduğu saptanmıştır. GBM hücre popülasyonu içinde bulunan kanser kök hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gösterdikleri gösterilmiştir (Alagoz, 2018).

CSC' ler hücresel düzeyde, genel olarak DNA hasar kontrol noktası yanıtının tercihli aktivasyonunu ve DNA onarım kapasitesinin artışını sağlayarak radyoterapi direncine neden olmaktadır (Bao ve ark., 2006).



Şekil 4. Glioblastoma mikro ortamının hücresel heterojenliği (Simon ve ark., 2020).

2.2. Radyoterapi

Radyoterapi (RT) tedavisi hızla çoğalan kanser hücrelerinin normal hücrelere göre radyasyona duyarlı olması temeline dayanarak bir yüzyıldan fazla bir süredir kanser tedavi yaklaşımı olarak kullanılmaktadır (Bernier ve ark., 2004). RT, 1895'te Roentgen'in X-ışınlarını tanımlaması ve 1898'de Marie ve Perie Curie'nin radyumu keşfinden sonra 19. yüzyıl sonuna doğru kullanılmaya başlanmıştır (Connell ve Hellman, 2009).

RT veya iyonize radyasyon (IR) dahil birçok anti-kanser tedavisinin altında yatan mekanizma, hücrelerin ölümünü sağlayan DNA çift zincir kırılmalarının (DSB) indüksiyonudur. DSB'lerin hücre sağ kalımına ve hücresel metabolik mekanizmalara karşı zararlı olduğu bilinmektedir (Pastwa ve ark., 2003). RT, DNA'ya, proteinlere ve fosfolipid membrana doğrudan zarar veren reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS/RNS) üretimine neden olmaktadır. Bu durum hücresel strese bağlı olarak RT'nin hedef hücrede doğrudan DNA hasarı oluşturmasını sağlayabileceği gibi hücrelerin su bileşenlerini iyonlaştırarak serbest radikaller aracılığıyla hedef hücrede dolaylı etki de yaratabilir (Azzam ve ark., 2012). RT kaynaklı DNA hasarı; apoptoz, mitotik felaket,

nekroz, yaşlanma ve otofaji gibi çoklu ölüm mekanizmaları ile ortaya çıkabilecek, radyasyona bağlı hücre ölümüne neden olabilir (Qui, 2015). Kanser hücrelerine verilecek radyoterapi dozu, kanser hücrelerinin çevresindeki doku hücrelerinin RT duyarlılığı ile belirlenir. Çünkü kanser ölümlerinin bir kısmı RT tedavisindeki doz aşımı ve yan etkilerinden kaynaklanmaktadır (Prasanna ve ark., 2012).

Işınlanma tedavisinin etkinliği tümörün mutasyon ve gen ifadesi profiline göre değişkenlik göstermekle beraber ışınlama sonrasında meydana gelen genomik ve gen ifade profili değişiklikleri de hücresel tepkilerin farklılığına neden olabilmektedir. Düşük dozda ve yüksek dozdaki radyasyonun genomik profile, dokuya, zamana ve kişiye göre özgünlük gösterdiği tespit edilmiştir. Hücrelerin ve dokuların radyoterapiye verdikleri yanıtın temel olarak protein düzeyinde hücresel sinyal yolaklarındaki aktivasyon/inhibisyon değişikliklerinden kaynaklandığı da belirtilmiştir (Prise, 2006).

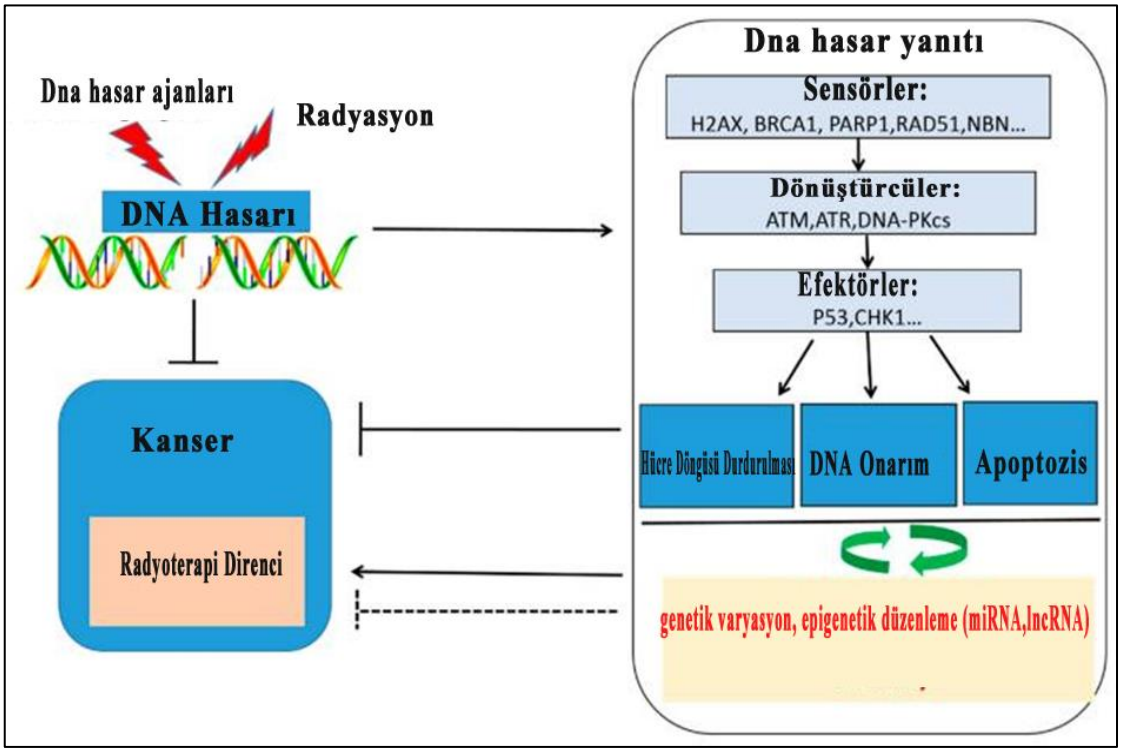
RT, hedef hücrenin yanı sıra tümör mikro çevresine de zarar verebilmektedir. Bu durum radyasyona bağlı iltihaplanmaya neden olabilmektedir. Hipoksik koşullar, RT tedavisinin etkinliğinde en önemli faktördür. Hipoksik koşullarda, DSB'lerin hücresel ölüm yolaklarının indüksiyonundaki etkinliği azalmakta ve radyoterapiye direnç gelişimi söz konusu olabilmektedir (Yoshimura ve ark., 2013).

RT etkinliğini moleküler değişimlerden farklı olarak etkileyen diğer faktörler ise uygulanan toplam doz, fraksiyon başına doz ve ışınlanan hacim, ışınlama bölgesi ve doz homojenliği, eşlik eden kemoterapi ve cerrahi kullanımı, hasta özellikleri (yaş, sigara kullanımı, hemoglobin seviyesi, diyabet, hipertansiyon, vasküler ve bağ dokusu hastalıkları) gibi değişkenlerdir (Barnett ve ark., 2009).

RT, GBM gibi radyoterapiye dirençli, heterojenitesi yüksek, sıklıkla nükseden tümörler için tek başına bir tedavi seçeneği değildir. Tedavi süreçlerinde RT'nin birçok faydası bilinmesine karşılık tümör invazivliğini arttırdığına yönelik araştırmalar da mevcuttur. Radyasyon sonrası GBM'de VEGF ve anjiyotensin seviyelerinin arttığı anjiyogenez ve tümör büyümesine katkıda bulunduğu görülmüştür (Gupta ve Burn, 2018). Bu yüzden RT ile kombine tedaviler ve RT'ye yanıt arttırıcı yaklaşımlar araştırılmaktadır (Chang ve ark., 2007).

2.2.1. GBM kök hücrelerinin radyoterapiye adaptif cevabı

Radyasyon tedavisi çeşitli kanserlerin tedavisinde temel dayanak noktası olmaya devam etmektedir. Radyasyona bağlı oluşan DSB'ler en ölümcül DNA hasarını temsil eder ve onarılmazsa hücre ölümüne yol açar (Jorgensen, 2009). RT'nin indüklediği DSB onarım mekanizmaları homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ) yollarıdır. Bu süreç içerisinde HR doğru onarım sağlarken NHEJ tamir mekanizması bunu her zaman sağlamayabilir (Khanna ve Jackson, 2001).



Şekil 5. DNA hasarının hücresel cevabı (Li ve ark., 2016).

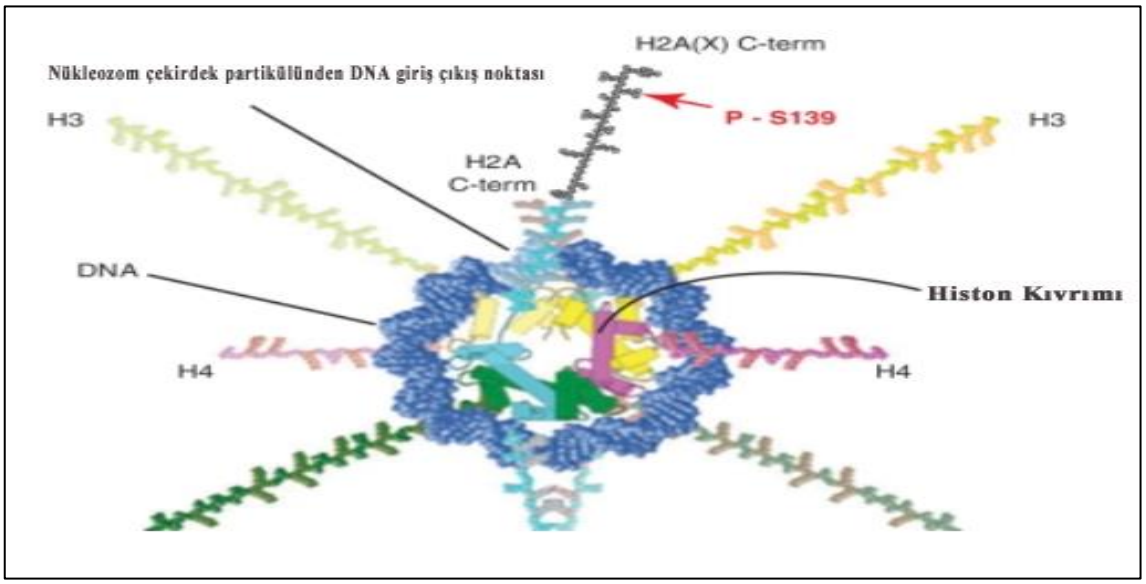
DNA'ya verilen hasar, onarım kapasitesinden büyük olursa replikasyon ve transkripsiyon bloke edilir. p53, ATR, ATM ve DNA-PK gibi kinaz aktivitesi olan proteinler veya transkripsiyon faktörleri bu DNA hasarları için sensör görevi görüp DNA tamir mekanizması yolaklarının aktivasyonunu gerçekleştirir (Li ve ark., 2016). DSB'ler DNA hasarı sensör proteinleri tarafından tanınarak DNA kırık bölgesinde NBS1, Mre11 ve Rad50 proteinlerinin kompleks (MRN) oluşturmasını sağlar. Bu kompleks oluşumu, ATM'nin fosforilasyonu ve o bölgeye çekilmesi için şarttır (Lavin ve ark., 2007). Bu kompleks, DNA hasarının tanınmasının ilk işaretini temsil eden

H2AX proteinini fosforile ederek γH2AX ifadesini arttırır. Bu olayları takiben BRCA1, MDC1 ve 53BP1 gibi aracı proteinlerin aktivasyonu sonucunda DNA tamir mekanizmasına ait sinyal yolağının akışı sağlanır (Facchino ve ark., 2010).

MDC1, 53BP1 ve RAD51 dahil olmak üzere diğer DSB onarım proteinleri daha sonra DNA kırılma uçlarına çekilir ve γH2AX ile birlikte iyonlaştırıcı radyasyona bağlı odaklar (IRIF) oluşturur (Nickoloff ve ark., 2017). γH2AX ile IRIF indüksiyonunun ilişkilendirilmesine yönelik yapılan in vitro tümör çalışmalarında, indüklenen γH2AX odaklarının sayısı ne kadar yüksekse veya kaybolma oranı ne kadar yavaşsa tümör hücrelerinin radyasyona duyarlılığının o kadar fazla olduğu bildirilmiştir (Van Oorschot ve ark., 2016).

2.2.2. Radyoterapi direnç belirteci: H2AX

H2AX, H2A ailesine ait bir histon memeli varyantıdır. Histonlar kromatininin temel birimi olan nükleozomları oluşturan proteinlerdir. Histonlar DNA'yı sararak yüksek korunumlu hale getirirler. H2AX, DNA hasarı sonucunda hasarlı bölgeye toplanan DNA tamir mekanizmasına ait protein kompleksleri tarafından fosforile edilerek aktivasyonu sağlanır. (Kuo ve Yang, 2008).

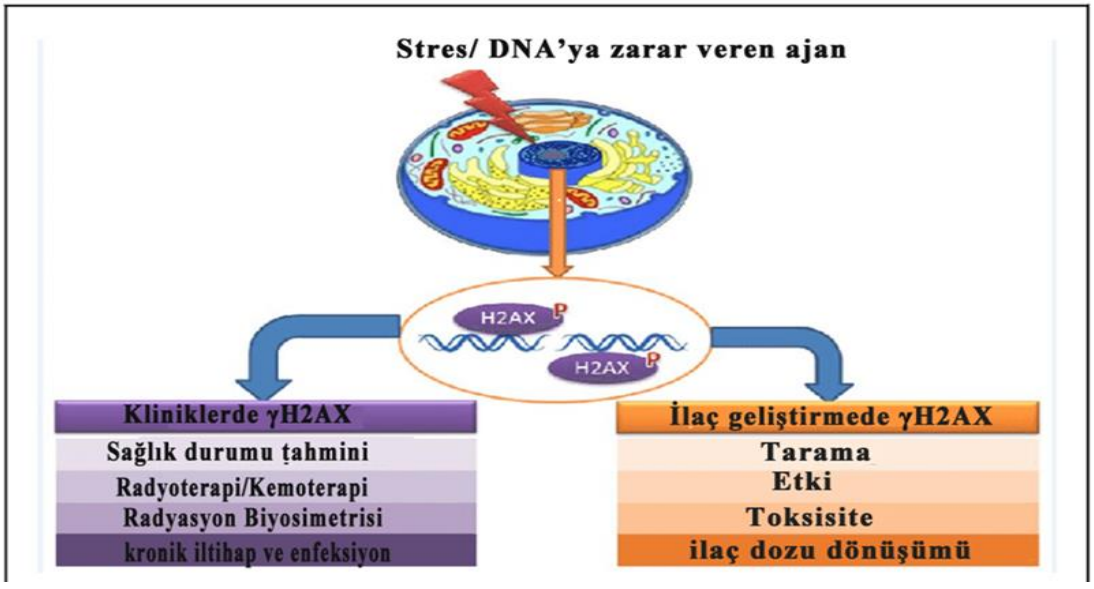


Şekil 6. H2AX'in nüklozomdaki yeri ve C-terminal bölgesindeki serin 139 pozisyonu (Kinner ve ark., 2008).

Bu fosforilasyon H2A ailesinden sadece H2AX varyantlarına özgü olup, proteinin C terminalinde korunmuş SQE motifindeki 139. serin aminoasidi üzerinden gerçekleşir (Song ve ark., 2007). DNA hasarı durumunda bu motif PI3K üyesi olan ATM, ATR ve DNA-PK kinazlar tarafından tanınır (Marechal ve Zou, 2013). Spesifik fosforilasyon γ-fosforilasyon veya gamma fosforilasyon olarak ifade edilerek γH2AX terimi kullanılır (Georgoulis ve ark., 2017).

γH2AX, onarım ve kromatin bütünlüğünü sağladıktan sonra memeli hücrelerinde fosfataz 2A (PP2A) tarafından defosforillenerek tekrar H2AX'e dönüştürülür (Chowdhury ve ark., 2005). H2AX, gamma fosforilasyonunun DSB dışındaki DNA hasarı tiplerinde oluşmadığı saptanmıştır ve bu yüzden γH2AX oluşumu DSB'lere özgü bir durum olarak tanımlanmaktadır (Firsanov ve ark., 2011).

γH2AX, DNA hasarının değerlendirilmesi için çeşitli klinik vakalarda tedavi protokolünün etkinliği, doz standardizasyonu veya optimizasyonu ayrıca çevre dokularla ilişkili toksisiteyi belirlemek için güçlü bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Yashavarddhan ve ark., 2017).



Şekil 7. Klinik ve ilaç keşfinde biyobelirteç olarak γH2AX (Yashavarddhan ve ark., 2017).

Yapılan çalışmalarda H2AX geni eksik farelerin yaşayabildiği ancak radyasyona duyarlılık, büyüme geriliği, erken yaşlanma, immün sistem yetmezliği ve genomik

dengesizlik gibi fenotipik etkiler gösterdiği saptanmıştır (Celeste ve ark., 2002). Ayrıca son yıllarda H2AX'in DSB biyobelirteci olmasının yanı sıra eşey hücrelerinde cinsiyet kromozomların inaktivasyonu, mitozda kromatin düzenlenmesi, nöral kök hücre gelişimi, asimetrik kardeş kromozom ayrımı gibi görevlerinin de mevcut olduğu belirlenmiştir (Turinetto ve Giachino, 2015).

2.3. GBM'de Etkili Sinyal Yolakları

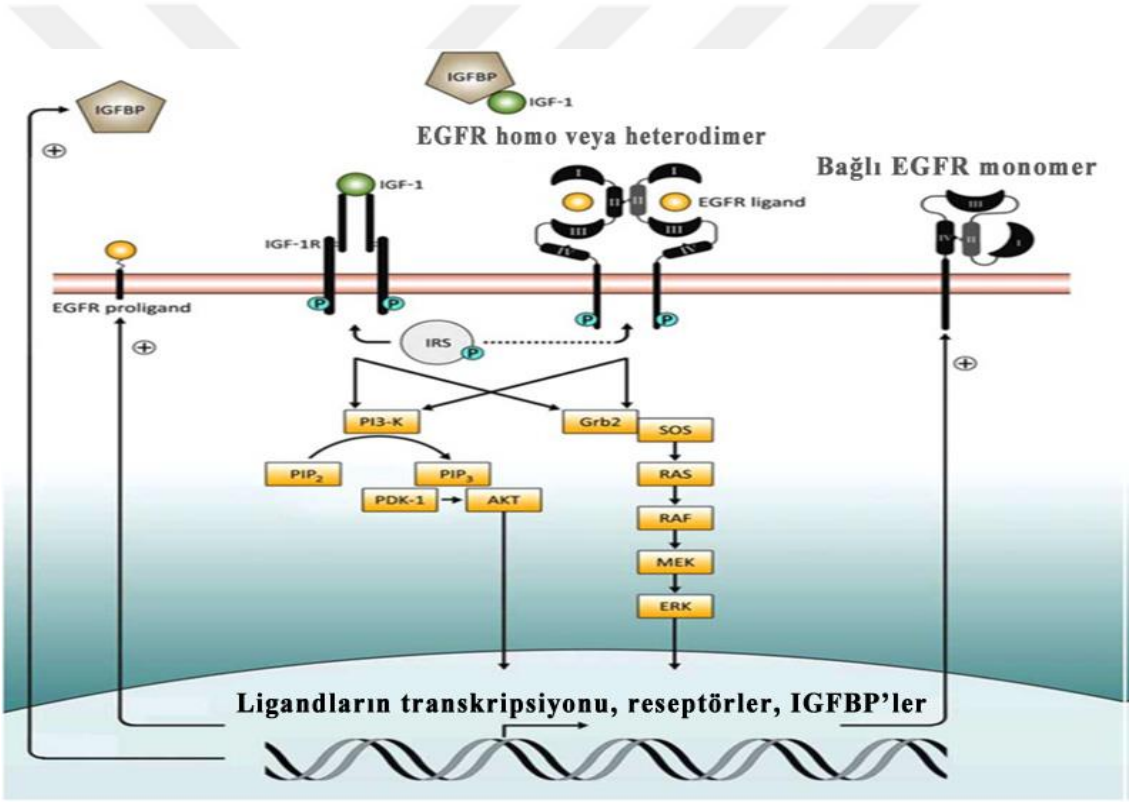
Gliomalarda aktivasyonu sıklıkla görülen sinyal yolakları, p53, reseptör tirozin kinaz (RTK) , Ras/PI3K sinyal yolağı ve retinoblastoma (RB) yolaklarıdır. PI3K-Akt sinyal yolağı, apoptoz, hücre çoğalması, farklılaşma, yer değiştirme ve metabolizma dahil olmak üzere çok sayıda hücresel fonksiyonda görev alan ve evrimsel olarak korunmuş bir sinyal kaskatıdır. PI3K-Akt sinyalinin aktivasyonu, GBM'ler de dahil olmak üzere birçok tümör tipinde kötü prognoz ile ilişkilidir (Venkatesan ve ark., 2016). PI3K-Akt sinyal yolunun birincil negatif regülatörü olan PTEN, önemli bir tümör baskılayıcıdır. Farklı tip kanserlerde olduğu gibi PTEN inaktivasyon mutasyonları GBM'de de yaygın olarak görülmektedir (Leslie ve Downes, 2004).

Tümör oluşumunda en önemli mekanizmalardan bir tanesi de RTK'larda meydana gelen gen aktivasyon mutasyonları ve gen ifadesi artışlarıdır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), bir RTK'dır ve GBM vakalarının %40'ında EGFR mutasyonuna rastlanmaktadır (Bozkurt ve ark., 2013). GBM'de EGFR gen mutasyonlarının yanı sıra EGFR ifadesi hem tanı da hem de prognozun belirlenmesinde önem taşımaktadır. Benzer şekilde, EGFR ifade artışına neden olan EGFR gen amplifikasyonları hücre proliferasyonu ve kötü prognoz ile karakterize edilmiştir (Mazzoleni ve ark., 2010).

İnsülin, merkezi sinir sisteminde önemli işlevlere sahiptir ve insüline verilen yanıtın bozulması nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde kritik rol oynamaktadır. RTK üyesi olan IR ve IGF-IR'nin ekspresyon artışları EGFR'de olduğu gibi farklı tip kanserlerde yaygın olarak görülmekte olup, genellikle kötü prognoz ile ilişkilidir (Gong ve ark., 2016).

Yapılan bir çalışmada EGFR artışı gösteren hücre hatlarında IGFR inhibisyonu sonucunda tümör hücrelerinin EGFR inhibitörlerine duyarlı hale geldiği gösterilmiştir. Bu durum EGFR ve IGFR arasında bir ilişki olduğunu düşündürmüş olup, EGFR ve ailenin diğer üyelerinin arasında IGF-IR yolu ile etkileşim içerisinde olduğu gösterilmiştir (Ma ve ark., 2016).

EGFR, IGFR ve ligandlarının etkileşim içerisinde olması alt sinyal yolaklarında da ortak hedeflerin uyarılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle EGFR artışıyla ilişkilendirilen kanser türlerinin tedavisinde sadece EGFR inhibisyonunun yeterli olmayıp IGFR inhibisyonunun da gerçekleştirilmesinin tedavi etkinliğini arttıracağı düşünülmektedir (van der Veeken ve ark., 2009).



Şekil 8. EGFR ve IGFR ortak sinyalizasyonu (van der Veeken ve ark., 2009).

2.3.1. GBM ve insülin sinyali

İnsülin metabolik homeostazisden sorumlu anabolik bir hormondur (Görgişen ve ark., 2017). Hemen hemen tüm memeli hücrelerinde insülin reseptörü (IR) mevcuttur ve insülin sinyaline yanıt verirler. İnsülin metabolizması hücresel sağ kalım, çoğalma ve

farklılaşma, apoptoz gibi hücresel metabolizma için gerekli olan süreçleri düzenlemektedir (Haeusler ve ark., 2018). Kanser hücresi, glikolizin artması ve oksidatif fosforilasyonun azalmasına bağlı olarak yüksek glikoz tüketimine yol açan düzensiz metabolizma ile karakterize edilir (Zhang ve ark., 2018).

İnsülin sinyalinde meydana gelen değişiklikler nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde oldukça önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden insülin sinyali regülasyonu beyin hücrelerinin homeostazisi için kritik rol oynamaktadır (de la Monte, 2009). İnsülin sinyali, insülin ve insülin benzeri peptidler olarak adlandırılan IGF ligandlarının hedef hücrelerinin plazma membranı üzerindeki IGFR veya IR'ye bağlanmasıyla başlar (Singh ve ark., 2014).

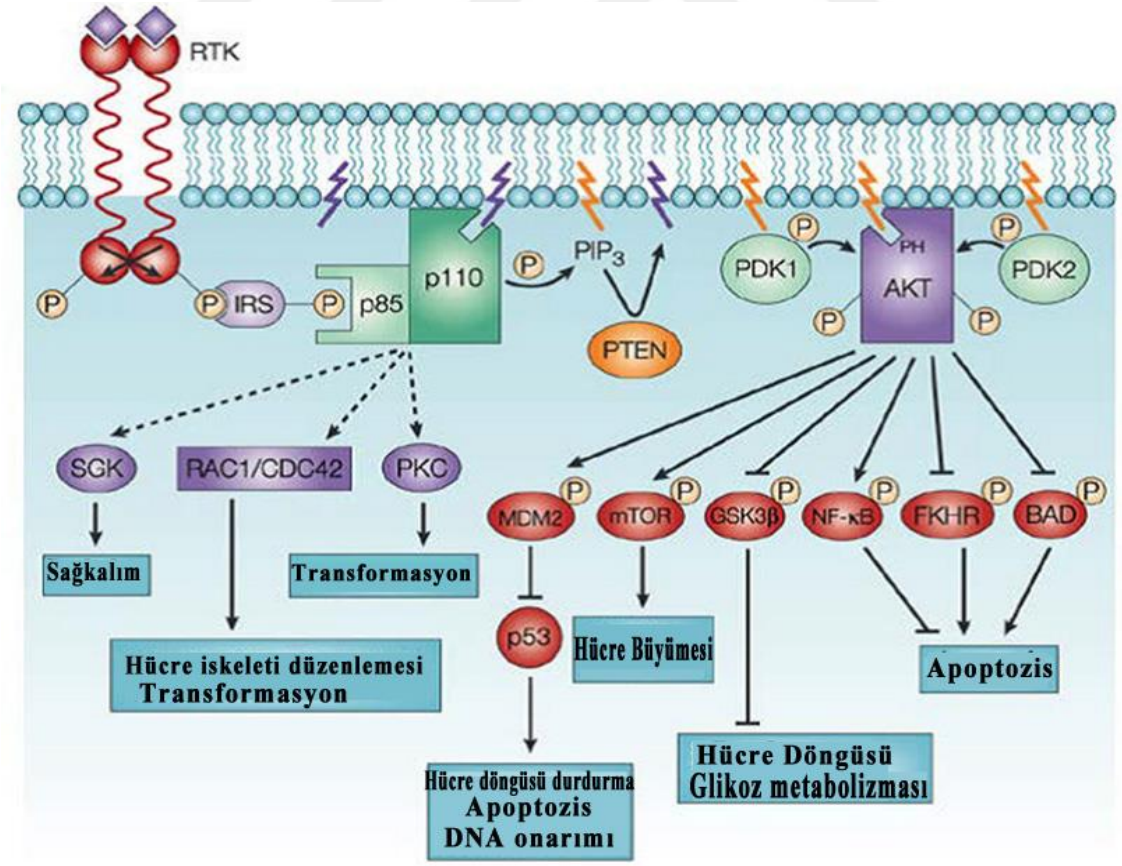
IGFR, insan dokularında yaygın eksprese edilen iki α birimi ve iki β alt biriminin disülfit bağlarıyla bağlandığı homodimerdir. α alt birimi ligand bağlanma domaini içerirken, β alt birimi tirozin kinaz aktivitesine ve adaptör proteinlerle etkileşimi sağlayan C-terminal bölgeye sahiptir (King ve Wonk, 2012).

Ligandlarıyla etkileşim sonrası aktifleşen reseptör dimerleşir ve intraselüler kısımda, src homoloji 2 (SH2) veya fosfotirozin bağlama (PTB) domainleri bulunan adaptör sinyal moleküllerinin bağlanabileceği bölgeler oluşturur (Chakravarti ve ark., 2002). Bu bölgeye bağlanan adaptör proteinlerin başında insülin reseptör substratları (IRS) gelmektedir. IRS proteinleri PTB bölgelerinden reseptörlerin fosforile edilmiş NPXY motifine bağlanır ve reseptör tarafından tirozin fosforilasyonuna uğrayarak aktif hale gelir. Tirozinlerinden fosforile olan IRS proteinleri PI3K'nin katalitik alt birimi p110'u aktive ederek p85 alt biriminin bağlanmasını sağlar (Hakuno ve Takahashi, 2018).

PI3 kinazlar, fosfatidilinositol-4,5 bifosfat (PIP2)'ı fosforile ederek fostatidilinositol-3,4,5 trifosfat (PIP3)'ın üretimini sağlar. İkincil haberci bir fosfolipid olan PIP2'den fosfolipaz C (PLC) enzimi ile hidrolizi sonucu diaçilgliserol (DAG) ve inositol 1,4,5 trifosfat (IP3) olmak üzere iki adet haberci oluşumu sağlanır. Bu haberciler protein kinaz C (PKC) ve kalsiyum salınımını sağlar (Sümer Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010).

DAG, PKC ailesi üyelerini (serin ve treonin kinazları) aktive eder. PKC, diğer hücre içi hedefleri MAP kinaz yolağını aktive ederek gen ekspresyonunu ve hücre çoğalmasını etkileyecek transkripsiyon faktörlerinin fosforillenmesini sağlar (Li ve ark., 2009). Bu aralıktaki protein PTEN ise tümör baskılayıcı olarak görev alır ve PIP3'ü PIP2'ye çevirerek sinyalin negatif düzenlemesini sağlar. Aktive edilmiş PIP3, PDK'yi aktive eder. PDK1 ise, AKT'yi 308. pozisyonundaki treonin aminoasitinden fosforile ederek primer aktivasyonu sağlar (Carnero ve Paramio, 2014).

AKT, mTOR aktivasyonu sağlar ve geri bildirim olarak 473 pozisyonundaki serini fosforillenerek tam aktivasyonunu kazanır. AKT, glikoz taşıyıcılarını (GLUT) fosforile ederek glikoz alımını düzenler. Bu nedenle AKT aktivasyonu, insülin metabolik işlevlerinden birincil derecede sorumludur (Fang ve ark., 2012). Ayrıca fosforile AKT, FOXO, GSK3, p27, BAD gibi birçok proteini fosforile ederek hücresel metabolizmada görevli fonksiyonel yolakları düzenler. Aynı zamanda proapoptotik proteinleri inhibe ederek hücre sağ kalımını sağlar (Xu ve ark., 2020).



Şekil 9. Tirozin kinaz reseptör yolakları (Sümer-Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010).

Tirozin fosforile IRS'leri tanıyan diğer sinyal molekülleri Grb2'dir. Grb2, RAS'ı aktive ederek SOS kompleksi oluşturur. Aktif hale gelen RAS mitojenik aktivitelere yol açan MAPK/ERK yolunu aktive eder (Giubellino ark., 2008). Beyin enerji kaynağı olarak sadece glikoz kullanır ve yapılan çalışmalarda GBM hücre hatlarında normal hücrelere kıyasla daha fazla IGF-IR ve IGF-IIR'nin eksprese edildikleri gösterilmiştir (Maris ve ark., 2015). RTK'lar normal hücresel metabolizmaların düzenleyicisi olsa da RTK genlerinin mutasyonel aktivasyonu GBM'lerin kötü prognozuna katkı sağlanmaktadır (Cheng ve Guo, 2019).

Literatürdeki çalışmada ektopik insülin reseptör substrate 1 (IRS1) proteininin arttırılması ile Akt yolağı aktivasyonu gliomaların sağ kalımını desteklediği kanıtlanmıştır (Görgişen ve Yaren, 2020). GBM tümörleri genomik mutasyonların yanı sıra insülin sinyal yolağındaki proteinlerin ekspresyon artışı veya azalışı ile hücre sağ kalımını etkilemektedir. Glioblastoma hücrelerinde MAPK'ın ekspresyon artışı gerçekleştirdiği gözlenerek bu sinyal yolağının alt efektör proteini olan ERK1/2'nin fosforilasyonunu arttırması sebebiyle hücre göçünü ve sağ kalımını arttırdığı saptanmıştır (Yang ve ark., 2019). Ayrıca glioma tümörlerinde sıklıkla görülen PI3K sinyal yolağı üyelerinin ekspresyon artışı tedavi direnci ve apoptoz inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Artan PI3K sinyali fosfo-Akt ekspresyon artışı gerçekleştirerek tümör nüksüne neden olmaktadır (Chakravarti ve ark., 2004). Artan RAS aktivasyonu yüksek dereceli glioblastomalarda yaygındır ve MAPK yolağı aracılığı ile RAS aktivasyonu tümör büyüme, farklılaşma ve hücre sağ kalımını desteklediği çalışmalarda gösterilmiştir (Rivera ve Pelloski, 2010).

2.4. İnsülin Reseptör Substrat (IRS)

IRS proteinleri transmembran reseptörleri aracılığıyla ekstrasellüler sinyalleri intrasellüler alana ileterek çoklu hücresel süreçleri düzenleyen adaptör moleküllerdir. IRS proteinleri, insülin ve IGF1 uyarımında hücre sinyalizasyonunu başlatan moleküllerdir (Machado-Neto ve Traina, 2013). IRS proteinleri, altı üyeden (IRS1-6) oluşan bir sitoplazmik protein ailesidir (Lee ve White, 2004). Aile elemanları, N terminal bölgelerinde reseptör ile etkileşim sağlayan ve evrimsel açıdan yüksek derecede korunmuş pleckstrin homoloji (PH) alanı ve fosfotirozin bağlama (PTB)

alanına sahiptir. PH alanı, temel olarak ilgili reseptör ve membran fosfolipidleri ile etkileşime geçmektedir (Machado-Neto ve ark., 2018). PTB alanı ise, aktive edilmiş reseptörler üzerinde NPXY motifleri ile etkileşime giren bölgeleri sayesinde proteinin reseptöre sıkı bağlanmasını ve IRS proteinlerinin tirozin fosforilasyonuna uğrayarak aktivasyonunu sağlamaktadır (Pirola ve ark., 2004).

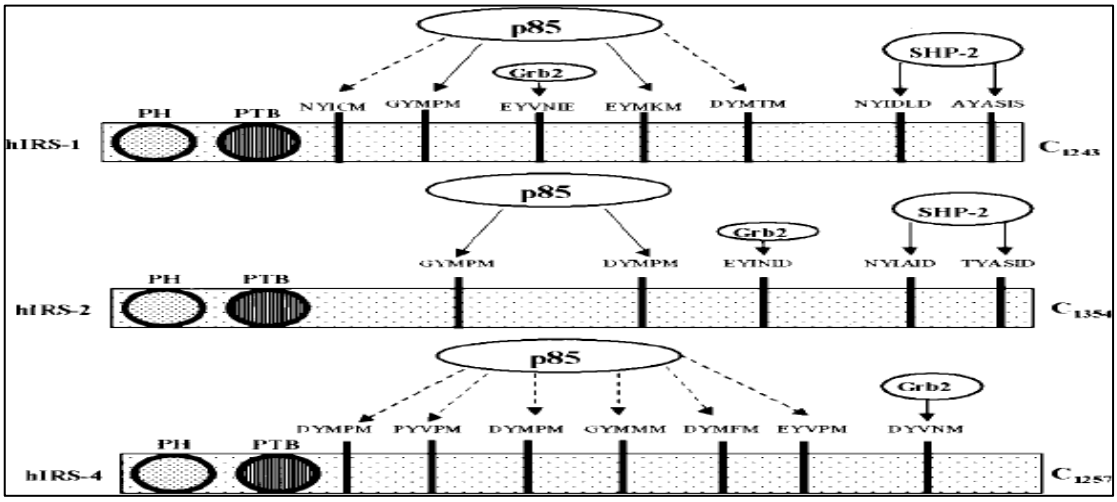
Tirozin fosforilasyonuna uğrayan IRS proteinleri, SH2 bölgesi içeren PI3K ve Grb2 proteinleri ile etkileşime geçerek PI3K/Akt/mTOR ve MAPK sinyal yolaklarının aktivasyonunu gerçekleştirir (Wagner ve ark., 2013). IRS proteinleri hücrede fonksiyonel olarak büyüme, metabolizma, hayatta kalma ve hücre çoğalması gibi süreçleri düzenlerken aynı zamanda steroidler, sitokinler, hormonlar ve integrinler dahil çeşitli uyaranlara karşı da hücresel yanıtı sağlarlar. IRS1, ailenin ilk klonlanan ve tanımlanan üyesidir (Shaw, 2011). IRS2, insülin uyarımına yanıt veren bir fosfoprotein olarak IRS1 geni bulunmayan farelerde tanımlanmıştır. IRS1 ve IRS2 insan hücrelerinde yaygın ekspresyon göstermektedir. IRS3, insanlarda psödogen halinde bulunmaktadır. IRS4 ifadesi ise beyin, böbrek, timüs ve karaciğer ile sınırlıdır (Boucher ve ark., 2014).

İnsülin direnci oluşumunda temel hücresel mekanizma IRS sinyalinde meydana gelen bozukluklardır (Görgişen ve ark., 2018). Normal fizyolojik süreçte IRS proteinlerinin tirozin fosforilasyonları sinyali pozitif yönde etkilerken, serin/treonin fosforilasyonları ise genellikle sinyal iletimi üzerinde negatif etki yapmaktadır (Boura-Halfon ve Zick, 2009). Bu sinyal regülasyonunun bozukluğu insülin direnci, obezite ve kanser gibi patolojik süreçlerin oluşumuna neden olmaktadır (Poloz ve Stambolic, 2015).

Yapılan çalışmalar IRS proteinlerinin nüklear lokalizasyon sinyalleri aracılığıyla çekirdeğe göç edebildiklerini ve yardımcı faktörler aracılığıyla DNA'ya bağlanarak transkripsiyon faktörü gibi davranabileceği gösterilmiştir (Morelli ve ark., 2004). Çekirdeğe göç eden IRS1 ve IRS2'nin kanser ilerlemesinin farklı aşamalarında yer alan onkogenlerin transkripsiyonunu düzenlediği ve onkogenik sinyalleri yükselttiği bilinmektedir (Mardilovich ve ark., 2009).

IRS1'in aşırı ekspresyonu veya ektopik ekspresyonu, hücrelerin yumuşak agarda koloniler oluşturma ve farelerde tümör oluşturma gibi hücre transformasyonuna neden olmaktadır (Valentinis ve ark., 2000). Nüklear IRS1, DNA'nın polyomavirüs JC-T antijeni kaynaklı çift zincirli kopmasında RAD51 ile etkileşerek DNA onarımını zayıflatır (Trojanek ve ark., 2006). IRS1 ve IRS2 her dokuda eksprese edilir ve insüline bağımlı mitogenezin birincil aracıları ve glikoz metabolizmasının düzenleyicisi olarak bilinmektedirler. IRS1 geni susturulmuş fareler boyut olarak daha küçük olup ve insülin direncinin geliştiği saptanmıştır. IRS2 eksikliği olan farelerin boyutları normaldir ancak nöronal hücre çoğalmasında %50'lik bir azalmanın sonucu olarak beyin kusurları vardır (Lavin ve ark., 2016).

IRS1 ve IRS2 üzerine yapılan çalışmalar fazla olmasına karşın IRS4 proteini üzerine gerçekleştirilen çalışmalar oldukça azdır. IRS4 proteini HEK293 hücrelerinde insüline verdiği hızlı yanıt sonucunda tanımlanmış 160 kDa'luk bir proteindir. IRS1 ve IRS2'nin aksine, IRS4 proteini tirozin fosfataz SHP2 bağlama bölgesi içermemektedir. Bu nedenle, IRS1 ve IRS2 ile karşılaştırıldığında, IRS4'ün farklı hücresel sinyal yolaklarını uyarabileceği ve daha kuvvetli bir sinyal akışı sağlayabileceği düşünülmektedir (Li ve ark., 2018).



Sekil 10. İnsan IRS1, IRS2 ve IRS4'ün şematik diyagramı (Sesti ve ark., 2001).

IRS4'ün fizyolojik etkileri hala tam olarak bilinmemektedir. Bazı çalışmalar IGF sinyalinde IRS4'ün IRS1 ve IRS2'nin fonksiyonunu engellediğini belirtilmektedir. Miyeloid hücrelerde yapılan bir çalışmada IRS4'ün hücre sağ kalımını Grb2 ve PI3K

üzerinden gerçekleştirirken, SHP2 veya fosfolipaz C ile etkileşime girmemesi nedeniyle farklı sinyal yolaklarını da uyarabileceğine dair öngörüde bulunulmuştur (Dörpholz ve ark., 2017).

Tablo 1. İnsan kanserlerinde IRS ifadesi (Mardilovich ve ark., 2009).

Kanser	IRS İfadesi	Notlar
Meme	⬆ IRS-1 ⬆ IRS-1 ⬇ IRS-1	• İyi diferansiye primer tümörler • Nükleer IRS-1, iyi prognozla ilişkilidir • Kötü diferansiye, yüksek dereceli tümörler
Hepatoselüler	⬆ IRS-1 ⬆ IRS-2 ⬆ IRS-4	• HCC'de mRNA / protein arttı • HCC'de mRNA / protein arttı • HCC'de mRNA / protein arttı
Akciğer	⬇IRS-1	• Daha büyük (evre 1B) tümörler, skuamöz hücreli karsinom
Medulloblastoma	⬆ IRS-1	• Çekirdekte polyoma JCV T-antijeni ile ortak lokalize
Mezotelyoma	⬆ IRS-1 ⬆ IRS-2	• Malign plevral mezotelyomada artmış mRNA • Malign plevral mezotelyomada artmış mRNA
Yumurtalık	⬆ IRS-1	• Kötü huylu epitel tümörlerinde protein artışı
Pankreas	⬆ IRS-1 ⬆ IRS-2	• mRNA 7/16 tümörde arttı • Duktal benzeri kanser hücrelerinde mRNA / protein artışı
Prostat	⬆ IRS-1 ⬆ IRS-2	• Tümörlerde ve metastazlarda protein artışı • Protein, artan Myc ekspresyonu ile ilişkilidir
Böbrek	⬆ IRS-2 ⬆ IRS-5	• Berrak hücreli karsinomlarda artmış mRNA • Berrak hücreli karsinomlarda artmış mRNA

IRS1 ve IRS2 yaygın ifade edilenin aksine IRS4 ifadesi çok sıkı düzenlenir. Bu durum IRS4 geni susturulmuş farelerin anormal fenotipik özelliklerinin IRS1 ve IRS2 geni susturulmuş farelere göre daha az olmasının kanıtıdır (Ikink ve Hilkens, 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalar IRS4'ün, kanser patogenezi ve hiperplazi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. IRS1 ve IRS2'de olduğu gibi IRS4 ekspresyon artışı da meme, akciğer, kolorektal ve hepatoselüler kanser gibi farklı kanser tipleri ile ilişkilendirilmiştir. IRS4 ifadesinin yanında DNA dizileme çalışmaları, IRS4 geninin cis

düzenleyici bölgelerinde çok sık delesyonların söz konusu olduğunu göstermiş ve IRS4'ü onkogenik bir sürücü olarak belirlemiştir (Sanmartin-Salinas ve Guijarro, 2018). Retroviral ektopik ekspresyonu sağlanan IRS4'ün hücrelerde büyüme faktörü yokluğunda bile PI3K aracılı sinyal yolağını indükleyebildiği gösterilmiştir. Ayrıca yüksek IRS1 ve IRS2 ifadelerinde rağmen PI3K'in IRS4'e olan afinitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum IRS4'ün kanser gelişiminde oldukça önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Hoxhaj ve ark., 2013). HepG2 (Hepatosellüler karsinom) hücrelerinde IGF varlığında IRS4'ün ERK aktivasyonunu PKC sinyal yolağı aracılığıyla PI3K ve Grb2 yolaklarından bağımsız indükleyebildiği gösterilmiştir. Bu durum IRS4'ün IRS1 ve IRS2'den farklı sinyal yolaklarının indüksiyonunu da sağlayarak hücre sağ kalımını ve çoğalımını uyardığının göstergesidir (Cuevas ve ark., 2007).

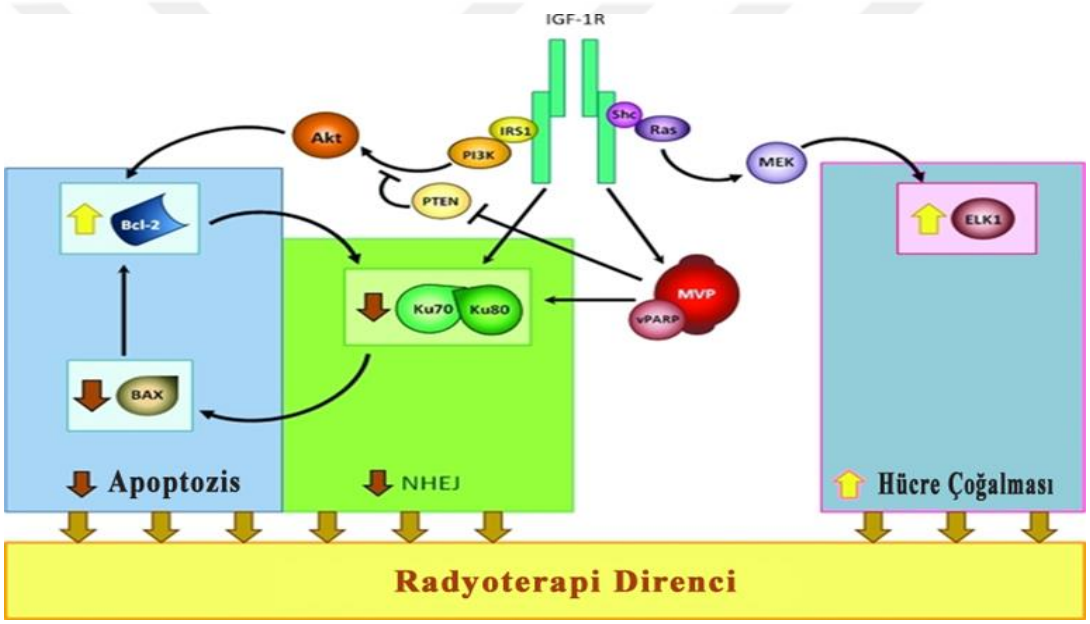
2.5. Radyoterapi Direnci ve İnsülin Sinyal İlişkisi

Radyoterapi direncinde birçok hücresel sinyal yolağı ve bu yolakların birbirleriyle etkileşimi rol oynamaktadır. Bu yolakların başında DNA tamir mekanizması sinyali, PI3K sinyali, apoptotik sinyaller, reseptör tirozin kinaz sinyalleri, stres sinyalleri, hücre döngüsü evreleri, MAPK/ERK sinyali, SAPK/JNK sinyali ve NKκB sinyali gelmektedir (Biau ve ark., 2017).

PI3K, ikincil bir mesajcı olup AKT proteinin aktivasyonunu sağlamaktadır. AKT ise antiapopototik proteinlerden BCL2 ifadesini arttırıp, proapoptotik BAD inhibisyonunu ile apoptozisi baskılamaktadır. Böylece PI3K aracılı AKT aktivasyonu, IGFR sinyalinin antiapoptotik etkisini göstermekte ve radyoterapi direncine de neden olmaktadır (Krakstad ve Chekenya, 2010).

Tonoz proteinleri 13 MD'lik bir kütleye sahip ribonükleoprotein parçacıklarıdır. Memelilerde MVP, VPARP, vRNA olmak üzere üç proteinden oluşur. Majör tonoz protein (MVP) temel tonoz proteini olarak bilinmesinin yanı sıra kanser tedavisinde kemoterapi ve radyoterapi direnci ile sıklıkla ilişkilendirilmiştir. MVP, aktifleşen IGFR sinyali ile birlikte apoptozun inhibe edilmesini sağlayarak radyoterapiye karşı direnç oluşumunda etkin bir protein olduğu saptanmıştır (Lara ve ark., 2011).

Ku70/80 heterodimeri DSB tamirinde NHEJ mekanizmasında anahtar rol oynamaktadır. Yapılan çalışmada Ku70/80 proteinlerinin MVP proteini ile arasında bir ilişki olduğu MVP ekspresyon artışının Ku70/80 ekspresyonunu azaltarak DNA onarımını zayıflattığı gösterilmiştir (Lloret ve ark., 2009). IGFR sinyal yolağının aktivasyonundaki artış DNA tamir mekanizmalarından HR ve NHEJ onarım mekanizmalarını hızlandırarak DNA onarım etkinliğini arttırmaktadır. Prostat kanseri hücre hattı üzerinde yapılan çalışmada, IGF-IR yolağı inhibisyonunun NHEJ tamir mekanizmasının baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumun hücrelerde γH2AX oluşumunu azaltarak radyoterapi duyarlılığını arttırdığı saptanmıştır (Chitnis ve ark., 2014).



Şekil 11. RT direncine yol açan IGF-IR ile tetiklenen ana sinyal yolakları (Valenciano ve ark., 2012).

Osuka ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada, tekrarlayan radyoterapi muamelesi sonucunda, kanser kök hücrelerinde insülin büyüme faktörü (IGF) gen ekspresyonunda artışa bağlı olarak AKT aktivasyonunda artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum kanser kök hücrelerinin radyoterapiye olan direncini arttırmıştır (Osuka ve ark., 2013).

IGFI/IGF-IR sinyal yolunun inhibitörlerinin radyoterapi ile kombinasyonlu kullanımı kanser tedavisinde umut verici yeni bir tedavi yaklaşımı olarak kabul

edilmiştir. Ayrıca tedavinin etkinliği klinik öncesi ve sonrasında araştırma ve takip gerektirmektedir (Raju ve ark., 2015).

DSB ile IGFR sinyal yolağı ilişkisi üzerine yapılan çalışmada IGFR aktivasyonuna bağlı olarak tirozin fosforilasyonuna uğrayan IRS1 proteininin nükleusta HRR'den sorumlu RAD51 proteini ile interaksiyona girdiği ve DSB bölgesinde toplanmasını sağladığı gözlemlenmiştir. Bu durum IGFR bağımlı IRS1 aktivasyonunun HRR mekanizmasını desteklediğini göstermektedir. IGF uyarımı ya da IRS1 aktivasyonunun olmadığı durumlarda RAD51'in DSB bölgesinde toplanmadığı saptanmıştır (Tojanek ve ark., 2003). Bu veriden yola çıkılarak yapılan Gorgisen ve arkadaşları tarafından IRS1 ektopik ekspresyonu sağlanan GBM hücrelerinde IRS1 artışının radyoterapiye direnç geliştirdiği gösterilmiştir. Dolayısıyla insülin sinyal düzenlenmesinin artması ile DNA onarımı arasında sıkı ve kritik bir ilişki olduğu açıktır (Görgişen ve ark., 2019).

Yapılan birçok çalışmada IRS protein ailesinin üyelerinden IRS1 ve IRS2'nin yaygın ifade edilmesi nedeniyle kanser gelişimi ve kanser tedavisine karşı yanıtlarına dair bilgiler bulunmaktadır. IRS4 proteini hakkındaki bilgiler oldukça kısıtlıdır. IRS4'ün kanser gelişimi ile ilgili literatürde bazı çalışmalar yer alırken kanser tedavisi üzerindeki rolü henüz bilinmemektedir. Bizler bu çalışmamızda GBM'de IRS4 proteinin radyoterapi tedavisindeki rolünü belirlemeyi amaçlıyoruz.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. pcDNA Flag Tagged İnsan IRS4 Ekspresyon Vektörünün Filtre Kağıdından Sökülmesi

Kullanılan solüsyonlar:

Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris-CI (pH 7.5)

1 mM EDTA

Uygulama

IRS4 ekspresyon vektörü whatman filtre kağıdına emdirilerek temin edilmiştir. Plasmid 56°C derecede TE tamponu içerisinde bekletildi. Vortekslenerek çözüldükten sonra -80°C' ye kaldırılarak muhafaza edildi.

3.2. Kompetan Hücre Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonlar:

1. 50 mM $CaCI_2$ / 10 mM Tris (pH: 7.4)
2. LB (Luria Bertani) Besiyeri : % 2.5 olacak şekilde hazırlanıp, otoklavlandı
3. %100 Gliserol

Uygulama

- 15 ml LB besiyeri falkon tüpe konuldu.
- Bu tüplerden birine 20 µl DH5α E.coli suşu ilave edildi ve bir falkon tüp ise negatif kontrol olarak kullanıldı.
- Falkon tüpler 1 gece boyunca 37°C de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda E.coli bakterilerinin ürediği falkon tüp 30 dakika buzda bekletildi ve sonrasında 4000 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Pellet üzerine 9 ml 50 mM $CaCI_2$ / 10 mM Tris ve 1 ml gliserol içeren solüsyon eklenerek buzda bekletildi.

- Hücreler buzda soğulmuş epondorf tüplere bölündü ve örnekler -80°C de muhafaza edildi.

3.3. E. Coli DH5α Suşunun Transformasyonu

- Kompetan hücreler buzda eritildi
- Steril ependorfa 90 µl kompetan hücre ve pcDNA3.1 flag tagged etiketli insan IRS4 geni bulunduran vektörden 15 µl eklenerek buzda 30 dakika bekletildi.
- Bu süre sonunda 42°C de 1 dakika ısı muamelesine tabi tutuldu.
- Ardından tüp tekrar buza alındı ve üzerine 500 µl LB besiyeri eklenerek 1 saat 37°C de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı.
- 50 mg/ml amfisilin içeren 5 ml LB besiyerine inkübasyonu biten hücreler aktarılarak negatif kontrol falkonu ile 1 gece boyunca çalkalamalı etüvde bekletildi.

3.4. Plazmid İzolasyonu

Kullanılan Solüsyonlar

1.Resüspansiyon Solüsyonlar

2. Lizis solüsyonu

3. Nötralizasyon Solüsyonu

4.Yıkama Solüsyonu (35 ml %100 etanol eklenmiş halde)

5. Elüsyon Solüsyonu

Plazmid izolasyonu, Thermo Scientific GeneJET plasmid Miniprep Kit protokolüne uygun bir şekilde aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

- 1 gece inkübasyona bırakılan transforme hücrelerin bulunduğu falkon tüp 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.

- Pellet üzerine 250 µl Resüspansiyon solüsyonu eklenerek vortekslendi.
- Steril ependorfa aktarılan hücreler 250 µl Lizis solüsyonu eklenerek bir süre altüst edildi.
- 350 µl Nötralizasyon solüsyonu eklenerek 6 kez altüst edildi.
- Ependorflar 13000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım spin kolona aktarıldı.
- Spin kolon 13000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek tüpün alt kısmındaki sıvı uzaklaştırıldı.
- Spin kolon üzerine 500 µl Yıkama solüsyonu eklenerek 13000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve spin kolon alt kısmında biriken sıvı uzaklaştırıldı. İki kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- Spin kolon üst kısmı steril yeni bir ependorfa alınarak üzerine 50 µl Elüsyon solüsyonu eklenerek 1-2 dakika bekletildi.
- Ependorflar 13000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolon üst kısmı atılarak plazmid dna yeni tüpe geçmiş oldu.
- Nanodropla DNA saflığı ve miktarı ölçüldü.

3.5. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmamızda azot tankında muhafaza ettiğimiz stoklarımızda bulunan glioblastoma multiforme hücre hattı olan LN229 hücresi kullanıldı. Hücrelerin tamamı %1 L-glutamin, esansiyel olmayan aminoasitler, sodyum pirüvat, %10 Sığır Serumu ve %1 PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin) eklenmiş DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) içinde monolayer kültürler olarak %5 CO_2'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'de inkübatörde çoğaltıldı.

3.5.1. LN229 hücrelerinin çözdürülmesi

- Oda sıcaklığında bir süre bekletilen DMEM besiyeri güvenlik kabini içerisinde falkon tüpe 5 ml olacak şekilde eklendi.
- Azot tankından çıkarılan kriyojenik tüp alkollenerek güvenlik kabini içerisine alındı.

- Kriyojenik tüp içerisindeki hücreler falkon tüpten alınan bir miktar besiyeri ile tüp tabanından ayrılana kadar yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı.
- Hücreler tüp tabanından ayrıldıktan sonra falkona aktarılarak 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Falkon tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
- Yeni bir petriye 10 ml besiyeri eklenerek falkon tabanındaki hücreler petriden alınan bir miktar besiyeri ile pipetaj yapıldıktan sonra tekrar petriye aktarıldı.
- Hücreler % 5 CO_2'lik inkübatöre kaldırıldı.

3.5.2. LN229 hücrelerinin beslenmesi

- İnkübatörde bulunan LN229 hücreleri alındı ve steril kabin içerisinde besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücre 1X PBS ile yıkandı.
- Yıkama işlemi gerçekleştikten sonra serolojik pipet yardımıyla 10 ml DMEM besiyeri eklenerek inkübatöre kaldırıldı.

3.5.3. LN229 hücrelerinin pasajlanması

- Mikroskoptan takip edilen hücre yoğunluğu % 75-80 oranında gözlemlendiğinde yapıldı.
- 100 mm petrideki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile yıkandı.
- Hücreler üzerine 500 µl tripsin eklenerek 3-4 dakika inkübatörde bekletildi.
- Bu süre sonunda petri tabandan sökülmeye başlayan hücreler tripsin ile pipetaj yapılarak söküldü.
- Yeni bir petriye taze besiyeri eklendikten sonra besiyeri üzerinde tripsin yardımı ile sökülen hücrelerden 200 µl aktarıldı.

3.5.4. LN229 hücrelerinin dondurulması

- Hücreler steril kabin içerisinde besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 5 ml 1X PBS ile yıkandı.
- Tripsin eklenen hücreler 3-4 dakika inkübatörde bekletildi.

- Steril falkon içerisine 10 ml olacak şekilde % 10'luk DMSO(Dimetil Sülfoksit) ve FBS karışımı hazırlandı.
- Steril yeni bir falkona 5 ml besiyeri eklendi ve inkübatördeki hücreler tripsin muamelesi ile besiyeri bulunan falkona aktarıldı.
- Hücrelerin bulunduğu falkon tüp 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı uzaklaştırılan hücrelerin pelleti üzerine hazırlanan %10'luk DMSO solüsyonu serolojik pipet yardımıyla pipetaj yapılarak hücreler homojenize edildi.
- Homojenize edilen hücreler kriyojenik tüplere bölüştürüldü.
- - 80°C 'ye bırakılan tüpler 1 gün bekletilerek azot tankına alındı.

3.5.5. Hücrelerin sayılması

Hücre sayımı içi hematositometri yöntemi kullanıldı.

- Hücrelerden besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS ile yıkama gerçekleştirildikten sonra tripsin muamelesi ile hücreler petri tabanından ayrıldı.
- Hücreler 1/10 oranında seyreltildi.
- Thoma lamına 100 µl eklenerek mikroskopta sayma işlemi yapıldı.
- Thoma lamındaki orta karedeki hücreler sayılarak toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.
- Hücre sayımı (ml) = A x SF x 10^4 formülü ile hesaplandı (A:1 karede sayılan hücre sayısı, SF: Seyreltme faktörü, 10^4: Standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez).
- Bu formülle hesaplanan hücreler, 96 kuyucuklu plakaya her kuyuya 5000 hücre olacak şekilde 100 µl besiyeri içerisinde hücre ekimi gerçekleştirilerek inkübasyona bırakıldı.

3.5.6. LN229 hücrelerine plazmid transfeksiyonu

Qiagen Attractgene transfeksiyon reaktifi protokolüne uygun transfeksiyon yapıldı.

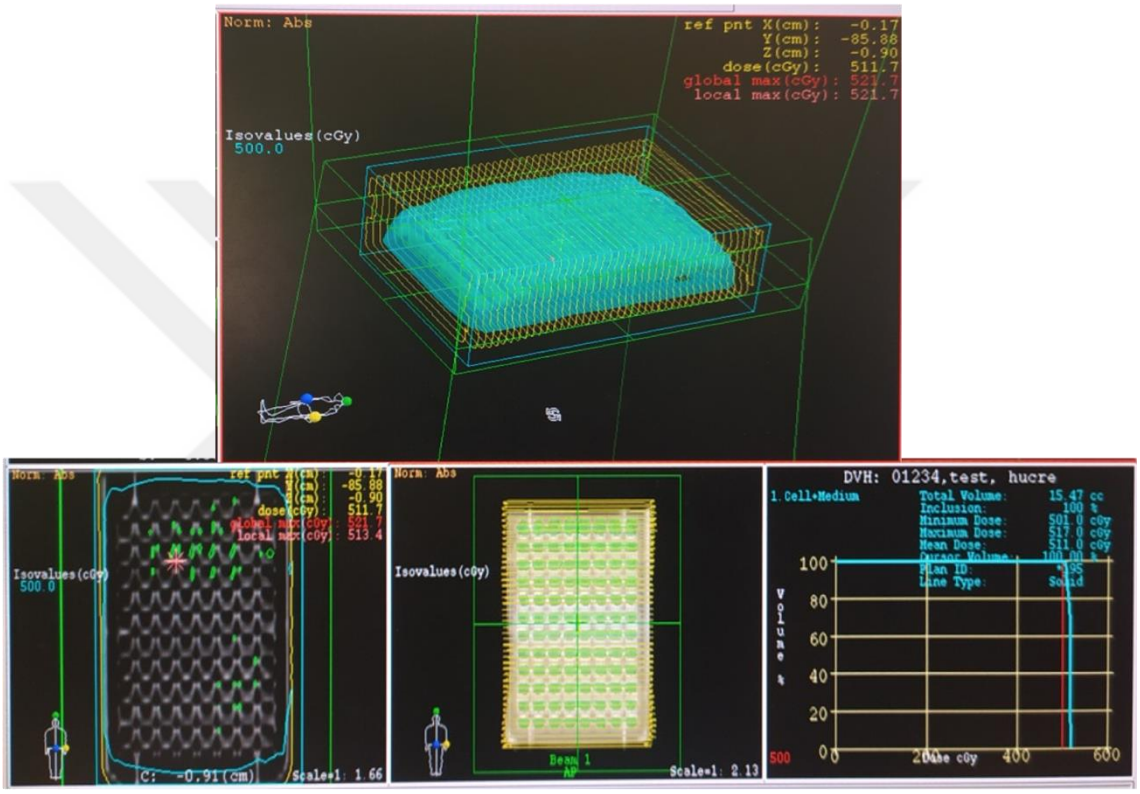
- LN229 hücreleri 1X PBS ile yıkanarak tripsin yardımıyla petri tabanından ayrıldı.
- 5 ml besiyeri aktarılan falkona alınan hücreler seyreltilerek hücre sayımı yapıldı.
- Yeni bir falkon tüpe 2 ml besiyerinde 400.000 hücre olacak şekilde hazırlandı.
- 100 µl FBS ve PSA içermeyen DMEM besiyerine 7 µl IRS4 flag tagged etiketli izole edilen plazmid eklenerek 10- 15 dakika bekletildi
- Bu süre sonunda 6 kuyucuklu plaka tabanına ependorfdaki miks yayıldı ve sayım yapılan hücreler serolojik pipet yardımı ile miks üzerine eklendi. Kontrol hücreleri 6 kuyucuklu plakaya eşit miktarda ekildi.
- Hücre süspansiyonuna Qiagen transfeksiyon reaktifinden 4 µl pipetaj yapılarak eklendi ve inkübasyona bırakıldı.

3.6. LN229 Hücrelerine Verilecek Radyoterapi Dozunun Belirlenmesi

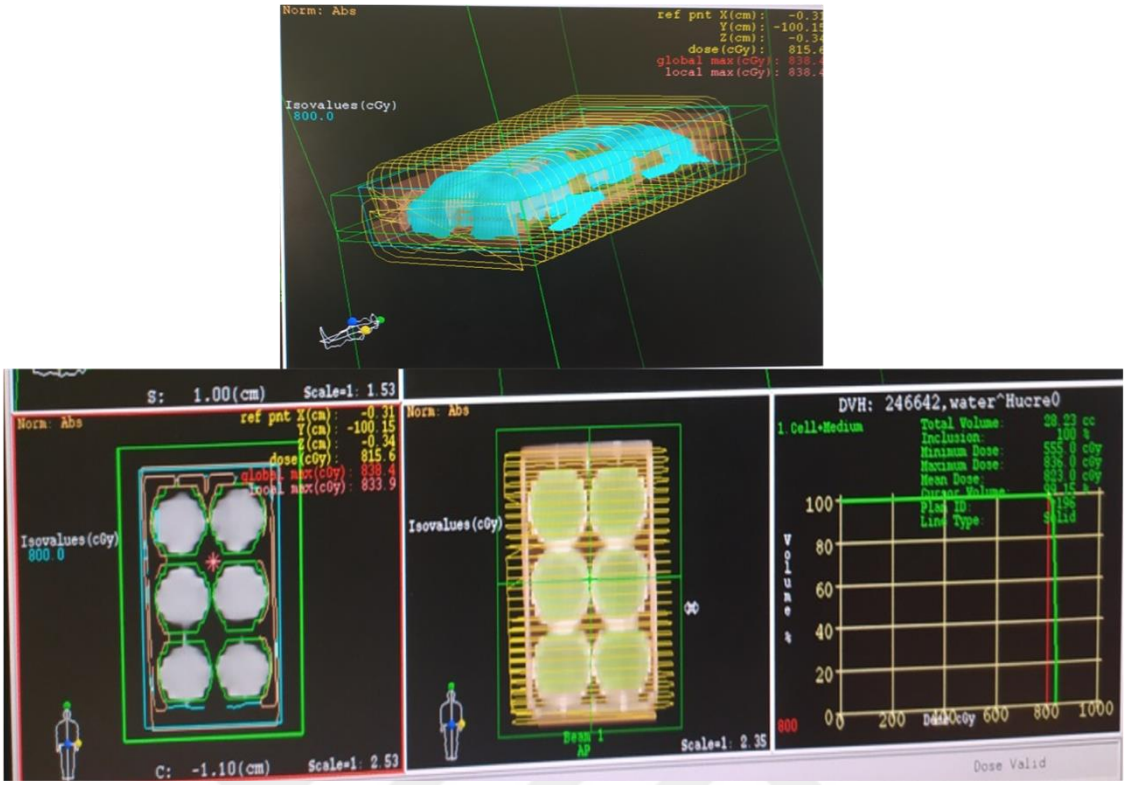
Hücre içeren 6 ve 96 kuyucuklu plaklardaki tüm kuyucukların homojen ve eşit miktarda planlanan radyoterapi dozu alması ve in-vivo koşulları mümkün mertebeyle temsil edebilmesi amacıyla, radyoterapi uygulaması öncesi denek gruplarında olduğu gibi aynı konsantrasyon ve miktarda hücre ve besiyeri içeren hem 6 hem de 96 kuyucuklu birer plak doz planlaması amacıyla simülasyon materyali olarak kullanıldı. Bu simülasyon materyali plaklar, tüm kuyucuklardaki hücrelerde homojen doz dağılımının sağlanması ve in-vivo koşulların model olarak temsil edilebilmesi için, fiziksel yoğunluğu 1g/cm3 ve boyutları 12x8.5x1 cm3 doku eşdeğeri bolus (Şekil 12-13) ile kaplandı (Çakır ve ark., 2019; Tesei ve ark. 2013).

Simülasyon materyali olarak hazırlanan bu plaklardan, Siemens marka Sensation 4 model CT-Simülatör sistemi kullanılarak 2.5 mm kesit kalınlığında axial tomografi görüntüleri elde edildi. Elde edilen kesitsel görüntüler; geometrik ve dozimetrik özellikleri önceden CMS XIO 3 boyutlu radyoterapi tedavi planlama sistemine tanımlandırılmış, Theratron marka 1000E model kobalt-60 teleterapi cihazıyla doz planlaması yapıldı. Doz planlamasında her bir kesitte plak, bolus ve besiyeri ile birlikte hücreler ayrı ayrı konturlandıktan sonra ortalama enerjisi 1.25 MeV olan Co-60 foton demetleriyle 3 boyutlu doz planlaması yapıldı (Şekil 12-13). Dozimetrik olarak uygun alanlar kullanılarak tüm kuyulardaki hücreler tek fraksiyonda ayrı ayrı 5, 8 ve 10 Gy'lik

radyasyon dozu alacak şekilde planlama işlemi tamamlandı. Tedavi planlama sisteminden elde edilen veriler; alan boyutu, SSD (Source Skin Distance) mesafesi, ışınlama açıları ve ışınlama süreleri belirlendi. Radyoterapi doz uygulaması yapılan plaklardaki tüm hücreler, planlama prosedüründen elde edilen datalar kullanılarak ışınlanma işlemi yapıldı.



Şekil 12. 96 kuyulu plaka doz ayarlaması.



Şekil 13. 6 kuyulu plaka doz ayarlaması.

3.7. MTT (Hücre Canlılık Testi)

MTT (5mg/ml) Metil tiyazol difenil tetrazolium: Steril ortamda 0.05 gram toz MTT tartılarak 10 ml steril 1X PBS içerisinde çözdürüldü.

Uygulama

- 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler üzerine hazırlanan MTT solüsyonundan her kuyuya 20 µl eklendi.
- 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
- Bu süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Her kuyuya 100 µl DMSO eklendi ve homojen olana kadar çalkalama işlemi yapıldı.
- 96 kuyucuklu plaka 540-690 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okutuldu.

3.8. LN229 Hücrelerinin Koloni Oluşum Testi

- 40 ml 3:1 oranında metanol ve asetik asit içeren fiksasyon çözeltisi hazırlandı. Bunun için 30 ml metanol 10 ml asetik asit karışımı hazırlandı.
- 25 ml % 0.05'lik metanol içerisinde çözdürülmüş kristal viyole hazırlandı. 0.125 gram toz kristal viyole tartılarak 25 ml metanol ile çözdürülerek vortekslendi.
- 2 adet 6 kuyulu plakaya kontrol ve transfekte hücrelerinden 4 ml besiyerinde 500.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 1 tane 6 kuyulu plakaya 10 Gy radyoterapi verilerek 9 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.
- Bu süre sonunda 6 kuyucuklu plaka alınarak besiyeri uzaklaştırıldı.
- 1 ml 1X PBS ile yıkandı.
- Hücreler üzerine 1 ml fiksasyon çözeltisi eklendi ve 5 dakika bekletildi.
- Bu süre sonunda hücreler 1 ml kristal viyole çözeltisi ile muamele edilerek 15 dakika bekletildi.
- Musluk suyu yardımıyla kristal viyole boyası uzaklaştırıldı ve koloni görüntüsü alındı. Kolonilerin sayımı İmageJ programı yardımıyla yapıldı.

3.9. Proteinlerin Lizatlarının Hazırlanması

- Lizis Tamponu -20°C'den çıkarılarak buzda çözdürüldü.
- 6 kuyucuklu plakalara ekilen hücrelerin besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı.
- 1 ml 1X PBS ile hücreler yıkandı.
- Her kuyuya 500 µl Lizis tamponu eklendi.
- Hücre kazıyıcı ile tabandaki hücreler kazınarak pipetaj işlemi yapılarak steril ependorflara aktarıldı.
- Ependorflar 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı yeni ependorf tüpe aktarıldı ve - 80°C'ye kaldırıldı.

3.10. Protein Miktar Tayini (Bradford Analizi)

Stok BSA (10mg/ml): 0.05 gram BSA tartılıp 1 ml enjeksiyonluk suda çözdürülüp hazırlandı.

Bradford Reaktifi: 1:5 oranında Bradford Reaktifi ve enjeksiyonluk su ile hazırlandı.

Uygulama

- Hazırlanan protein lizatları buzda çözdürüldü.
- 10 mg/ml BSA solüsyonu 1/10 oranında seyreltildi.
- BSA 96 kuyucuklu plakaya sırasıyla 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 7, 11 µl olacak şekilde üç set halinde eklendi.
- Sırasıyla üç set şeklinde 1 µl protein lizatları vortekslenerek eklendi.
- Kuyucuklar üzerine hazırlanan 100 µl Bradford reaktifi eklenerek karışması sağlandı.
- 595 nanometre dalga boyunda spektrofotometre ölçümü yapıldı. Bu değerler Microsoft Excel programı ile grafik çizimi yapılarak protein miktarları hesaplandı.

3.11. Western Blotting

Kullanılan Solüsyonlar

1. Resolving Buffer: 1,5 M Trisbase pH: 8.8

1 litre için 181,64 gr Trisbase tartıldı ve distile suda çözünerek pH'ı 8.8'e ayarlandı.

2. Stacking Buffer: 0,5 M Trisbase pH: 6.8

1litresi için 60,5 gr trisbase tartıldı ve distile suda çözünerek pH'sı 6.8'e ayarlandı.

3. Running Buffer (10X): 15 gr TrisBase, 94 gr Glisin (Vivantis PR0608), 50 ml %10 SDS karışımı 500 lt'ye distile su ile tamamlandı. Solüsyon pH ayarı gerektirmemektedir.

4. Running Buffer (1X): 100 ml 10X Running Buffer üzerine 900 ml distile su eklendi ve karıştırıldı.

5. 10X PBS (pH 7.4): 80 gr NaCI, 2 gr KCI, 14,4 gr Na2HPO4, 2,4 gr KH2PO4 tartıldı. 800 ml distile su içerisinde çözüldü. Çözelti pH'sı 7.4'e ayarlanarak son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

6. 1X PBS-TWEEN20 (1 lt için): 10X PBS' ten 100 ml ve distile sudan 900 ml alınarak karıştırıldı. Bu çözelti üzerine 1ml Tween 20 ilave edildi.

7. SDS Yükleme Tamponu: SDS'e 1ml gliserol eklenerek vortekslenerek kullanıldı. Örnekler kullanılmadan önce 50 µl β-merkaptoetanol eklendi.

8. %10 Amonyum persülfat (APS): 0.1 g APS ependorf tüp içerisine alındı. Üzerine 1ml distile su eklendi. İyice vortekslenerek çözülmesi sağlandı ve +4'de saklanıp kullanıldı.

9. Transfer Tamponu: 3,75g Glisin ve 7,25g TrisBase 1 litre distile suda çözülerek karışıma 250 ml metanol eklendi.

10. Akrilamid/Bisakrilamid (100 ml için 29/0.8): Solüsyon 500 ml hazırlandı. Bunun için 145g Akrilamid ve 4g Bisakrilamid tartıldı. Üzerine bir miktar distile su eklenerek karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlandı. Son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

3.11.1. Jel hazırlanması

Tablo 2. Western blot jel hazırlama protokolü

Resolving	**%7**	**%10**	**%12**	**%15**	**Stacking**	**5ml'lik**	**10ml'lik**
Su	15ml	11.55ml	10.5ml	7.05ml	**Su**	3ml	6ml
Resolving Buffer	7.5ml	7.5ml	7.5ml	7.5ml	**Stacking Buffer**	1.25ml	2.5ml
Acr(29:08)	7.05ml	10.5ml	12ml	15ml	**Acr(29:08)**	0.625ml	1.25ml

Tablo 2'nin devamı arka sayfadadır.

Tablo 2 (devamı). Western blot jel hazırlama protokolü

%10SDS	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	**%10SDS**	50µl	100µl
%APS	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	**%APS**	50µl	100µl
Temed	30µl	30µl	30µl	30µl	**Temed**	5µl	10µl
Toplam	30ml	30ml	30ml	30ml	**Toplam**	5ml	10ml

Yukarıda verilen tablodaki protokole göre %12'lik ve %7'lik SDS-PAGE jeli döküldü.

3.11.2. Protein lizatlarının jelde yürütülmesi

Protein lizatları - 80°C'den çıkarılarak buzda çözdürülmeye bırakıldı. Bradford yöntemi ile miktarı belirlenen lizatlar vortekslenerek ependorflara eklendi. Aynı şekilde miktarı Bradford yöntemi ile belirlenen miktarda β-merkaptoetanol içeren SDS yükleme tamponundan her örnek üzerine ilave edildi. 95°C'de ısıtıcıda 5 dakika bekletildi ve her 1-2 dakika aralıklarla vorteks yapıldı. Örnekler hazır hale geldikten sonra yükleme pipeti yardımıyla Stacking jel kuyularına yükleme yapıldı. Stacking jeli geçene kadar 60 Voltta, Resolving jele geçen örnekler 80 Voltta yürütüldü.

3.11.3. Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi

Örneklerin yürüme işlemi bittikten sonra transfer solüsyonu hazırlandı. Transfer solüsyonu ile whatman filtre kağıdı ve süngerler ıslatıldı. Transfer aparatının negatif kısmına ıslatılan sünger yerleştirildi. Üzerine aynı şekilde ıslatılmış whattman kağıdı konuldu. Yürüme işlemi biten jel cam plakalardan kazıyıcı ile çıkarılarak whattman kağıdı üzerine konuldu. Saf metanol ile ıslatılan membran hava kabarcığı oluşmayacak şekilde jel üzerine konuldu. Tekrar whatman kağıdı ve sünger konularak transfer aparatı kapatıldı. Transfer solüsyonu ile doldurulan transfer tankı buz banyosuna konuldu. Güç kaynağına bağlanarak buzda bir gece boyunca 40 Voltta transfere bırakıldı.

3.11.4. PVDF membranının primer antikor işaretlenmesi

Transfer işlemi bittikten sonra transfer aparatı sökülerek PVDF membran metanolde bekletildi. 1X PBS-Tween 20 ve BSA (1X PBS, %0,1 Tween-20, %2 BSA) hazırlandı ve 1.5 saat boyunca bloklandı. Ardından PBST-BSA içeren 1/1000 dilüsyon oranında primer antikor hazırlanarak 1 gece boyunca +4°C'de çalkamalı inkübatörde bırakıldı. Primer işaretleme sonrasında primer antikor uzaklaştırıldı ve 15 dakika arayla 2 kez 1X PBST ile yıkama gerçekleştirildi. Ardından PBST-BSA içeren 1/2000 dilüsyon oranında sekonder antikor (anti-mouse veya anti-rabbit) ile 1.5 saat boyunca oda sıcaklığında bloklandı. Bu süre sonunda tekrar 1X PBST ile 15'er dakika ve 2 defa olmak üzere yıkama gerçekleştirildi ve bant görüntülemesi aşamasına geçildi.

3.11.5. PVDF membranın görüntülenmesi

Kullanılan Solüsyonlar

1.Western ECL Reaktifi (BIO-RAD)

• Peroksit solüsyon

• Luminol/enhancer solüsyon

1:1 oranında peroksit ve luminol enhancer solüsyonundan hazırlandı.

2. Developer Röntgen Banyo Solüsyonu

- **Solüsyon A (pH. 10-13):** Hidrokin 112 ongr/lt, Potasyum Hidroksit 205 gr/lt, Sodyum Metabisülfat
- **Solüsyon B (pH. 2-5):** Fenidon 24 gr/lt, Dietilen Glikol 800 gr/lt, Benzotriazol 8 gr/lt, Asetik Asit 84 gr/lt
- **Solüsyon C (pH. 4-7):** Glutaraldehit156 gr/lt, Sodyum Metabisülfit 153 gr/lt

1 lt olarak hazırlandı. 700 ml distile su, 250 ml Solüsyon A eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra 25 ml Solüsyon B ve 25 ml de Solüsyon C eklenerek karıştırıldı.

2.Fixer Röntgen Banyo Solüsyonu

- **Solüsyon A (pH. 5-7):** Amonyum Tiyosülfat 720 gr/lt, Sodyum Metabisülfit 40 gr/lt, Asetik Asit 55 gr/lt
- **Solüsyon B (pH. 0-2):** Asetik Asit 30 gr/lt, Alüminyum Sülfat 350 gr/lt

1 litre olarak hazırlandı. 700 ml distile üzerine 250 ml Solüsyon A eklendi. İyice karıştırıldı. Bunun üzerine 250 ml Solüsyon B eklenerek karıştırıldı.

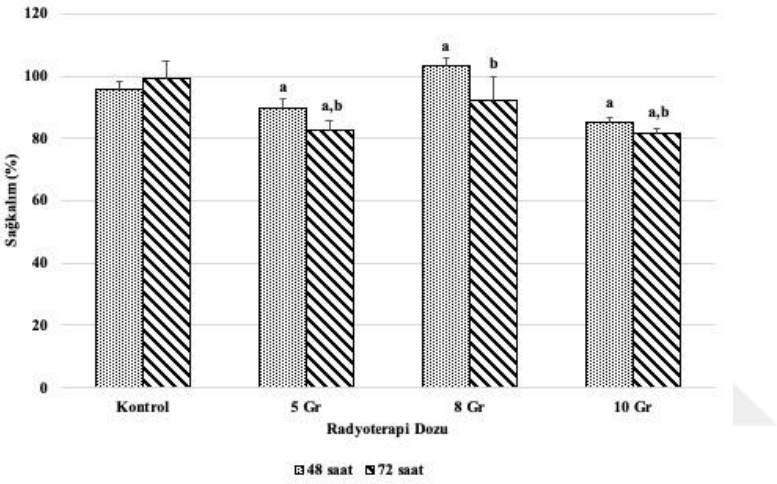
Uygulama

Sekonder antikor sonrasında görüntüleme işlemi içi ECL reaktifi hazırlandı. Bunun için: 1 ml peroksit solüsyonu ve 1 ml de luminol enhancer solüsyonu falkon tüpe eklenerek vortekslendi. Daha sonrasında membran üzerine tüm membranı kaplayacak şekilde muamele edilerek 5 dakika bekletildi. Ardından membrandan solüsyon uzaklaştırılarak görüntüleme kasetine sabitlenerek yerleştirildi. Karanlık odaya geçilerek kemilüminesans ışımaya duyarlı X ray filmi membran üzerinde bir süre bekletildi. Bu süre sonunda film çıkarılıp developer solüsyonunda bant gözlenen kadar bekletilir. Bant gözlendikten sonra film su bulunan kapta yıkanılarak solüsyon uzaklaştırıldı. Fixer solüsyonu ile bu defa muamele edilen film renk değişimi gözlendikten sonra çıkarılıp tekrar su ile yıkandı. Film kurulanarak bant analizi için tarama cihazında bant görüntüsü alındı. Bantlar İmagej programı ile analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. LN229 Hücre Hattına Verilecek Optimum Radyoterapi Doz Miktarının Belirlenmesi

Çalışmamızda LN229 hücrelerinin, radyoterapi yanıtındaki optimum radyoterapi dozunu ve inkübasyon süresini belirledik. LN229 hücrelerinden kontrol grubu dışında diğer hücre grupları sırasıyla 5, 8, 10 Gy RT doz miktarları ile ışınlanarak 48 ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda MTT analizi ile sağ kalım oranları belirlendi.



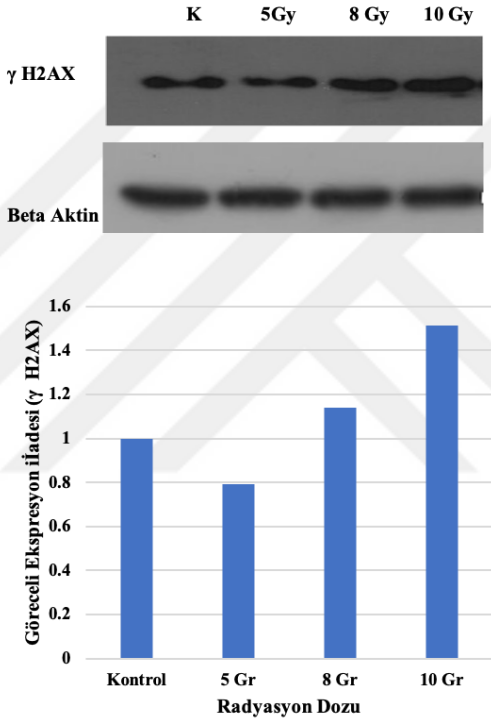
Şekil 14. LN229 hücrelerinin 5, 8, 10 Gy radyoterapi dozu muamelesi sonunda sağ kalım oranları.

Şekil 14'de gösterildiği gibi 48 saat hücre gruplarından, 5 Gy ve 10 Gy RT ile muamele edilen hücre grupları kontrol hücre grubuna kıyasla sağ kalımlarında sırasıyla %6 ve %10 oranında azalma saptanmıştır. 48 saat 8 Gy RT almış hücre grubu kontrol grubu hücrelerine kıyasla % 8 oranında sağ kalım artışı göstermiştir.

72 saat hücre gruplarından 5, 8, 10 Gy RT dozu almış hücre gruplarının kontrol hücre grubuna kıyasla sağ kalımı sırasıyla %17, %7, %19 oranlarında azalma göstermiştir. MTT analiz sonuçlarına göre kontrol gruplarına kıyasla 48 saat ve 72 saat hücre gruplarının sağ kalım oranları arasında azalma oranının yüksek olduğu RT dozu ve inkübasyon süresi, 10 Gy 72 saat hücre grubu olarak saptandığından optimum radyoterapi dozu olarak belirlenmiştir (Şekil 14).

4.2. LN229 Hücrelerinde Radyoterapi Doz Miktarlarının H2AX Fosforilasyonu Üzerine Etkisi

Çift zincir kırıklarının oluşumu H2AX molekülünün fosforilasyonu ile (Serin 139) sonuçlanmaktadır. H2AX molekülü radyoterapi tedavisinin neden olduğu DNA hasarının göstergesi olup radyoterapi direnci belirteci olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda 5, 8, 10 Gy radyoterapi almış LN229 hücrelerinin γH2AX ekspresyon seviyelerini gösterdik.

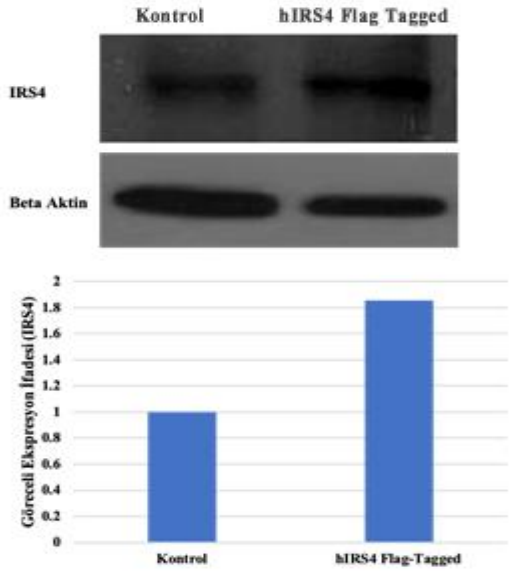


Şekil 15. 5, 8, 10 Gy radyoterapi dozu muamelesi sonucunda LN229 hücrelerinin H2AX fosforilasyon seviyeleri

Şekil 15'de görüldüğü gibi artan radyoterapi doz miktarlarına bağlı olarak H2AX fosforilasyon oranları arasında farklılık gözlenmiştir. 8 ve 10 Gy RT dozu almış hücre grupları kontrol hücre grubuna kıyasla γH2AX ekspresyonlarında belirgin artış olduğu saptandı. 10 Gy RT dozu almış hücre grubu kontrol grubuna göre 1,5 kat fazla γH2AX ekspresyon artışı gösterdi. γH2AX miktarına da bağlı olarak radyoterapide optimum doz 10 Gy, optimum süre ise 72 saat olarak belirlendi.

4.3. Yabanıl Tip IRS4 Proteininin LN229 Hücrelerinde Ektopik Ekspresyonunun Gösterilmesi

LN229 hücrelerinde ekzojen IRS4 ekspresyon artışı sağlanması için pcDNA3.1 flag tagged insan IRS4 genini içeren memeli ekspresyon vektörü lipofektamin aracılığı ile LN229 hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfeksiyon yapılmayan hücre grubu kontrol grubu olarak seçilmiştir.

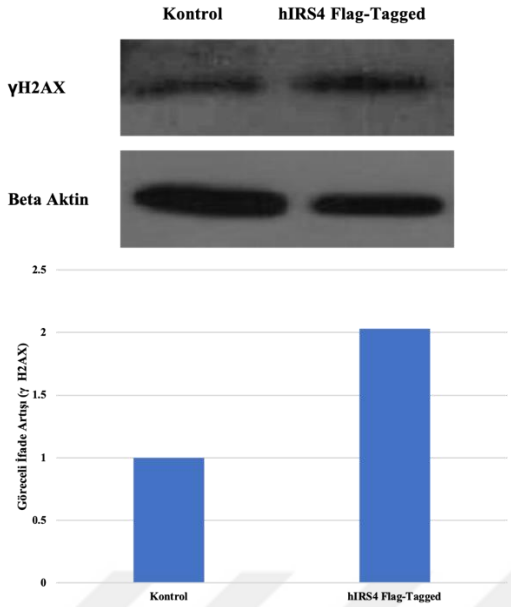


Şekil 16. LN229 hücrelerinde transfeksiyon sonrası ektopik IRS4 ekspresyon seviyeleri

Western blot sonuçlarında gösterildiği gibi IRS4 geni içeren ekspresyon vektörü ile transfekte edilen hücre grubunun ektopik IRS4 ekspresyonunun, kontrol grubu hücrelerine göre yaklaşık olarak 2 kat arttığı belirlendi (Şekil 16).

4.4. Ektopik IRS4 Ekspresyonu Yapan LN229 Hücrelerinde Radyoterapinin γH2AX İfadesi Üzerine Etkisi

LN229 hücreleri pcDNA3.1 flag tagged insan IRS4 genini içeren ekspresyon vektörü ile transfeksiyon işlemi yapıldıktan sonra hücreler etkin RT dozu olarak belirlenen 10 Gy radyoterapiye maruz bırakılarak H2AX'in fosforilasyon seviyelerine bakıldı.

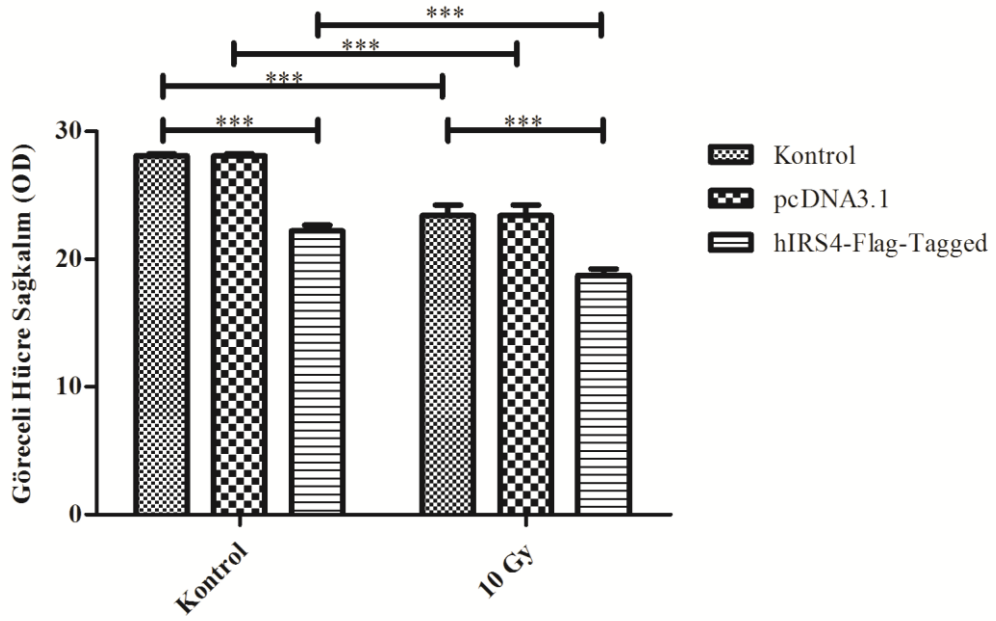


Şekil 17. Ektopik IRS4 ekspresyonu yapan LN229 hücrelerinin 10 Gy RT dozu sonrasında γH2AX ekspresyon seviyeleri

10 Gy RT dozu almış her iki hücre grubunda ektopik IRS4 gen eskpresyon artışı sağlayan hücre grubunun kontrol hücre grubuna kıyasla fosforile H2AX ekspresyonunda 2 kat artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 17).

4.5. Ektopik IRS4 Ekspresyonu Yapan LN229 Hücrelerinde Radyoterapi Tedavisinin Hücre Sağ Kalımına Etkisi

LN229 hücrelerine pcDNA3.1 flag tagged etiketli ekspresyon vektörü ile transfeksiyon işlemi yapıldı. Transfeksiyon yapılmayan hücre grubu kontrol olarak seçildi. Tranfeksiyon işleminden kaynaklı bir sorun olmadığının gözlenebilmesi için hücrelere pcDNA3.1 boş vektörü de transfekte edildi. 10 Gy RT verilen hücre grubu ve RT almamış hücre grubunun 72 saat sonra MTT testi ile hücre canlılık oranları belirlendi.



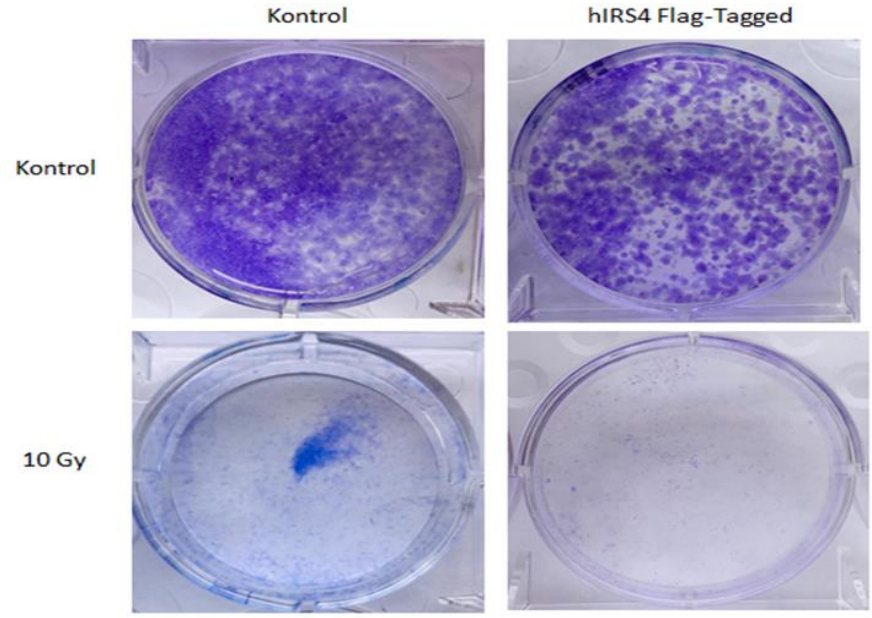
Şekil 18. Ektopik IRS4 ekspresyonu yapan LN229 hücrelerinin 10 Gy RT dozu sonrasında hücre sağ kalım oranları

MTT analiz sonuçlarına göre RT dozu almamış ve 10 Gy RT dozu almış hücre gruplarının kontrol ve pcDNA3.1 gruplarının sağ kalımları arasında bir değişiklik gözlenmedi. Ancak RT dozu almamış IRS4 geni transfekte edilen hücre grubunun kontrol hücre grubuna kıyasla sağ kalımının %20 oranında azaldığı belirlendi. 10 Gy RT dozu almış IRS4 ektopik ekpresyon gösteren hücrelerin kontrol hücrelerine kıyasla sağ kalımında yaklaşık olarak %32 oranında azalma saptandı.

4.6. Ektopik IRS4 Ekspresyonu Yapan LN229 Hücrelerinde Radyoterapi Tedavisinin Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi

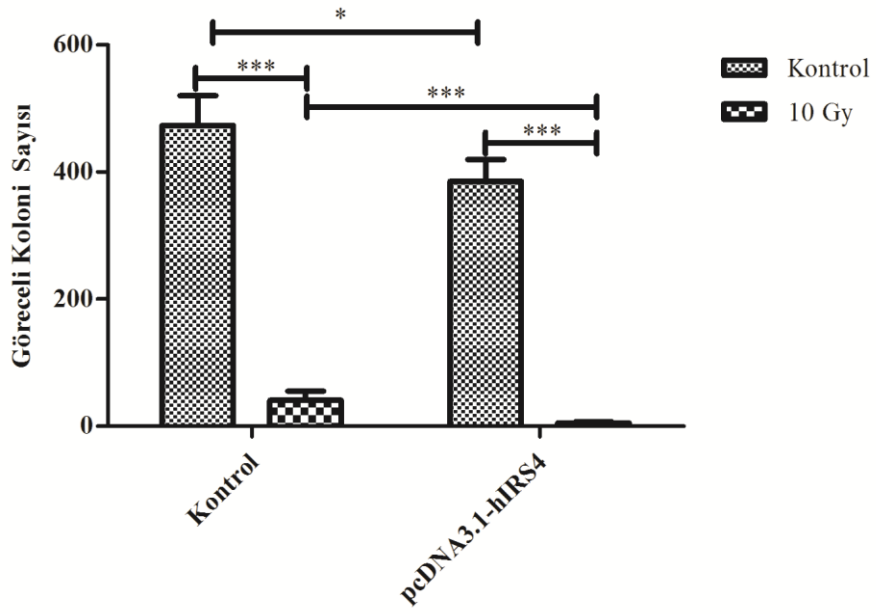
Koloni oluşum testi bir hücrenin bir koloni halinde büyüme kabiliyetine dayanan in vitro sağ kalım testidir. Artmış IRS4 ekspresyonunun radyoterapi tedavisi ile kombinasyonu sonucunda koloni oluşumları gösterildi. Ektopik olarak IRS4 ekspresyonun arttırılmasından sonra kontrol ve transfekte hücrelerinin ekimi gerçekleştirildi. Hücre gruplarından bir tanesi 10 Gy radyoterapi ile ışınlandı ve radyoterapi almayan hücre grubu kontrol olarak seçildi. 9 gün inkübasyon sonrasında

fiksasyon solüsyonu ile hücreler sabitlenerek kristal viyole muamalesi ile koloni boyamaları yapıldı.



Şekil 19. Ektopik IRS4 ekspresyonu yapan LN229 hücrelerinde 10 Gy RT dozu sonrasında koloni oluşumlarının görüntüsü.

Şekil 19'da gösterildiği gibi WT-IRS4 ekspresyonu arttırılan hücre grubundan 10 Gy radyoterapi dozu almış hücre grubu diğer hücre gruplarına kıyasla koloni sayısında anlamlı bir azalma gözlendi. **Şekil 20**'de koloni oluşum oranları grafik yardımıyla gösterildi. Bu sonuçlara göre RT tedavisi almamış hücre grubunda IRS4 ektopik ekspresyonu gösteren hücre grubu kontrol hücre grubuna kıyasla yaklaşık olarak %19 oranında koloni azalması belirlendi. 10 Gy RT maruziyetine uğrayan hücre grubunda ise IRS4 transfekte hücre grubunun kontrol hücre grubuna kıyasla yaklaşık olarak %88 oranında koloni azalması saptandı. Aynı zamanda ektopik IRS4 ekspresyonu sağlayan hücre gruplarından, 10 Gy RT dozu almış hücre grubunun RT dozu almamış hücre grubuna kıyasla % 98 oranında bir koloni azalması saptandı.



Şekil 20. Ektopik IRS4 ekspresyonu yapan LN229 hücrelerinde 10 Gy RT dozu sonrasında koloni oluşumlarının oranları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsülin benzeri büyüme faktör reseptörü (IGFR) ve insülin reseptörünün (IR) kanser gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu sinyal yolların hem insülin hem de IGF tarafından aktivasyon artışı kanser hücrelerinde yaygın olmasının yanı sıra çeşitli kanser önleyici tedavilere karşı önemli bir direnç faktörü olarak temsil edilmektedir (Malaguarnera ve Belfiore, 2011).

IR ve IGF-IR'nin β alt birimindeki tirozin kinaz alanları, IRS aile üyeleri (IRS1-IRS4), Gab-1, Cbl ve Shc gibi spesifik substratların fosforilasyonunu sağlamaktadır. Bu fosforilasyon sonucunda PI3K/AKT/mTOR ve ERK/MAPK yolaklarını indükleyerek hücresel metabolik ve mitojenik mekanizmalar gerçekleştirmektedir (Mendoza ve ark., 2011).

İnsülin reseptör substratı (IRS) molekülleri, insülin sinyalinde görev alan anahtar aracılardır ve hücre büyümesi, sağ kalımı ve metabolizma gibi temel hücresel fonksiyonların sürdürülmesinde merkezi bir rol oynar. IRS1'in genellikle çoklu serin fosforilasyonu IRS1 aktivitesini inhibe ederek insülin direncine yol açabilir. İnsülin direnci ise başta Tip2 diyabet olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde etkilidir (Yarchoan ve ark., 2014).

IRS aile üyelerinden IRS4 sınırlı ekspresyon gösteren ve aile üyelerinden farklı olarak protein fosfataz bağlanma bölgesi içermemesi nedeniyle fonksiyonel etkileri hala araştırılmaktadır (Sesti ve ark., 2001).

Glioblastoma Multiforme (GBM) erişkinlerde görülen agresif primer beyin tümörüdür. GBM tedavileri uzun yıllardır değişmemiştir. GBM'lerin radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonları standart tedavi şeklidir (Yılmaz ve ark., 2012). GBM'lerin içerdiği heterojen hücre grupları etkili DNA onarım kapasiteleri ile radyoterapi direncinin gelişimine neden olmaktadırlar (Howard ve ark., 2017). Yapılan son çalışmalarda ektopik IRS1 ekspresyonu artışı sağlanan GBM hücre hattında RT duyarlılığının azalarak tedaviye karşı direncin geliştiği gösterilmiştir (Görgişen ve ark., 2019). Yaygın ekspresyon göstermesi nedeniyle IRS1/2 adaptör moleküllerinin fonksiyonel özellikleri ve kanser tedavisindeki yanıtları ile ilgili literatürde bazı

çalışmalar mevcutken IRS4'ün fonksiyonel etkileri hala aydınlatılmış değildir. IRS4 ekspresyon artışı gösteren tümör çeşitleri gittikçe artmaktadır. Bu bilgiler çalışmamızda GBM hücre hattında IRS4'ün fonksiyonel etkilerinin yanı sıra tedavi yanıtındaki rolünü belirlemeye yönlendirdi.

Çalışmamız kapsamında ektopik IRS4 ekspresyon artışı sağlandıktan sonra 10 Gy RT dozu ile muamele edilen hücrelerin, kontrol hücre grubuna kıyasla sağ kalım oranında %32 oranında düşüş saptandı. IRS4 transfeksiyonu ile radyoterapi kombinasyonları hücrelerin RT'ye duyarlılığını arttırmıştır. Yapılan çalışmalarda IRS1'in Rad51 ile direkt olarak bağlanarak DNA onarım etkinliğinin arttırdığı çalışmalarda gösterilmiştir (Trojanek ve ark., 2003). Elde ettiğimiz verilere göre IRS4'ün IRS1'den farklı olarak Rad51 ile etkileşime geçemeyerek DNA onarım mekanizmasını etkinliğini arttıramamış olabilir. Ayrıca IRS1 ve IRS4 aynı hücrede eksprese edildiğinde IRS4' ün IRS1 fonksiyonunu baskıladığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Dörpholz ve ark., 2017). Bu durumda GBM hücrelerine transfeksiyon ile sağlanan ektopik IRS4 artışı IRS1 fonksiyonunu baskılarak DNA tamir mekanizmasının etkinliğini de düşürmüş olabilir.

Çalışmamızın devamında ektopik IRS4 ekspresyon artışı sağlandıktan sonra 10 Gy RT dozu almış hücre gruplarının kontrole oranla γH2AX ekspresyon seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır. Bu durum ektopik IRS4 ekspresyon artışının DNA hasar odaklarının arttırarak radyoterapi duyarlılığını arttırdığını da doğrulamaktadır. Bu veri, IRS4 ve radyoterapi direnci ilişkisini ortaya koyan ilk çalışmadır. Bu noktada artan γH2AX odaklarına rağmen DNA tamir mekanizmasının etkin bir şekilde çalışamadığı da söylenebilir. Dolayısıyla IRS1 aktivasyonunun IRS4 ifade artışına bağlı olarak inhibisyonunun söz konusu olabileceğini göstermektedir.

Ektopik IRS4 ifade artışının GBM hücrelerinde sağ kalım üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla RT dozu almamış ve 10 Gy RT dozu almış hücre gruplarının kontrol grubuna, boş vektör aktarılan hücre grubuna ve transfekte hücre gruplarına 72 saat sonra MTT testi uygulandı. RT almamış hücre grupları arasında IRS4 transfekte hücre grubunun kontrol hücre grubuna kıyasla sağ kalım oranında %20 oranında azalma görüldü. Böylelikle IRS4 proteinin LN229 hücre hattında hücre sağ kalımını ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği saptandı. Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğu

IRS4 ekspresyon artışının hücre proliferasyonunu indüklediğine yönelik veriler elde etmiştir. Yapılan bir çalışmada IRS4 ekspresyon artışının PI3K/AKT aktivasyonu aracılığı ile meme kanser gelişimi ve hücre sağ kalımını arttırdığı ve tedavilere karşı direnç gelişimine neden olduğunu göstermektedir (Ikınk ve ark., 2016). Başka bir çalışmada ise HepG2 (Hepatosellüler karsinom) hücre hattında IRS4'ün hücre sağ kalımına ve hücre farklılaşmasına neden olduğu ve PI3K/AKT aktivasyonundan bağımsız bir şekilde PKC aracılığı ile ERK ve p70S6K'yı aktifleştirerek gerçekleştiği saptanmıştır (Cuevas ve ark., 2007). Akciğer adenokarsinom hücrelerinde yapılan çalışmada artmış IRS4 ekspresyonunun tümör büyüme ve farklılaşması ile ilişkilendirilerek buna bağlı PI3K/AKT yolağındaki artışa neden olduğu saptanmıştır (Weischenfeldt ve ark., 2017). Kolorektal kanser hücrelerinin doku analizlerinde ise IRS4'ün metastaz ve tümör gelişimi ile ilişkilendirilerek klinik evre süreci için belirteç olabileceği gösterilmiştir (Sanmartin-Salinas ve ark., 2018).

Tüm bu çalışmalar birbirlerini destekler nitelikte olsa da literatürde birbiriyle çelişen çalışmalar mevcuttur. IRS4'ün sinyal yolağındaki modülasyonlar sonucunda fonksiyonel etkileri değişebildiği gösterilmektedir. Literatürdeki mevcut bir çalışmada 32D miyeloid progenitör hücrelerde IL3 (İnterlökin3) varlığında veya yokluğunda IRS4'ün aşırı ekspresyonu hücre sağ kalımını azalttığı belirlenerek çalışmamızla uyumlu olan sonuçlar ile IRS4'ün fonksiyonel etkilerinin değişebileceği gösterilmiştir (Uchida ve ark., 2000). Ayrıca yapılan çalışmalar IRS proteinlerinin hücre ve kansere özgü etkilerinin de söz konusu olduğunu göstermektedir. IRS1 ekspresyon artışları yaygın olarak kanser gelişimi ile ilişkilendirilmelerine rağmen, skuamöz karsinom ve küçük hücreleri olmayan akciğer tümörlerinde ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür (Gorgisen G ve ark., 2019). Hatta aynı kanser türünün farklı alt tiplerinde IRS1 ekspresyonu prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Mardilovich ve ark.,2009). Benzer durum GBM hücreleri ile için de geçerli olabilir ve IRS4 ifade artışının GBM hücrelerinde sağkalımı azaltıcı bir etki göstermesi kanser türüne özgü bir durum olarak değerlendirilebilir.

IRS4'ün kanser tipine özgü davranışının yanı sıra, LN229 hücreleri PTEN mutasyonu bulunmayan GBM modelinin örneğidir. Bu noktada ektopik artış gösteren IRS4 ifadesi hücre besiyerinde bulunan FBS varlığında tirozinlerinde hızlı bir şekilde

fosforile olup aktivasyon kazanabilmektedir. Bu durumda aktif IRS4, PI3K yolağını güçlü bir şekilde uyaracaktır. Ancak yabanıl PTEN bu durumun inhibisyonuna neden olup, hücrelerin sağ kalım oranlarını azaltmış olabilir.

Çalışmamızda ektopik IRS4 ekspresyonunun radyoterapi duyarlılığına etkisi koloni oluşum testi ile doğrulanmaya çalışılmıştır. Kolonijenik test sonuçlarına göre 10 Gy RT dozu almış hücre grubu arasında, ektopik IRS4 ekspresyonu yapan hücre grubu kontrol hücre grubuna kıyasla yaklaşık %88 oranında koloni azalması saptandı. RT dozu almayan hücre grubu arasında, IRS4 transfekte hücre grubu kontrol hücre grubuna kıyasla yaklaşık %19 oranında koloni azalması gözlendi. Elde ettiğimiz bu veriler sağ kalım test sonuçlarımızı ve γH2AX sonuçlarımızı da doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak çalışmamız kapsamında artan ektopik IRS4 ekspresyonun LN229 hücrelerinde sağ kalımı azalttığı ve radyoterapi duyarlılığını arttırdığı saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu veriler IRS4 bağımlı sinyal yolağının GBM gelişimi, metastazı ve radyoterapi duyarlılığı üzerine gerçekleştirilecek ileri çalışmalara temel oluşturma niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Ahmed EM, Bandopadhyay G, Coyle B, Grabowska A. A HIF-independent, CD133-mediated mechanism of cisplatin resistance in glioblastoma cells. Cell Oncol (Dordr). 2018; 41(3): 319-28.

Alagoz M. Glioblastoma multiforma tedavisinde kanser kök hücrelerinin temozolomide karşı oluşturdukları direnç. Sakarya Tıp Derg. 2018; 8(2): 379-87.

Avşar T, Kılıç T. Yüksek Gradeli Gliomların Moleküler Biyolojisi. Türk Nöroşir Derg. 2017; 27(2): 162-68.

Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. 2012; 327(1-2): 48-60.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB ve ark. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature. 2006; 444(7120): 756-60.

Barnett GC, West CM, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PD ve ark. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. Nat Rev Cancer. 2009; 9(2): 134-42.

Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. Nat Rev Cancer. 2004;4 (9): 737-47.

Biau J, Chautard E, De Koning L, Court F, Pereira B, Verrelle P ve ark. Predictive biomarkers of resistance to hypofractionated radiotherapy in high grade glioma. Radiat Oncol. 2017; 12(1): 123.

Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014; 6(1): a009191.

Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 296(4): E581-91.

Bozkurt E, Atmaca H, Uzunoğlu S. Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direnci. Genel Tıp Derg. 2013; 23: 133-43.

Brennan C. Genomic profiles of glioma. Curr Neurol Neurosci Rep. 2011; 11(3): 291-7.

Burri SH, Gondi V, Brown PD, Mehta MP. The Evolving Role of Tumor Treating Fields in Managing Glioblastoma: Guide for Oncologists. Am J Clin Oncol. 2018; 41(2): 191-96.

Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. EMBO Mol Med. 2014; 6(11): 1359–70.

Carnero A, Paramio JM. The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse Models. Front Oncol. 2014; 4: 252.

Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA ve ark. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. Science. 2002; 296(5569): 922-7.

Chakravarti A, Loeffler JS, Dyson NJ. Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. Cancer Res. 2002; 62(1): 200-7.

Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A ve ark. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. J Clin Oncol. 2004; 22(10): 1926-33.

Chang JE, Khuntia D, Robins HI, Mehta MP. Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. Clin Adv Hematol Oncol. 2007; 5(11): 894-902.

Cheng F, Guo D. MET in glioma: signaling pathways and targeted therapies. J Exp Clin Cancer Res. 2019; 38(1): 270.

Chitnis MM, Lodhia KA, Aleksic T, Gao S, Protheroe AS, Macaulay VM. IGF-1R inhibition enhances radiosensitivity and delays double-strand break repair by both non-homologous end-joining and homologous recombination. Oncogene. 2014; 33(45): 5262-73.

Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. Gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. Mol Cell. 2005; 20(5): 801-9.

Connell PP, Hellman S. Advances in radiotherapy and implications for the next century: a historical perspective. Cancer Res. 2009; 69(2): 383-92.

Cuevas EP, Escribano O, Chiloeches A, Ramirez Rubio S, Román ID, Fernández-Moreno MD ve ark. Role of insulin receptor substrate-4 in IGF-I-stimulated HEPG2 proliferation. J Hepatol. 2007; 46(6): 1089-98.

Çakır T, Güven M, Taşpınar M, Nur Denizler F, Kartal B. Sodyum Butirat'ın Glioblastoma Hücre Serisinde Radyosensitiviteye Etkisi. Van Tıp Derg. 2019; 26(4): 550-6.

Dağıstan Y, Dağıstan E, Güney MS. Sebepsiz kişilik değişiklikleri ile başlayan glioblastome multiforme: Bir olgu sunumu. Abant Tıp Derg. 2012; 1(1): 23-5.

Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clin J Oncol Nurs. 2016; 20: 2–8.

De la Monte SM. Insulin resistance and Alzheimer's disease. BMB Rep. 2009; 42(8): 475-81.

Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Kuiatse I, Lawrence NA, Zhang X ve ark. Mammary tumorigenesis and metastasis caused by overexpression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) or IRS-2. Mol Cell Biol. 2006; 26(24): 9302-14.

Delgado-Martin B, Medina MA. Advances in the Knowledge of the Molecular Biology of Glioblastoma and Its Impact in Patient Diagnosis, Stratification, and Treatment. Adv Sci (Weinh). 2020; 7(9): 1902971.

Dörpholz G, Murgai A, Jatzlau J, Horbelt D, Belverdi MP, Heroven C ve ark. IRS4, a novel modulator of BMP/Smad and Akt signalling during early muscle differentiation. Sci Rep. 2017; 7(1): 8778.

Facchino S, Abdouh M, Chatoo W, Bernier G. BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. J Neurosci. 2010; 30(30): 10096-111.

Firsanov DV, Solovjeva LV, Svetlova MP. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. Clin Epigenetics. 2011; 2(2): 283-97.

Georgoulis A, Vorgias CE, Chrousos GP, Rogakou EP. Genome Instability and γH2AX. Int J Mol Sci. 2017; 18(9): 1979.

Ghosh D, Nandi S, Bhattacharjee S. Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. Clin Transl Med. 2018; 7(1): 33.

Giubellino A, Burke TR Jr, Bottaro DP. Grb2 signaling in cell motility and cancer. Expert Opin Ther Targets. 2008; 12(8): 1021-33.

Gladson CL, Prayson RA, Liu WM. The pathobiology of glioma tumors. Annu Rev Pathol. 2010; 5: 33–50.

Gong Y, Ma Y, Sinyuk M, Loganathan S, Thompson RC, Sarkaria JN ve ark. Insulin-mediated signaling promotes proliferation and survival of glioblastoma through Akt activation. Neuro Oncol. 2016; 18(1): 48-57.

Görgişen G. İnsülin Direncinde İnsülin Reseptör Substrat 1 (IRS1) Proteinin Rolü. Bozok Tıp Dergisi. 2018; 8(3): 114-121.

Görgişen G, Çakır T, Ateş C, Gülaçar İM, Yaren Z. Overexpression of insulin receptor substrate 1 (IRS1) promotes radioresistance in A172 glioblastoma cell line. East J Med. 2019; 24(2): 204-9.

Görgişen G, Gulacar IM, Ozes ON. The role of insulin receptor substrate (IRS) proteins in oncogenic transformation. Cell Mol Biol. 2017; 63(1): 1-5.

Görgişen G, Yaren Z. Insulin receptor substrate 1 overexpression promotes survival of glioblastoma cells through AKT1 activation. Folia Neuropathol. 2020; 58(1): 38-44.

Gorgisen G, Hapil FZ, Yilmaz O, Cetin Z, Pehlivanoglu S, Ozbudak IH, Erdogan A, Ozes ON. Identification of novel mutations of IRS1 in tumor samples of Non-Small cell lung cancer (NSCLC): Implications for aberrant insulin signaling in development of cancer, Genetics and Molecular Biology, 2019; 42(1):15-25

Gupta K, Burns TC. Radiation-Induced Alterations in the Recurrent Glioblastoma Microenvironment: Therapeutic Implications. Front Oncol. 2018; 8: 503.

Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018; 19(1): 31-44.

Hakuno F, Takahashi SI. IGF1 receptor signaling pathways. J Mol Endocrinol. 2018; 61(1): T69-T86.

Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. Cell Cycle. 2009; 8(20): 3274–84.

Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD ve ark. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. Cell Death Differ. 2011; 18(5): 829-40.

Howard CM, Valluri J, Alberico A, Julien T, Mazagri R, Marsh R ve ark. Analysis of Chemopredictive Assay for Targeting Cancer Stem Cells in Glioblastoma Patients. Transl Oncol. 2017; 10(2): 241-4.

Hoxhaj G, Dissanayake K, MacKintosh C. Effect of IRS4 levels on PI3-kinase signalling. PLoS One. 2013; 8(9): e73327.

Ikink GJ, Hilkens J. Insulin receptor substrate 4 (IRS4) is a constitutive active oncogenic driver collaborating with HER2 and causing therapeutic resistance. Mol Cell Oncol. 2017; 4(2): e1279722.

Jia D, Lin W, Tang H, Cheng Y, Xu K, He Y ve ark. Integrative analysis of DNA methylation and gene expression to identify key epigenetic genes in glioblastoma. Aging. 2019; 11(15): 5579-92.

Jorgensen TJ. Enhancing radiosensitivity: targeting the DNA repair pathways. Cancer Biol Ther. 2009; 8(8): 665-70.

Kalkan R, Atlı Eİ. Geçmişten Günümüze Glioblastoma Genetiği. Türk Nöroşir Derg. 2014; 24(3): 239-249.

Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet. 2001; 27(3): 247-254.

Khosla D. Concurrent therapy to enhance radiotherapeutic outcomes in glioblastoma. Ann Transl Med. 2016; 4(3): 54.

King ER, Wong KK. Insulin-like growth factor: current concepts and new developments in cancer therapy. Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2012; 7(1): 14-30.

Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Nucleic Acids Res. 2008; 36(17): 5678-94.

Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. Mol Cancer. 2010; 9: 135.

Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo. 2008; 22(3): 305-9.

Lara PC, Pruschy M, Zimmermann M, Henríquez-Hernández LA. MVP and vaults: a role in the radiation response. Radiat Oncol. 2011; 6: 148.

Lavin DP, White MF, Brazil DP. IRS proteins and diabetic complications. Diabetologia. 2016; 59(11): 2280-91.

Lavin MF, Gueven N, Bottle S, Gatti RA. Current and potential therapeutic strategies for the treatment of ataxia-telangiectasia. Br Med Bull. 2007; 81-82: 129-147.

Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. Genes Dis. 2016; 3(3): 198-210.

Lee YH, White MF. Insulin receptor substrate proteins and diabetes. Arch Pharm Res. 2004; 27(4): 361-70.

Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. Biochem J. 2004; 382(Pt 1): 1-11.

Li L, Zhu T, Gao YF, Zheng W, Wang CJ, Xiao L ve ark. Targeting DNA Damage Response in the Radio(Chemo)therapy of Non-Small Cell Lung Cancer. Int J Mol Sci. 2016; 17(6): 839.

Li S, Zhang D, Yang L, Burnier JV, Wang N, Lin R ve ark. The IGF-I receptor can alter the matrix metalloproteinase repertoire of tumor cells through transcriptional regulation of PKC-{alpha}. Mol Endocrinol. 2009; 23(12): 2013-25.

Li X, Zhong L, Wang Z, Chen H, Liao D, Zhang R ve ark. Phosphorylation of IRS4 by CK1γ2 promotes its degradation by CHIP through the ubiquitin/lysosome pathway. Theranostics. 2018; 8(13): 3643-53.

Lloret M, Lara PC, Bordón E, Fontes F, Rey A, Pinar B ve ark. Major vault protein may affect nonhomologous end-joining repair and apoptosis through Ku70/80 and bax downregulation in cervical carcinoma tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009; 73(4): 976-9.

Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification: A molecular reappraisal. Am J Pathol. 2001; 159(3): 779–786.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK ve ark. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. 2016; 131(6): 803-20.

Ma Y, Tang N, Thompson RC, Mobley BC, Clark SW, Sarkaria JN ve ark. InsR/IGF1R Pathway Mediates Resistance to EGFR Inhibitors in Glioblastoma. Clin Cancer Res. 2016; 22(7): 1767-76.

Machado-Neto JA, Fenerich BA, Rodrigues Alves APN, Fernandes JC, Scopim-Ribeiro R, Coelho-Silva JL ve ark. Insulin Substrate Receptor (IRS) proteins in normal and malignant hematopoiesis. Clinics (Sao Paulo). 2018; 73(suppl 1): e566s.

Machado-Neto JA, Traina F. IRS1 (insulin receptor substrate 1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Hematol. 2013; 17 (9): 594-8.

Malaguarnera R, Belfiore A. The insulin receptor: a new target for cancer therapy. Front Endocrinol (Lausanne). 2011; 2: 93.

Mardilovich K, Pankratz SL, Shaw LM. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. Cell Commun Signal. 2009; 7: 14.

Maréchal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013; 5(9): a012716.

Maris C, D'Haene N, Trépant AL, Le Mercier M, Sauvage S, Allard J ve ark. IGF-IR: a new prognostic biomarker for human glioblastoma. Br J Cancer. 2015; 113(5): 729-37.

Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, Cominelli M, Franzin A, Sergi SL ve ark. Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. Cancer Res. 2010; 70(19): 7500-13.

McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. Cell. 2017; 168(4): 613-8.

Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. Trends Biochem Sci. 2011; 36(6): 320-8.

Morelli C, Garofalo C, Sisci D, del Rincon S, Cascio S, Tu X ve ark. Nuclear insulin receptor substrate 1 interacts with estrogen receptor alpha at ERE promoters. Oncogene. 2004; 23(45): 7517-26.

Nickoloff JA, Jones D, Lee SH, Williamson EA, Hromas R. Drugging the Cancers Addicted to DNA Repair. J Natl Cancer Inst. 2017; 109(11): djx059.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol. 2007; 170(5): 1445–53.

Osuka S, Sampetrean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E ve ark. IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. Stem Cells. 2013; 31(4): 627-40.

Pastwa E, Neumann RD, Mezhevaya K, Winters TA. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks. Radiat Res. 2003; 159(2): 251-61.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD ve ark. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell. 2006; 9(3): 157-73.

Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. Diabetologia. 2004; 47(2): 170-84.

Poloz Y, Stambolic V. Obesity and cancer, a case for insulin signaling. Cell Death Dis. 2015; 6(12): e2037.

Prasanna PG, Stone HB, Wong RS, Capala J, Bernhard EJ, Vikram B ve ark. Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the Gaps? Transl Cancer Res. 2012; 1(1):3 5-48.

Prise KM. New advances in radiation biology. Occup Med (Lond). 2006; 56(3): 156-61.

Qazi MA, Vora P, Venugopal C, Sidhu SS, Moffat J, Swanton C ve ark. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. Ann Oncol. 2017; 28(7): 1448-56.

Qiu GH. Protection of the genome and central protein-coding sequences by non-coding DNA against DNA damage from radiation. Mutat Res Rev Mutat Res. 2015; 764: 108-17.

Raju U, Molkentine DP, Valdecanas DR, Deorukhkar A, Mason KA, Buchholz TA ve ark. Inhibition of EGFR or IGF-1R signaling enhances radiation response in head and neck cancer models but concurrent inhibition has no added benefit. Cancer Med. 2015; 4(1): 65-74.

Rivera AL, Pelloski CE. Diagnostic and prognostic molecular markers in common adult gliomas. Expert Rev Mol Diagn. 2010; 10(5): 637-49

Sanmartin-Salinas P, Guijarro LG. Overexpression of IRS-4 Correlates with Procaspase 3 Levels in Tumoural Tissue of Patients with Colorectal Cancer. J Oncol. 2018; 2018: 3812581.

Sanmartín-Salinas P, Toledo-Lobo MV, Noguerales-Fraguas F, Fernández-Contreras ME, Guijarro LG. Overexpression of insulin receptor substrate-4 is correlated with clinical staging in colorectal cancer patients. J Mol Histol. 2018; 49(1): 39-49.

Sasmita AO, Wong YP, Ling APK. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. Asia Pac J Clin Oncol. 2018; 14(1): 40-51.

Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. FASEB J. 2001; 15(12): 2099-111.

Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. Cell Cycle. 2011; 10(11): 1750-6.

Simon T, Jackson E, Giamas G. Breaking through the glioblastoma micro-environment via extracellular vesicles. Oncogene. 2020; 39(23): 4477-4490.

Singh P, Alex JM, Bast F. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. Med Oncol. 2014; 31(1): 805.

Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD ve ark. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. Oncogene. 2009; 28(45): 3949-59.

Song X, Gjoneska E, Ren Q, Taverna SD, Allis CD, Gorovsky MA. Phosphorylation of the SQ H2A.X motif is required for proper meiosis and mitosis in Tetrahymena thermophila. Mol Cell Biol. 2007; 27(7): 2648-60.

Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB ve ark. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005; 352(10): 987-96.

Sümer-Turanlıgil NC, Uyanıkgil Y. Hücre içi sinyal yolakları ve klinik yansımaları. Arşiv Kaynak Tarama Derg. 2010; 19: 5-12.

Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. Cell Res. 2012; 22(3): 457-72.

Tesei A, Sarnelli A, Arienti C, Menghi E, Medri L, Gabucci E ve ark. In vitro irradiation system for radiobiological experiments. Radiat Oncol. 2013; 8: 257.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS ve ark. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014; 23(10): 1985-96.

Trojanek J, Croul S, Ho T, Wang JY, Darbinyan A, Nowicki M ve ark. T-antigen of the human polyomavirus JC attenuates faithful DNA repair by forcing nuclear interaction between IRS-1 and Rad51. J Cell Physiol. 2006; 206(1): 35-46.

Trojanek J, Ho T, Del Valle L, Nowicki M, Wang JY, Lassak A ve ark. Role of the insulin-like growth factor I/insulin receptor substrate 1 axis in Rad51 trafficking and DNA repair by homologous recombination. Mol Cell Biol. 2003; 23(21): 7510-24.

Turinetto V, Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. Nucleic Acids Res. 2015; 43(5): 2489-98.

Uchida T, Myers MG Jr, White MF. IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. Mol Cell Biol. 2000; 20(1): 126-38.

Valenciano A, Henríquez-Hernández LA, Moreno M, Lloret M, Lara PC. Role of IGF-1 receptor in radiation response. Transl Oncol. 2012; 5(1): 1-9.

Valentinis B, Navarro M, Zanocco-Marani T, Edmonds P, McCormick J, Morrione A ve ark. Insulin receptor substrate-1, p70S6K, and cell size in transformation and differentiation of hemopoietic cells. J Biol Chem. 2000; 275(33): 25451-9.

van der Veeken J, Oliveira S, Schiffelers RM, Storm G, van Bergen En Henegouwen PM, Roovers RC. Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy. Curr Cancer Drug Targets. 2009; 9(6): 748-60.

van Oorschot B, Granata G, Di Franco S, Ten Cate R, Rodermond HM, Todaro M ve ark. Targeting DNA double strand break repair with hyperthermia and DNA-PKcs inhibition to enhance the effect of radiation treatment. Oncotarget. 2016; 7(40): 65504-13.

Venkatesan S, Lamfers ML, Dirven CM, Leenstra S. Genetic biomarkers of drug response for small-molecule therapeutics targeting the RTK/Ras/PI3K, p53 or Rb pathway in glioblastoma. CNS Oncol. 2016; 5(2): 77-90.

Wagner MJ, Stacey MM, Liu BA, Pawson T. Molecular mechanisms of SH2- and PTB-domain-containing proteins in receptor tyrosine kinase signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013; 5(12): a008987.

Wang Y, Liu X, Guan G, Zhao W, Zhuang M. Risk Classification System With Five-Gene for Survival Prediction of Glioblastoma Patients. Front Neurol. 2019; 10: 745.

Weischenfeldt J, Dubash T, Drainas AP, Mardin BR, Chen Y, Stütz AM ve ark. Pan-cancer analysis of somatic copy-number alterations implicates IRS4 and IGF2 in enhancer hijacking. Nat Genet. 2017; (1): 65-74.

Witthayanuwat S, Pesee M, Supaadirek C, Supakalin N, Thamronganantasakul K, Krusun S. Survival analysis of glioblastoma multiforme. Asya Pac J Cancer Prev. 2018; 19(9): 2613–17.

Xu F, Na L, Li Y, Chen L. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. Cell Biosci. 2020; 10: 54.

Yang P, Kang W, Pan Y, Zhao X, Duan L. Overexpression of HOXC6 promotes cell proliferation and migration via MAPK signaling and predicts a poor prognosis in glioblastoma. Cancer Manag Res. 2019; 11: 8167-79.

Yarchoan M, Toledo JB, Lee EB, Arvanitakis Z, Kazi H, Han LY ve ark. Abnormal serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 is associated with tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies. Acta Neuropathol. 2014; 128(5): 679-89.

Yashavarddhan MH, Shukla SK, Sharma AK. Can γH2AX assay be an endpoint in drug discovery? Clin Pharmacol Toxicol Res. 2017; 1(1): 9-12.

Yılmaz A, Altuğ A, Düz E, Çırak B. Glioblastoma Multiformede Tedavi Seçenekleri ve Yaşam Sürelerine Etkileri. J Kartal TR. 2012; 23(1): 25-9.

Yoshimura M, Itasaka S, Harada H, Hiraoka M. Microenvironment and radiation therapy. Biomed Res Int. 2013; 2013: 685308.

Zhang M, Liu J, Li M, Zhang S, Lu Y, Liang Y ve ark. Insulin-like growth factor 1/insulin-like growth factor 1 receptor signaling protects against cell apoptosis through the PI3K/AKT pathway in glioblastoma cells. Exp Ther Med. 2018; 16(2): 1477-82.

EKLER

EK1. Tez Orijinallik Raporu

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

YÜKSEK LİSANS TEZİ ORİJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	Glioblastoma Multiforme'de IRS4 Proteinin Radyoterapi Üzerindeki Rolünün Belirlenmesi

İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
1	**III-V-VI/1-2**	**3-23**	**38-48**	**38**

İntihal taraması yapılan program	Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %
Turnitin	**05/07/ 2021**	**%4**

***Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:**	
- Kabul ve onay sayfası hariç,	- Gereç ve yöntemler hariç,
- Teşekkür hariç,	- Kaynakça hariç,
- İçindekiler hariç,	- Alıntılar hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,	-Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)	

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: AYSUN ARSLAN

İmza:

Öğrencinin Adı Soyadı	AYSUN ARSLAN
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji
Öğrenci No	18930002009
Programı	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI	**ENSTİTÜ ONAYI**
UYGUNDUR	UYGUNDUR
Doç. Dr. Gökhan Görgişen	**Doç. Dr. Hamit Hakan ALP**
	Sağlık Bilimleri Enstitü Müdür Yardımcısı