



AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YL-2022-0024

RABDOMYOSARKOM HÜCRE DİZİSİNDE ONKOGENİK
WIP1 FOSFATAZIN VE DNA HASARI CEVABI
REGÜLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

EBRU DEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

RABDOMYOSARKOM HÜCRE DİZİSİNDE ONKOGENİK
WIP1 FOSFAZİN VE DNA HASARI CEVABI
REGÜLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Ebru DEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF21001 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde değerli bilgilerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e sonsuz teşekkür ediyorum.

Tezimi değerlendirilmeleri ve vermiş oldukları tavsiyeler başta olmak üzere yoğun çalışmalarına rağmen tez jüriliğimi kabul ederek beni onurlandıran Prof. Dr. Ali Ozmen, Prof.Dr. Leyla Didem Kozacı hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmam sırasında laboratuvarlarından faydalandığım Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmaları süresince beni yalnız bırakmayan, fiili ve manevi desteğini esirgemeyen, Ayfer KARLITEPE'ye teşekkür ederim. Yine çalışmalarımnda bana destek olan Hatice PİLEVNELİ ve Ceylan AK'a teşekkür ederim.

Bu zamana kadar beni yetiştiren, maddi manevi destekleyen, beni hiçbir konuda yalnız bırakmayan annem/ babam Vesile/ Veysel DEMİR'e, yürekten teşekkür ederim. Bana maneviyen hep destek olan ablam Elif AVCI'ya, yengem Ebru DEMİR'e, varlığı hayatıma neşe katan yiğenlerim Fatma Gökçe AVCI'ya, Alperen Veysel DEMİR'e, Metehan DEMİR'e ve her zaman varlığıyla güçlü hissettiğim abim Hasan DEMİR'e, sonsuz teşekkür ederim.

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi TPF21001 nolu proje ile çalışmamı desteklediği için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
TEŞEKKÜR	İ
İÇİNDEKİLER.....	İİ
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	6
2.1.Rabdomyosarkom.....	6
2.3. PPM1D/Wip1 Fosfatazın Regülasyonu ve DDR’de Rolü.....	9
2.3.2. Wip1’in Apoptozis Üzerine Etkisi	12
2.3.3. Wip1’in kontrol noktaları üzerine etkisi.....	13
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
3.1.Gereç.....	15
3.1.1.Kullanılan Hücre Dizisi, Cihazlar ve Aletler.....	15
3.2.Yöntem	17
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	17
3.2.2. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması.....	17
3.2.3. Hücrelerin Sayım Yöntemi.....	17
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması	18
3.2.5. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği	19
3.2.6. Kemoterapötik İlaç Stoklarının Hazırlanması	19
3.2.7. Hücre Kültürü Çalışmalarının ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanışı ..	21
3.2.8. A204 Hücre Hattında MTT Hücre Canlılığı Testi	21
3.2.9. A204 Hücre Hattında Annexin V Apoptozis Testi.....	22
3.2.10. Western Blot Analizi İçin Yapılan Çalışmalar.....	23
3.2.10.1. Protein İzolasyonu ve Protein Miktar Tayini.....	23
3.2.10.2. Western Blot Analizi	24
3.2.10.3. Poliakrilamid Jelin (SDS-PAGE) Hazırlanması.....	26
3.2.10.4. Jele Yüklenecek Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	27

3.2.10.5. Elektroforetik Yürütme İşlemi.....	28
3.2.10.6. Yarı-Kuru Transfer (Semi-Dry Blotting)	28
3.2.10.7. Membranı Bloklama İşlemi	29
3.2.10.8. Membranın Primer Antikor İle Muamelesi	29
3.2.10.9. Kemilüminesans Yöntemi İle Membranı Görüntüleme	30
4. BULGULAR	31
4.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının ve Sitotoksik Etkinin 24, 48 ve 72 s Sonuçları	31
4.2. Annexin-V Testi ile Hücre Ölümü Analizi 24, 48 ve 72 s Sonuçları.....	34
4.3. Etoposid ve GSK2830371 uygulamasının wip1, p53 seviyesi üzerine Etkileri.....	38
5. TARTIŞMA.....	40
5.1. A204 Hücrelerinde Wip1'in GSK2830371 Tarafından İnhibisyonu	40
5.2. Etoposid Uygulamasının A204 Hücreleri Üzerinde Etkileri.....	42
5.3. GSK ve Eto Uygulamasının A204 Hücrelerinde Apoptotik Etkileri	43
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR.....	47
EKLER	56
Ek 1 (24 Saat MTT İstatik Analizleri).....	56
Ek 2 (48 Saat MTT İstatik Analizleri).....	58
Ek 3 (72 Saat MTT İstatik Analizleri).....	60
Ek 4 (24 Saat Annexin İstatik Analizleri)	62
Ek 5 (48 Saat Annexin İstatik Analizleri)	64
Ek 6 (72 Saat Annexin İstatik Analizleri)	66
BİLİMSEL ETİK BEYANI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
ÖZ GEÇMİŞ.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A°: Amper

ADM: Adrenomedullin

ATM: Ataxia telangiectasia mutated kinase

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase

BSA: Bovin serum albumin

Chk1: Kontrol noktası kinazı 1

Chk2: Kontrol noktası kinazı 2

DDR: DNA hasarı cevabı

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

FBS: Fetalbovin serum

GAPDH: Gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz

I.R.: İyonize radyasyon

MEF: Mouse embriyonikfibroblastı

mmHg: Milimetre Civa

µm: Mikro metre

µM: Mikro molar

O₂: Oksijen

P53: Tümör protein 53

PBS: Fosfat tuzu tamponu

PPM1D: Protein fosfataz 1D magnezyum bağımlı

RMS: Rhabdomyosarcoma

RNA: Ribonükleik asit

UV: Ultraviyole

V: Volt

Wip1: Wild type p53 indüklüfosfataz 1

wt: Yabani tip (wildtype)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. P53'ün aktivitesi üzere gerçekleşebilen hücre içi reaksiyonlar.	2
Şekil 2. PPM1D/Wip1 geninin, 17q23 bölgesi içinde gösterimi.	3
Şekil 3. Etoposid molekülü ve Wip1 fosfataz inhibitörü GSK'nın açık kimyasal yapısı.....	4
Şekil 4. DNA hasar yanıt reaksiyonları.....	8
Şekil 5. Wip1'in hedefleri fonksiyonel aktivasyonunun sonuçları	9
Şekil 6. Wip1 fosfataz düzenlenmesi ve hedefleri	11
Şekil 7. Neuber lamının mikroskop altındaki temsili görünüşü.....	18
Şekil 8. A204 hücrelerinde 24s Eto, GSK ve Eto+ GSK uygulaması, MTT analizi sonuçları	31
Şekil 9. A204 hücrelerinde 48s Eto, GSK ve Eto + GSK uygulaması, MTT analizi sonuçları	32
Şekil 10. A204 hücrelerinde 72s Eto, GSK ve Eto + GSK uygulaması, MTT analizi sonuçları	33
Şekil 11. A204 hücrelerinde 24 Saat Annexin V/7AAD analizi sonuçları	35
Şekil 12. A204 hücrelerinde 48 Saat Annexin V/7AAD analizi sonuçları	36
Şekil 13. A204 hücrelerinde 72 Saat Annexin V/7AAD analizi sonuçları	37
Şekil 14. A204 hücrelerinde Eto, GSK ve Eto + GSK'nın 48 saatte western sonuçları	38
Şekil 15. A204 hücrelerinde 24-48-72 Saat ANNEXİN V/7AAD analizi karşılaştırması	43

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan hücrenin özellikleri ve tipi	15
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve aletlerin listesi	15
Tablo 3. Çalışmada kullanılan Eto konsantrasyonları	20
Tablo 4. Çalışmada kullanılan tek başına GSK ve Eto+GSK kombinasyonlarının konsantrasyonları.....	20
Tablo 5. Paketleyici ve ayırıcı jelin içeriği ve miktarları.....	27
Tablo 6. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon katsayıları.....	29
Tablo 7. Kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyon katsayıları	30
Tablo 8. 48 saatlik Western Blot sonuçlarının karşılaştırılmalı olarak işaretel tablosu	44

ÖZET

RABDOMYOSARKOM HÜCRE DİZİSİNDE ONKOGENİK WIP1 FOSFATAZIN VE DNA HASARI CEVABI REGÜLASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

DEMİR E. 2021, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022

Amaç: RMS A204 hücre hattında onkojenik Wip1 fosfatazın genotoksik stres kaynaklı (etoposid) apoptoz aktivasyonu üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, A204 hücrelerinde etoposid, GSK2830371 ve etoposid + GSK2830371 kullanılarak; Hücre canlılığı, 24-48-72 saatlik inkübasyonun ardından MTT ile analizi edildi. Apoptozu indüklemek için 24-48-72 saatlik inkübasyonun ardından Annexin V testi yapıldı. WIP1, GAPDH, fosfo p53 ve total p53 proteinlerinin seviyeleri, 48 saatlik inkübasyonun ardından Western blot analizi ile ölçülmüştür.

Bulgular: Etoposide'in GSK ile kombinasyonu halinde zamana ve doz artışına bağlı olarak metabolik aktiviteyi azalttığı MTT testi ile belirlenmiştir. Etoposid ve GSK kombinasyonun da zaman artışına bağlı olarak apoptoz miktarında artış olduğu Annexin V testi ile saptanmıştır. Etoposid + GSK kombinasyonunun Wip1'in baskılanmasıyla fosfo p53 proteini seviyesinde artışa sebep olduğu Western Blot analizi ile tespit edilmiştir.

Sonuç: bu çalışmada, A204 rabdomyosarkom hücre hattında PPM1D amplifikasyonu nedeniyle aşırı artan Wip1 ekspresyonunu inhibe ederek genotoksik stres oluşturan bir kemoterapi ajanı olan etoposidin etkinliği ve bu hücrelerin apoptoz yoluyla kemoterapiye yanıtı araştırıldı.

Anahtar kelimeler: DNA hasarı cevabı (DDR), A204, Rabdomyosarkom (RMS), Wip1 fosfataz.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ONCOGENIC WIP1 PHOSPHATASE AND DNA DAMAGE RESPONSE REGULATION IN RHABDOMYOSARCOMA CELL LINE.

DEMIR E. 2021, Aydin Adnan Menderes University Institute of Health Sciences, Faculty of Medicine, Medical Biology Program Master Thesis, Aydin, 2022

Objective: It was aimed to investigate the effect of oncogenic Wip1 phosphatase on genotoxic stress-induced (etoposide) apoptosis activation in RMS A204 cell line.

Material and Methods: In the study, using etoposide, GSK2830371, and etoposide + GSK2830371 in A204 cells; Cell viability was tested by MTT analysis after 24-48-72 hours of incubation. Annexin V test was performed at the end of the 24-48-72 hours period to induce apoptosis. The levels of WIP1, GAPDH, phospho p53, and total p53 proteins were measured by Western blot analysis at 48 hours.

Results: It has been determined by the MTT test that Etoposide reduces metabolic activity depending on time and dose increase in combination with GSK. It was determined by the Annexin V test that the combination of etoposide and GSK also increased the amount of apoptosis depending on the increase in time. It was determined by Western blot analysis that the combination of etoposide + GSK caused an increase in the level of phospho p53 protein by suppressing Wip1.

Conclusion: in this study, the efficacy of etoposide, a chemotherapy agent that creates genotoxic stress by inhibiting the excessively increased expression of Wip1 due to PPM1D amplification in A204 rhabdomyosarcoma cell line, and the response of these cells to chemotherapy were investigated through apoptosis.

Key words: DNA damage response (DDR), A204, Rhabdomyosarcoma (RMS), Wip1 phosphatase.

1. GİRİŞ

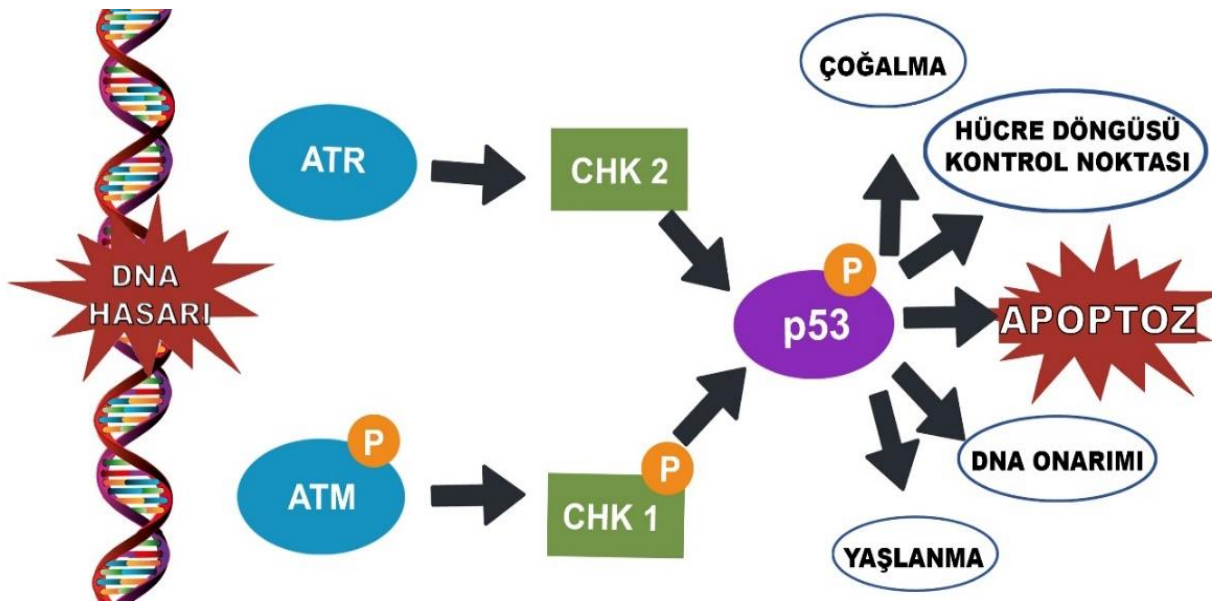
Kanserin tanımını ilkekez Hippokrat yapmış vetümörün etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için Latince yengeç anlamına gelen "canker" veya "carcinus" kelimelerinden türetmiştir (Baykara, 2016). Kanser çoklu moleküler değişikliği kapsayan heterojen bir hastalıktır. Genomikstabilitenin korunması, DNA replikasyonundan kaynaklanan hataları, hücrenel metabolizmadan kaynaklanan reaktif oksijen türleri (ROS) gibi endojengenotoksik stresi ve eksojen kanserojen hakaretleri önlemek için hücrenel bütünlük için gereklidir (Yao ve Dai, 2014). Genomik kararsızlık; baz çifti mutasyonu sıklıklarının artışı ve mikrosatellit kararsızlığını içerir. Bununla birlikte, kromozom sayısında veya yapısındaki varyasyonlara kromozom kararsızlığı adı verilir (Al-Sohaily ve diğerleri, 2012, Roschke ve Kirsch, 2010).

Rabdomiyosarkom (RMS), çocuklarda en sık görülen yumuşak doku sarkomudur. Histolojik özelliklerine göre, embriyonal rabdomiyosarkom, alveolar rabdomiyosarkom, pleomorfik rabdomiyosarkom ve iğsi hücre/sklerozan rabdomiyosarkom olmak üzere dört alt tipi vardır (Kallen ve Hornick, 2021). Yumuşak doku sarkomları, patolojik ve klinik olarak farklılık gösteren nadir bir mezenkimal tümör grubudur. Bu tümörlerin çoğu, translokasyonlar olarak ortaya çıkan spesifik iskelet kası öncü hücrelerinin kromozomal anormallikleri ile ilişkilidir (Charytonowiczve ve diğerleri, 2009). Alveolar rabdomiyosarkomlu hastalarının çoğunda; $t(2;13)$, (q35; q14) veya $t(1;13)$ (q36;q14) kromozomal translokasyonları tespit edilmiştir. Benzer şekilde bu hastaların yaklaşık %60'ında *PAX3-FOXO1* geninin, %20'sinde ise *PAX7-FOXO1* geninin ifade edildiği tespit edilmiştir (Barr ve diğerleri, 2002; Wachtel ve diğerleri, 2004).

RMS; iskelet kası, bağ dokusu, kemik, mesane, burun, göz çukuru, prostat, testis ve anüs gibi yumuşak dokularda ortaya çıkabildiği rapor edilmiştir (Ognjanovic ve diğerleri, 2009). RMS hastaların yaklaşık olarak %70'i 10 yaşından önce teşhis edilmesine rağmen, ergenlik ve erişkin dönemlerde de rastlanılabilmektedir (Miwa ve diğerleri, 2020).

RMS'de diğer kanserlerin ilerlemesi gibi; kontrolsüz hücre büyümesi ve farklılaşmasının yanı sıra, hücre popülasyonunda büyük bir genişlemeye yol açan apoptotik fonksiyonların kaybının bir sonucudur (Safarzadeh ve diğerleri, 2014). Bu sebep ile çoğu antikanser tedavisinin, kemoterapi veya radyoterapi, esas olarak kanser hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) tetikleyerek hareket ettiği düşünülmektedir.

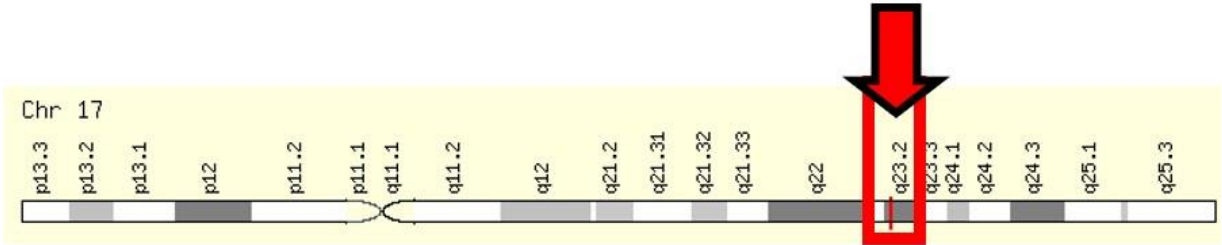
Bir memeli genomunda hücrel metabolizma, kendiliğinden bozulma ve replikasyon hataları nedeniyle her gün yaklaşık olarak 10^5 DNA lezyonlarının ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (Hoeijmakers, 2009). Ökaryotik hücrelerde genomik stabilitenin sürdürülmesi için herhangi bir DNA hasarı meydana geldiğinde DNA tamirinin devreye girmesi için korunmuş bir DNA hasarı yanıtı (DNA DamageResponse;) olan DDR bulunur (Bartkova ve diğerleri, 2005). Bu koruma mekanizması, genom dengesizliğini önleyen ve hücreleri tümör gelişimine karşı koruyan içsel bir bariyeri temsil eder (Karlsson-Rosenthal ve Millar, 2006). DDR, DNA hasarına yanıt olarak aktive edilen bir süreçtir, DNA tamirini koordine eden mekanizmaların düzenlenmesinden sorumludur ve DNA'da meydana gelen hasarı gidererek hücrenin genomik bütünlüğünü korumayı hedefler (Zannini ve diğerleri, 2014). DDR'nin tetiklenmesiyle fosforilasyon yoluyla aktive olan bir dizi sinyal kaskadı başlatılır. Hücrede DNA hasarı algılandığında ATM/ATR, Chk2/Chk1 kinazların aktivasyonu ve takiben p53'ün hızlı aktivasyonu sağlanır. Şekil 1.'de p53'ün aktivitesi üzere gerçekleşebilen hücre içi reaksiyonlar gösterilmektedir.



Şekil 1. P53'ün aktivitesi üzere gerçekleşebilen hücre içi reaksiyonlar.

Şekil 1.'de gösterildiği üzere p53 hücre döngüsünün durdurulması, senesens, proliferasyon, DNA tamiri ve apoptozise aracılık eden çok sayıda genin transkripsiyonel aktivasyonunu da sağlar (Jackson ve Bartek, 2009). DDR'de p53 tarafından başlatılan DNA onarım işleminin bitirilmesiyle bu hücrelerde, hücre döngüsünün tekrar başlatılabilmesi için p53'ün fosforilasyon düzeyini azaltarak görev yapan fosfatazlar da yer almaktadır. Bir Serin/Treonin (Ser/Thr) fosfataz olan PPM1D/Wip1 p53'ün fosforilasyon düzeyini doğrudan

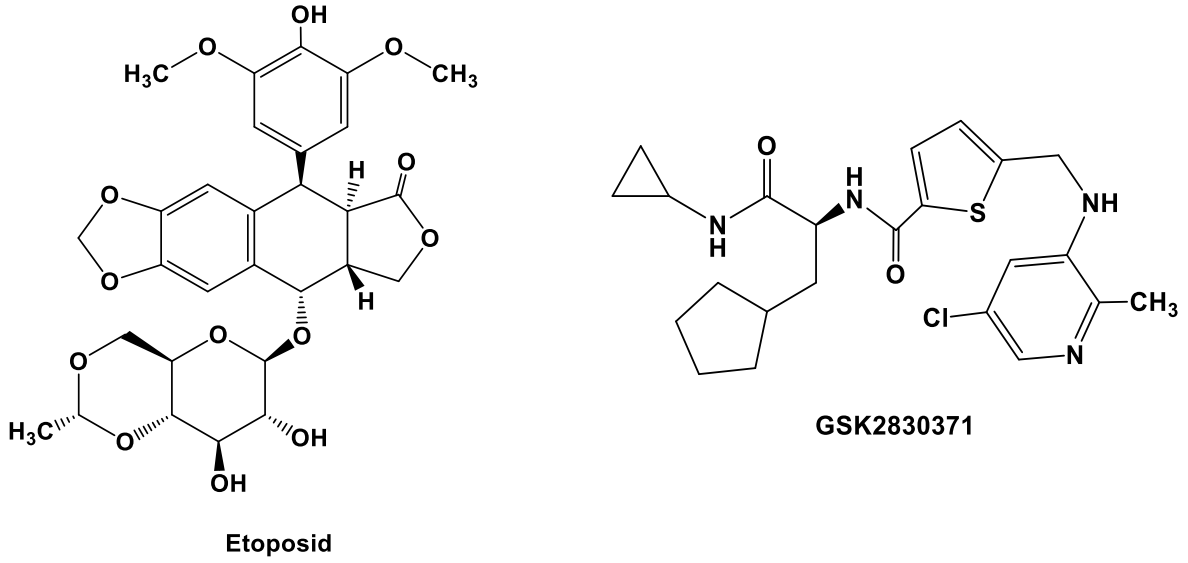
ve dolaylı olarak azaltan ve p53'e de bağılı olarak indüklenen en önemli fosfatazdır (Lu ve diğeri, 2004). Şekil 2.' de gösterildiği üzere PPM1D/Wip1, 17q23 bölgesi içinde lokalizedir ve insan Wip1 proteinini kodlar.



Şekil 2. PPM1D/Wip1 geninin, 17q23 bölgesi içinde gösterimi.
(<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PPM1D>
05.08.2021 tarihinde modifiye edilerek alınmıştır)

Esasen PPM1D/Wip1 özellikle genotoksik stresle p53'e bağılı olarak indüklenen bir gendir ve Wip1de p53'ün ATM/ATR kinazlarca başlatılan aktivasyonunu kapatmada p53'ü defosforile etmek yoluyla rol oynamaktadır. (Pommier diğeri, 2010). Wip1'in regülasyonu bozulmuş ve sürekli ifade edilmeye başlanmışsa onkogen özelliği kazanmakta ve ATM/ATR aracılı DNA hasarı cevabını ve p53'e bağılı tümör süpresör cevapları (apoptosis, senesens) inhibe ederek tümörigenezi teşvik edebilmektedir (Cosseve diğeri, 2007). Wip1 kendi başına kanser başlatan bir onkogen olarak hareket etmeyebilir, ancak birden fazla hedef molekül üzerindeki baskılayıcı işlevi aracılığıyla P53'ü inhibe ederek tümör gelişimine sebep olabilir. Bu neden ile PPM1D geninin aşırı ifade edilmesi Wip1'in onkogen özelliği kazanmasına sebep olmaktadır. Bulunan bu sonuç Wip1'in up-regülasyonunun kanserde önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Wip1'in p53'ü inhibe etmesiyle tümörigenezin teşvik edildiği önemli bir mekanizma olabileceğini ortaya koymaktadır (Manvati ve diğeri, 2014).

Etoposid, DNA ve topoizomeraz II enzimini inhibe eder ve böylelikle DNA ipliklerinin yeniden bağlanmasını önleyen bir kemoterapötik ilaçtır (Şekil 3). Testis, akciğer, lenfoma, lösemi, nöroblastoma ve yumurtalık kanserlerinde tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Krishna, 2007). Topoizomeraz inhibitörü olan etoposid molekülü hücre bölünmesinin premitotik aşamasında ciddi DNA hatalarına neden olur ve bu durum kanser hücresinin apoptoza yönelmesine neden olur (Pommier ve diğeri, 2010). Şekil 3'de Etoposid molekülü ve Wip1 fosfataz inhibitörü GSK'nın açık kimyasal yapısını görmekteyiz.



Şekil 3. Etoposid molekülü ve Wip1 fosfatazinhibitörü GSK2830371'nin açık kimyasal yapısı

Roos ve Kaina 2006 yılında yaptığı çalışmada spesifik DNA lezyonlarının apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir (Roos ve Kaina, 2006). Etoposid kemoterapisinin, çocuklarda ve genç yetişkinlerde RMS için %69 genel yanıt oranı ile oldukça aktif bir rejim olduğu bulunmuştur (Sasadave diğerleri, 2016). Etoposide apoptozu indükleyerek tümör büyümesini baskıladığından, bu kemoterapi ajanı insan RMS hücrelerinde hücre ölümünü teşvik edebileceği bilinmektedir. Bu çalışmada, Etoposid'in Wip1 varlığında ve yokluğunda RMS hücre dizisinde zamana ve doza bağlı büyümeyi inhibe edici etkileri araştırılmıştır. RMS tedavisinin başarısızlığı genellikle kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara direnci temelinde değerlendirilir. Bu nedenle, apoptotik savunmanın restorasyonunu kullanan yenilikçi bir terapötik yaklaşım, oldukça kötü huylu tümöre sahip hastaların tedavisi için etkili olabilir.

GSK2830371 (kısaca GSK); oral aktif, allosterik Wip1 fosfataz inhibitörüdür ve IC₅₀ değeri 6 nM'dir (Şekil 3) (Gilmartin ve diğerleri, 2014). İnhibitörün IUPAC adı şu şekildedir; 5-[[[(5-kloro-2-metil-3-piridinil)-amino]metil]-N-[(1S)-1-(siklopentilmetil)-2-(siklopropilamino)-2-okzoetil]-2-tiofenekarboksamit, (S)-5-(((5-kloro-2-metilpiridin-3-il)-amino)metil)-N-(3-siklopentil-1-(siklopropilamino)-1-okzopropan-2-yl)-tiofen-2-karboksiamit.

Bu tez çalışmasında A204 hücre dizisi kullanılarak, Etoposid'in GSK2830371 (GSK) ile sinerjistik etki gösterip göstermediği araştırılmıştır. Wip1'in RMS'de apoptozis direncine

etkisi araştırılmıştır. Ayrıca olası direnç mekanizmasını aydınlatmak üzere Wip1 varlığında ve yokluğunda etoposidle indüklenen DDR sinyal yolağı ile ilişkili protein p53'ün total ve/veya fosforilasyon düzeyleri test edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Rabdomyosarkom

Kanser tüm dünyada halen en sık rastlanılan ölüm nedenlerinden birisi olarak yerini korumaktadır. Kanserın moleküler temelının anlaşılmasında, teşhisinde ve tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Tedavi rejimlerindeki ilerlemelere rağmen, yüksek riskli RMS'li hastaların, özellikle de primermetastatik veya nükseden hastalığı barındıran hastaların sağkalımın da son on yılda önemli ölçüde bir değişiklik görülmediği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Malempati ve Hawkins, 2012). Bununla birlikte kanser mortalite oranı halen çok yüksek olup yeni tedavi yaklaşımlarına gereksinim duyulmaktadır.

RMS'nin ilk tanımı 1854'te Weber tarafından yapılmıştır. Bununla birlikte, ilk yayının 92 yıl sonra 1946'da Stout tarafından yapıldığı düşünülmektedir (Stout, 1946). Dört alt tipi vardır; embriyonal rabdomiyosarkom, alveolar rabdomiyosarkom, pleomorfik rabdomiyosarkom ve iğsi hücre/ sklerozan rabdomiyosarkom (Kallen ve Hornick, 2021). RMS, iskelet kası miyositlerine tam olarak farklılaşamayan mezenkimal hücrelerden gelişen oldukça agresif bir kanser türüdür. Bu tümör hücreleri rabdomiyoblastlar olarak tanımlanır (Kallen ve Hornick, 2021). Rabdomiyosarkomların, adından da anlaşılacağı gibi, iskelet kası ile ilişkili olduğu varsayılır. Ancak şaşırtıcı bir şekilde, bu tümörler histolojik olarak prostat, idrar kesesi veya safra kesesi gibi iskelet kası olmayan çeşitli yumuşak doku veya viseral bölgeleri içerirler. Çoğu agresif bir klinik seyrederek. (Dashti ve Cates, 2021; Spunt ve diğerleri, 2000).

Bu tümörün, çeşitli gelişimsel genler, dış büyüme faktörleri ve hücre döngüsü ile ilişkili genler aracılığıyla sıkı bir şekilde düzenlenen normal miyojenikproliferasyon ve farklılaşma süreçlerinin kesintiye uğraması yoluyla iskelet kası öncü hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Rabdomiyosarkomla ilişkili çoklu genetik lezyonlar vardır (Shern ve diğerleri, 2014). Bir kimerik protein olan PAX-FOXO1'in aktif transkripsiyon faktörü olarak görev aldığı ve abnormal genlerin tetiklenmesi yoluyla onkogenik transformasyona yol açtığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde; PAX-FOXO1 füzyon proteinlerinin onkogenik potansiyeli olduğu ve füzyon-pozitif RMS'de tümörleşmede dominant onkogenler olarak fonksiyon gördükleri tespit edilmiştir (Xia ve diğerleri, 2002; Fredericks ve diğerleri, 2000). Bu

raporlara dayanarak PAX-FOXO1'in potansiyeli yüksek bir terapötik hedef ve PAX-FOXO1 translokasyonu olan RMS hastalarında prognozu öngören güçlü bir markör olabileceği rapor edilmiştir (Miwa ve diğerleri, 2020).

Bununla birlikte, bu tümörlerin sıklıkla çeşitli kromozomalabnormalitelerle ilişkili olduğu ve bunlarla ilişkili olarak tümör baskılayıcı p53 geninin fonksiyonunu kaybetmesi sonucu geliştiği farklı çalışmalarla ortaya konmuştur (Parham ve Ellison, 2006; Borden ve diğerleri, 2003). Kanser gelişiminde aktif rol oynayan genlerin hasar alması durumunda ilgili hücrede apoptoz mekanizmasının aktive edilmesi büyük önem taşımaktadır (Su ve diğerleri, 2015).

2.2. DNA Hasarı ve DNA Hasarı Cevabı

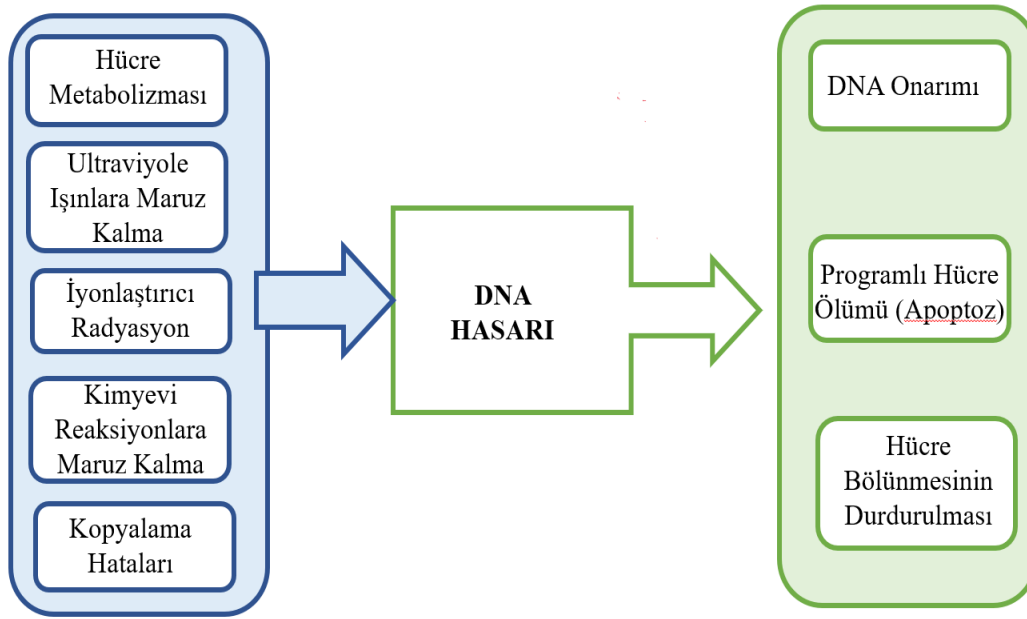
Hücre genomu dinamik bir yapıya sahip olduğu için hem hücre metabolizması ve replikasyon gibi doğal süreçler hem de çevresel faktörlerin etkisiyle devamlı hasara maruz kalmaktadır. DNA molekülünde mutasyona neden olan faktörler genom yapısının fonksiyonel yapısında istenmeyen değişikliklere yol açarlar (Turgeon ve diğerleri, 2018).

Bu faktörler; iyonize radyasyon, U.V. ışınları, sigara, alkilleyici ajanlar, aflatoksinler, vinilklorid, hardal gazları vs. gibi dış kaynaklı (çevresel) olabileceği gibi, hücre içerisinde meydana gelen yanlış eşleşmeler (insersiyon, delesyon gibi), deaminasyon ve metilasyon gibi kimyasal değişimler, baz kayıpları, oksidatif hasar ve replikasyon hataları gibi iç kaynaklı faktörleride içermektedir (Zannini ve diğerleri, 2014). Hücrelerin maruz kaldığı iç ve dış kaynaklı stres faktörleri DNA'da basit baz değişikliklerine neden olabilir veya delesyonlar, füzyonlar, translokasyonlar veya anöploidi gibi daha karmaşık değişikliklere neden olabilir (Sancar ve diğerleri, 2004). Ayrıca DNA hasarları mutajenik etkiye sahip oldukları için; replikasyon sırasında tamir edilemezlerse kanser ve yaşlanma gibi ağır insan patolojilerini açığa çıkarırlar (Bhattacharjee ve Nandi, 2017). Bu tür değişiklikler nihayetinde tek hücreli organizmaların hücre ölümüne veya çok hücreli organizmaların dejeneratif değişikliklerine ve yaşlanmasına yol açabilir.

DNA hasarı oluştuğunda, belirli kromozomal yapı değişiklikleri veya H2AX histonunun fosforilasyonu (fosforile formu; γ -H2AX) gibi histon modifikasyonlarıyla DDR yolu

aktifleştirilebilir. γ -H2AX yapısı DDR faktörlerin DNA hasar bölgesine entegrasyonunda ve dolayısıyla DNA tamirinde kritik role sahiptir (Cha ve diğerleri, 2010).

Bu tedbirlerin alınmasını sağlayacak olan en önemli sinyal kaskadı ise DDR'dır (Blackford ve Jackson, 2017). DNA hasarının tetiklediği ve buna bağlı olarak hasarı nötralize edilebilen veya varsayılan tamir yolları; DNA tamiri, DNA hasar kontrol noktaları, transkripsiyonel yanıt ve apoptoz şeklinde sınıflandırılabilir (Şekil 4) (Sancar ve diğerleri, 2004).



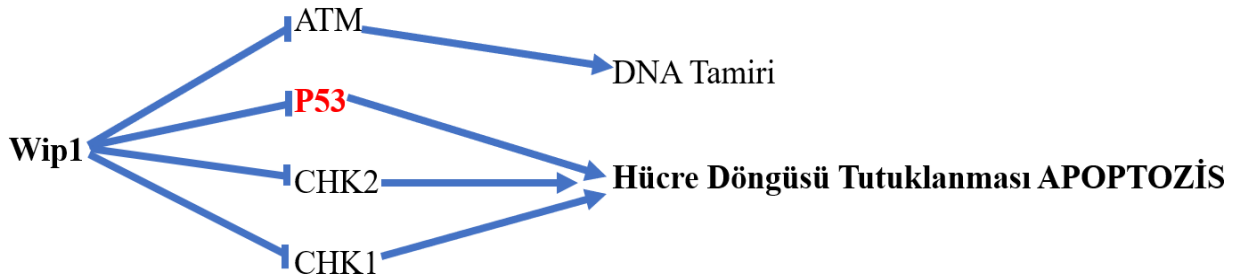
Şekil 4. DNA Hasar Yanıt Reaksiyonları (Sancar ve diğerleri, 2004'den modifiye edilerek alınmıştır.)

DNA'da oluşan küçük hasarlar genellikle onarım sistemleri tarafından onarılır. Eğer DNA tamiri mümkün olamazsa veya uygun bir şekilde tamir gerçekleştirilemezse hücrenin genomik bütünlüğü sağlanamayacağından DDR, Şekil 4.'de gösterildiği üzere hasarlı DNA'nın çoğalmasında engel olmak için apoptozis ve senesens gibi alt mekanizmalarını aktive ederek tümör supresör bir bariyer gibi davranır (O'Connor, 2015).

2.3. PPM1D/Wip1 Fosfatazın Regülasyonu ve DDR'de Rolü

Wip1 ilk olarak Fiscella tarafından 1997 yılında, p53'e bağlı bir şekilde indüklenen bir nükleer fosfataz olarak (wild-type p53-induced phosphatase) tanımlanmıştır (Fiscella ve diğerleri, 1997). PPM1D/Wip1, 17q23 bölgesi içinde lokalizedir ve İnsan Wip1 proteinini kodlar (Pommiervo diğerleri, 2010). Wip1'in ekspresyonu; iyonize radyasyon, ultraviyoleradyasyonu, anizomisin, hidrojen peroksit (H₂O₂), metil metan sülfonat ve inflamatuarsitokinlere maruz kalma gibi çeşitli stresler tarafından tetiklendiği rapor edilmiştir (Lowe ve diğerleri, 2010; Chew ve diğerleri, 2009; Takekawa ve diğerleri, 2000).

Bir serin/threoninfosfataz olan PPM1D/Wip1; UV veya iyonize edici radyasyona maruziyetten sonra p53 tarafından transkripsiyonel olarak tetiklenir (Lu ve diğerleri, 2004). Wip1 proteini *in vitro* Mg²⁺ bağımlı fosfataz aktivitesine sahiptir ve tip-2C fosfatazların karakteristik özelliklerinden olan okadaik asit inhibisyonuna karşı duyarsızdır (Fiscella ve diğerleri, 1997). Son çalışmalar, Wip1'in ayrıca inflamatuvar sinyali baskıladığını, yaşlanma kaçışını kolaylaştırdığını ve kök hücrelerde gövdeyi koruduğunu göstermiştir. Wip1 sinyalinin bu yönleri Şekil 5'de gösterilmektedir (Lowe ve diğerleri, 2012).



Şekil 5. Wip1'in hedefleri fonksiyonel aktivasyonunun sonuçları (Lowe ve diğerleri, 2012'den modifiye edilerek alınmıştır).

Wip1 sinyalizasyonunun hedefleri ve fonksiyonel sonuçlarını defosforilasyon yolu ile gerçekleştirir. Wip1 hedef proteinlerin doğrudan fosforilasyonu yoluyla sinyal verir. Kırmızı ile vurgulanan proteinler tümör oluşumunu baskılar ve bu proteinlerin Wip1 inhibisyonu tümör oluşumunu teşvik eder (Lowe ve diğerleri, 2012).

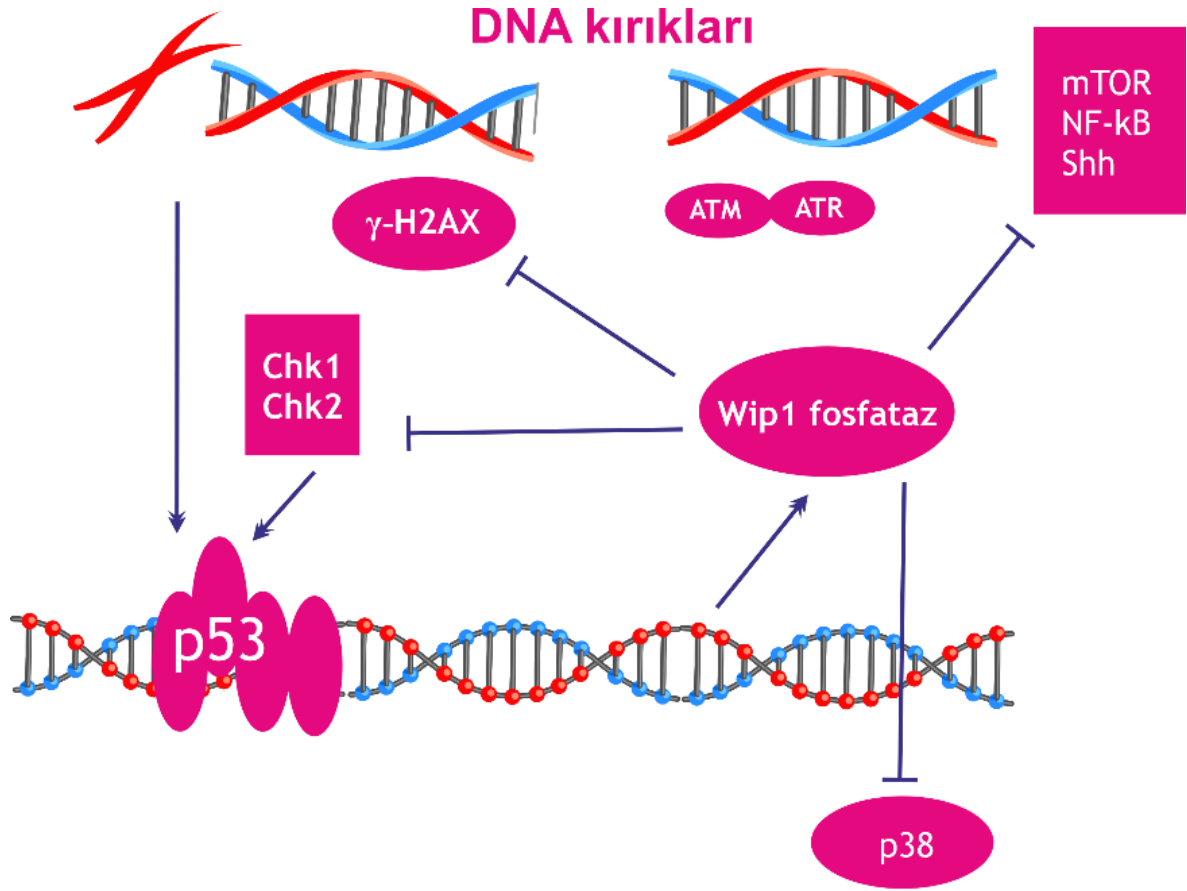
2.3.1. Tümör Hücrelerinde PPM1D Geni Transkripsiyonu ve Etkileri

Bir serin/treoninfosfataz olan PPM1D, kritik stres yanıtı olan p53 tümör baskılayıcı genin birçok transkripsiyonel hedefleri arasında yer almaktadır. PPM1D'in ATM/ATR hedefleri olan Chk1 ve p53'ü defosforile ettiği ve hücre döngüsü kontrol noktalarını işlevsiz kıldığı tespit edilmiştir. PPM1D defosforilasyonlarının, UV ve iyonize radyasyon sonucu aktifleşmiş DNA tamir yanıtında gerçekleşen indirgenmiş hücresel intra-S ve G2/M kontrol noktası aktivitesi ile uyumlu olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada PPM1D'nin asıl görevinin p53 ve Chk1-bazlı DNA hasarının geri dönüşümünü sağlamak olabileceği hususu tartışılmıştır (Lu ve diğerleri, 2005).

DNA hasarı ile indüklenen hücresel yanıtta p53 aktivasyonunun ardından Wip1 promotörüne bağlanır ve yüksek Wip1 protein seviyeleri ile sonuçlanan Wip1 transkripsiyonunun başlatılmasına yol açar (Lu ve diğerleri, 2005). Wip1 proteinin transkripsiyonunun ardından, Wip1 Ser 15 üzerindeki p53'ü doğrudan defosforile eder, dolayısıyla p53 aktivitesini ve seviyelerini azaltır. (Lu ve diğerleri, 2008). P53'ün inaktivasyonu DDR ile ilişkili apoptozu etkilediği için hayati öneme sahiptir. Eğer Wip1'in regülasyonu bozulmuş ve aşırı ifade edilmeye başlanmışsa onkogen özelliği kazanmakta ve p53'e bağlı tümör süpresör cevapları (apoptozis, senesens) inhibe ederek tümörigenezi teşvik edebilmektedir (Cosse ve diğerleri, 2007; Manvati ve diğerleri, 2014; Yin ve diğerleri, 2016; Wamsley ve diğerleri, 2017).

DDR, hücrelerin, hasar anında hücre döngüsü fazına bağlı olarak, hücre kontrol noktaları sayesinde hücre döngüsü ilerlemesini durdurabilir (Lavin ve Kozlov, 2007). Ancak hasar onarılamaz ise hücre apoptozu tetikleyebilir. Apoptoz ve hücre döngüsü durması çok önemlidir. Çünkü işlevsiz kontrol noktasına ve işlevsiz apoptotik tepkilere sahip hücreler kalıcı hasara rağmen çoğalabilir, potansiyel olarak mutasyonlara ve tümör oluşumuna yol açabilir (Su ve diğerleri, 2015).

Wip1 hücrelerde, genetik hasar stres sinyalinin azaltır. Ayrıca Wip1 hasar onarıldıktan sonra hücrenin homeostatik duruma geri dönmesini kolaylaştırır (Fiscella ve diğerleri, 1997; Lavin ve Kozlov, 2007). Şekil 6.'de gösterildiği gibi DDR'nin önemli düzenleyicilerinden olan WIP1, p53 ile substratını defosforilasyon yoluyla inaktive etmekte ve bu süreci gerçekleştirmektedir (Goloudina ve diğerleri, 2016).



Şekil 6. Wip1 fosfataz düzenlenmesi ve hedefleri (Goloudina ve diğerleri, 2006 modifiye edilerek alınmıştır)

ATM, Chk1, Chk2, γ -H2AX proteinleri DNA hasarının algılanmasından ve DDR'nin aktifleştirilmesinden sorumlu olup Wip1 tarafından negatif düzenlenen ajanlardır (Goloudina ve diğerleri, 2016). Wip1 p53 sinyalini sadece p53 protein stabilitesini etkileyerek değil, aynı zamanda p53'ün hedef genlerinin transkripsiyonunu da baskılamak suretiyle etkilemektedir (Pecháčková ve diğerleri, 2017). Fareler üzerinde yapılan bilimsel çalışmalarda p53 yolunun iyi çalıştığı ve Wip1 geni taşımayan APC (Min) bağırsak tümörleri ve c-myc indüklenmiş lenfoma hücrelerinde tümörigenezin önemli ölçüde zayıfladığı tespit edilmiştir (Demirov ve diğerleri, 2007; Lu ve diğerleri 2005).

Kanserli hücrelerde Wip1 geninin yaygın bir şekilde aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir. Örneğin; primer meme kanserleri (Li ve diğerleri, 2002; Rauta ve diğerleri, 2006), mide kanserleri (Fuku ve diğerleri, 2007), medulloblastoma (Castellino ve diğerleri, 2008), nöroblastoma (Saito-Ohara ve diğerleri, 2003) ve adenokarsinomalar (Tan ve diğerleri, 2009).

Sonuç olarak, Wip1 hücre döngüsü kontrol noktalarını iptal etmeyi, yaşlanmayı, apoptozu, DNA onarımını ve inflamatuarsitokinlerin üretimini inhibe etme işlevi görür. Wip1 ayrıca sadece p53'ün tek hedefi değil aynı zamanda östrojen reseptörü-alfa ve kappaB gibi diğer transkripsiyon faktörlerinin de hedefi olduğu bilinmektedir (Lowe ve diğerleri, 2012). Bulunan bu sonuç Wip1'in up-regülasyonunun kanserde önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

2.3.2. Wip1'in Apoptozis Üzerine Etkisi

Programlanmış hücre ölümü ya da kısaca apoptozis; hasarlı hücrelerin çoğalmasını engelleyerek hasarlı genomik DNA'nın yeni jenerasyonlara aktarılmasını önleyen bir mekanizmadır. Apoptozis mekanizmasının devre dışı kalması, mutasyona uğramış DNA moleküllerinin sonraki kuşaklara aktarılması nedeniyle tümörleşmeye neden olabilmektedir (Lu ve diğerleri, 2005).

Apoptozis mekanizması hücrelerde p53, Bax ve Caspaz 3 gibi pro-apoptotik ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik faktörleri arasındaki dengeyle düzenlenmektedir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik faktörler arasındaki interaksiyon tümörlerin gelişimi ve patogeneziyle yakından ilişkilidir (Feng ve diğerleri, 2017). P53 apoptozis mekanizmasının önemli bir düzenleyicisidir ve merkezi konumdadır.

MAPK sinyal yolağı; hücre içi sinyal sisteminin en önemli unsurlarından birisidir ve hücre büyümesi, gelişmesi ve apoptozisin düzenlenmesinde etkilidir. P38 MAPK sinyal yolağı doğrudan apoptozisin anahtar düzenleyicisi p53'ü doğrudan fosforile eder ve hücre döngüsü tutulmasını aktifleştirir. Ayrıca, p38 MAPK yolağının aktifleşmesi ilaç-indüklü tümör hücre ölümünde gerekli bir prostestir (Lin ve diğerleri, 2008).

Yapılan bilimsel çalışmalarda prostat kanser hücrelerinde γ -radyasyonu uygulamasını takiben Wip1 seviyesinde önemli derecede artış olduğu tespit edilmiştir. Bu hücrelerde Wip1'in Bax ile etkileşime geçtiği ve onu defosforile ettiği, bunun sonucunda Bax'ın mitokondriye taşınmasına neden olduğu ve böylelikle apoptozisin engellendiği tespit edilmiştir (Song ve diğerleri, 2005). Aynı çalışmada Wip1'in apoptozisinhibisyonu, Wip1 inhibitörleri kullanılarak ve apoptozis işlevinin tekrar kazandırılması yoluyla daha net bir şekilde ortaya konulmuştur. Wang ve diğerleri (2014) yılında yaptıkları çalışmada; HeLa hücrelerinde Wip1'in engellenmesiyle hücre büyümesi ve koloni oluşumunun önemli oranda

azaldığını ve buna paralel olarak p-p38 MAPK, p53 ve p-p53 proteinlerinin seviyelerinde önemli artış olduğunu keşfetmişlerdir. Wip1'in Chk2 ve p38 MAPK'nın DNA hasarı-indüklüfosforilasyonunu baskıladığı ve bunun ATO tedavisi ile restore edilen bir etki olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, Wip1 tümör hücre apoptozisin baskılanmasında ATO'nun doğrudan hedefi olarak tanımlanmıştır (Feng ve diğerleri, 2017). Bununla birlikte; p53-negatif tümör hücrelerinde Wip1'in aşırı ifade edildiğini ve bu durumun Bax/Bcl-XL oranını artırarak apoptozis yolağını aktifleştirdiği ve sonuç olarak kanser hücresinde apoptozise neden olduğu rapor edilmiştir (Goloudina ve diğerleri, 2012).

Wip1 son zamanlarda gen ekspresyon analizi ve in vitro fosfataz deneyleri yoluyla kanser tedavisi için terapötik bir hedef olduğu bilimsel çalışmayla ortaya konulmuştur (Richter ve diğerleri, 2015). Yeni bir Wip1 inhibitörü olan GSK2830371; Wip1 fosfatazın allosterik bir inhibitörüdür. GSK2830371 ayrıca kemoterapötik etkinliği artırır ve etoposid gibi geleneksel kemoterapötik ilaçlara karşı hassaslaştırır (Chen ve diğerleri, 2016). Etoposidin birincil sitotoksik hedefi topoizomera II'dir. Tedavi edilen hücrelerde bölünme komplekslerinin birikmesi, mutagenesi tetikleyen kalıcı DNA zincir kırıklarının oluşmasına yol açar ve dolayısı ile apoptoz ile kanserli hücre ortadan kaldırılır (Baldwin ve Osheroff, 2005). Birlikte ele alındığında, RMS kanserinin hücre hattı olan A204'de GSK2830371'in tek başına veya etoposid kombinasyon halinde uygulanabilir tedavi stratejileri olabileceğini göstermektedir.

2.3.3. Wip1'in kontrol noktaları üzerine etkisi

DNA hasar kontrol noktası G2 aşamasında ATM ve ATR kinazlar ve p21, p53 gibi aşağı akış efektörleri tarafından koordine edilir (Andreassen ve diğerleri, 2004). P21 Siklin B ve CDK1 tarafından üretilen mitoz teşvik edici faktörü (MPF) doğrudan engeller ve böylece hücre bölünmesi engellenir (Charrier-Savournin ve diğerleri, 2004).

DNA hasarı düzeltildiğinde, kontrol noktası düzeltme birimi (CHKREC), G2 noktasını inaktive eder ve mitoz girişini tetikler (Tsvetkov ve Stern, 2005; Medema ve Macurek, 2011). CHKREC komponentleri; kontrol noktası aracılarını defosforile eden fosfatazlar ailesinden Wip1 ve CDC25'i içermektedir (Ray ve Kiyokawa, 2008; Lindqvist ve diğerleri, 2009; Shaltiel ve diğerleri, 2014). Bununla birlikte, CHKREC'in CDK1, Aurora A kinaz, PLK1

(Polo benzer kinaz 1) ve MAST-L'yi inhibe ettiği rapor edilmiştir (Mamely ve diğerleri, 2006; Seki ve diğerleri, 2008; Peng, 2013).

DNA hasarı varlığında hücre döngüsünün bölünmeden önceki son kontrol noktası olan G2/M noktasından kaçınması kritik düzeyde önemlidir (Giglia-Marri ve diğerleri, 2011). G2/M kontrol noktasının aşılması Siklin B/CDK1 kompleksi (mitoz teşvik edici faktör) tarafından desteklendiği için özellikle DNA hasarı geliştiğinde bu kompleksin sıkı bir şekilde denetlenmesi gerekmektedir (Charrier-Savournin ve diğerleri, 2004). P53 bir kez tetiklendiğinde; Cyclin B/CDK1 kompleksinin kinaz aktivitesini inhibe eden ve DNA onarım işlemleri gerçekleştirilirken hücre döngüsü ilerlemesini önleyen ana hücre döngüsü inhibitörü olan p21'in ekspresyonunu aktive eder (Charrier-Savournin ve diğerleri, 2004).

Wip1; γ H2AX, ATM, CHK2 ve CHK1'i defosforiledererek kontrol noktasını inaktive eder (Cha ve diğerleri, 2010). Diğer fosfatazların PP2A-B55, PP4 v4 PP6 (PP2A-B55 nodu) gibi kontrol noktalarını elimine etmek için Wip1 ile koordine çalıştığı tespit edilmiştir (Schmitz, 2010). Bu durumu destekleyen bir diğer çalışmada Wip1 eksikliğinin kontrol noktasının tekrar işlevselleştirilmesinde (kurtarma/iyileştirme) yetersizliğe neden olduğu ve hücrenin G2 fazında tutuklu kaldığı rapor edilmiştir (Belova ve diğerleri, 2005).

Sonuç olarak; hücre döngüsü tutuklanması ve DNA onarımı DNA hasarı varlığında uyumlu bir şekilde hareket eden iki mekanizmadır, her iki işleme aracılık eden proteinler, DNA hasarı ortadan kaldırıldığında CHKREC tarafından etkisiz hale getirilmektedir (Rodríguez ve diğerleri, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Hücre Dizisi, Cihazlar ve Aletler

Çalışma boyunca kullanılan ve ticari olarak üretilmiş olan A204 hücre hatları ATCC'den temin edilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan hücrenin özellikleri ve tipi

Kullanılan Hücre Tipi ve Özellikleri	
ATCC® Kodu:	HTB-82™
Adı:	A204
Hastalık:	Rhabdomyosarcoma
Büyüme Özelliği:	Adherent
Organizma:	Homo sapiens (insan)
Morfolojisi:	Epitelyal

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve aletlerin listesi

Ürün	Firma
Steril Kabin	AirStream
İnkübatör	NUAIRE
Su Banyosu	Nüve

Muse Hücree Analiz Cihazı	Muse
Otoklav	HIRAYAMA
Sıvı Azot Tankı	MRC
Dikey Jel Elektroforezi	BIO-RAD
Görüntüleme Cihazı	Chemidoc-It2 510 Imager
Transfer Cihazı	BIO-RAD
Güç Kaynağı	Thermo
Inverted Mikroskop	Euromex
Vorteks	Iso-Lab
Manyetik Karıştırıcı	IKA
pH Metre	Hanna Instruments
Mikro Santrifüj	Hettich
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Eppendorf
Soğutmalı Santrifüj	Hettich
Kriyo-Dondurucu Kap	Nalgene
Modüler İnkübatör	ChamberBillupsRottenberg
Spektrofotometre	Thermo
Qubitfluorometer	Invitrogen
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	ThermoScientific
Floresan Mikroskop	Olympos
Doku Takip Cihazı	Leica

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

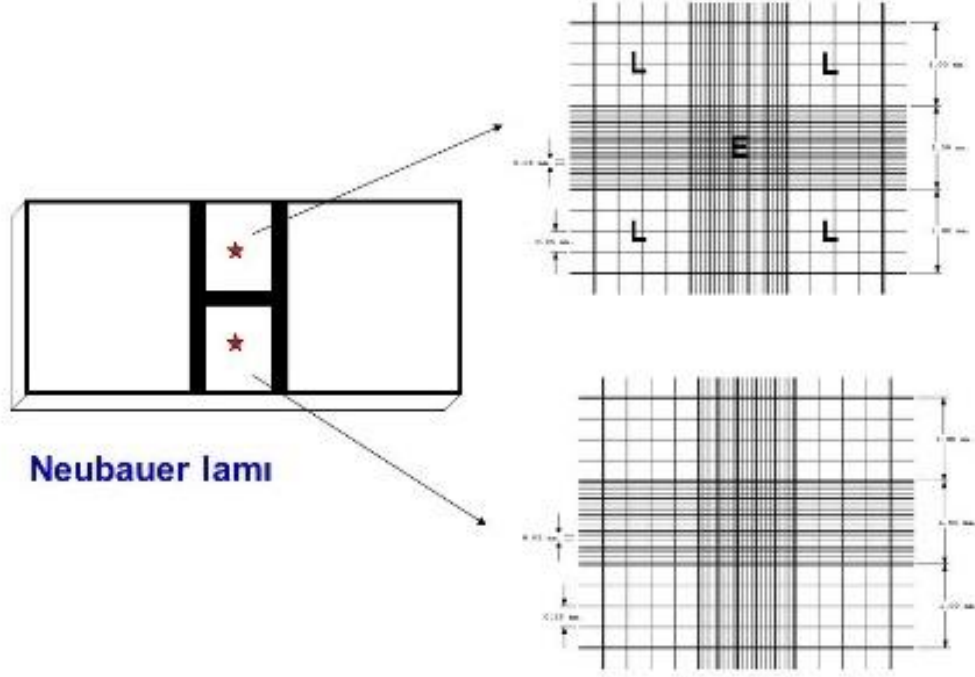
Bu proje kapsamında rabdomyosarkom kanseri hücre hattı olan A204 hücresi kullanılmıştır. Bu hücre için (4,5 mg/mL) DMEM (Dulbecco'smodifiedEagle'smedium) besiyeri kullanılmıştır. 500 ml DMEM besiyeri üzerine %10 FBS, 100 µg/ml penisilin streptomisin eklenmiştir. Tüm hücreler normoksik koşulları (37 °C'de, %5 CO₂ ve %20 O₂) içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.

3.2.2. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması

-196°C'de sıvı azotta stoklanmış olan hücreler 37 °C'lik su banyosunda hızlıca çözdürüldü. Çözülmüş olan hücreler bekletilmeden 15 ml' lik steril falkona alınıp, üzerine 2ml DMEM Complete besiyeri ilave edilerek 5 dakika 1400 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant kısmı atıldı. Daha sonra pelet üzerine tamamlanmış DMEM büyüme besi yerinden eklendi ve peletbesiyeri içerisinde pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Hücreler, kültür devamlılığı sağlamak amacıyla 25 ml'lik steril flask içerisine alındı.

3.2.3. Hücrelerin Sayım Yöntemi

Hücre kültürü çalışmalarında yapılacak olan denemelerden önce belirli ve eşit sayıda hücre alınabilmesi için hücre sayımı yapıldı. Kültürün içindeki canlı ve ölü hücre miktarını belirlemek için 1:1 (v:v) oranında hücre süspansiyonundan ve tripan mavisi birbirine karıştırıldı. Karışımdan 10µl alınarak Neubauer lamına mikro pipet yardımıyla aktarıldı.



Şekil 7. Neuber laminın mikroskop altındaki temsili görünüşü

(<https://slideplayer.biz.tr/slide/2709491/> 'den 05.08.2021 tarihinde alınmıştır.)

Şekil 7’de gösterildiği üzere Neubauer lamına aktarılan hücre-tripan mavi karışım ışık mikroskobu altında 4 büyük kare içerisinde konumlanmış olanlar sayılmaktadır. Canlı hücreler şeffaf görünürken, ölü hücreler ise tripan mavisinden dolayı koyu mavi görülmektedir. Her büyük kareye düşen canlı ve ölü hücreler ayrı ayrı sayılarak ortalamaları alınmaktadır. Sayılan hücrelerin ortalaması, dilüsyon faktörü ve 10^4 sabiti çarpılarak 1 ml’de ne kadar canlı hücre olduğu bulunmaktadır. Saymış olunan canlı ve ölü hücreleri birbirleri ile oranlayarak canlılık yüzdesi hesaplanmaktadır. Eğer ki sayılan hücrenin canlılık oranı %80 ve üzeri ise deney kurulmaktadır.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

A204 hücreleri kullanılan flask yüzeyinin %70’ine ulaştığında 2 veya 4’e bölünerek pasajlanmıştır. Pasajlama işlemine öncelikle hücrenin besiyeri uzaklaştırılarak başlanmıştır. Ardından 5ml 1X PBS ile yıkanıp ardından PBS uzaklaştırılmıştır. Üzerine 1ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek her tarafa eşit dağıldığından emin olunduktan sonra inkübatörde 2-3 dakika kadar inkübe edilmiştir. Daha sonra 6 ml’ye tamamlanmış, Complect

DMEM eklenerek hücreler pipetaj yardımıyla kaldırılmış ve istenilen sayıda bölünerek veya dondurularak saklanmıştır.

3.2.5. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği

Dondurma besiyeri içeriği;

- % 65 DMEM (completemedium)
- % 30FetalBovin Serum (FBS)
- % 5 DMSO

Kültür devamlılığı bir süre devam etmiş ve canlılık oranı %90 ve üzerinde olan kültürdeki hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere dondurularak sıvı azotta saklanmıştır. Dondurma işlemi için 1X tripsinle muamele olan hücreler steril falkon içerisine alınarak 14.000 rpm'de, 4°C'de, 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Her bir dondurma tüpünün içerisinde 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Pelet, dondurma besiyeri ile homojenize edilmiştir. Tüpler- 80°C'de bir gece muhafaza edilmiş ve daha sonra dondurma tüpü sıvı azot tankına alınarak -196°C'de saklanmıştır.

3.2.6. Kemoterapötik İlaç Stoklarının Hazırlanması

Etoposid, DNA ve topoizomeraz II enzimi ile üçlü bir kompleks oluşturur. DNA ipliklerinin yeniden bağlanmasını önler ve bu şekilde DNA geçici çift zincir kırıklarının meydana gelmesine yardımcı olur. (Pommierve diğerleri, 2010). Kanseri hücreleri, daha hızlı bölündükleri için bu enzime sağlıklı hücrelerden daha çok güvenirlir. Bu nedenleetoposid, kanser hücrelerinde DNA sentezinde hatalara neden olur ve kanser hücresinin apoptozunu teşvik eder (Hande, 1998). Etoposid en yaygın kullanılan kemoterapi ajanlarından biridir (Vesela ve diğerleri, 2017). Bu tez çalışmasında kullanılmış olan etoposid ticari olarak temin edilmiş ve konsantrasyonları 100 mM stok olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürülerek steril ortamda dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler -20 °C' de saklanmıştır.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan Eto konsantrasyonları

İlaç	Konsantrasyon
Eto	100 µM
Eto	150 µM
Eto	200 µM
Eto	250 µM

GSK2830371, PPM1D/Wip1'in inhibitörüdür (Esfandiari ve diğerleri, 2016). GSK2830371, p53'ün aracılık ettiği apoptozu uyararak kanser gelişimini engeller. Yapılan deneylerde GSK2830371, doksorubisin ve etoposid tarafından uyarılan sitotoksiteyi arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca kanser hücrelerinin çoğalma ve koloni oluşumundaki kapasitesini de bloke ettiği de ortaya konmuştur (Chen ve diğerleri, 2016). Bu tez çalışmasında kullanılmış olan GSK2830371 ticari olarak temin edilmiş ve konsantrasyonları 100 mM stok olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürülerek steril ortamda dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler -20 °C' de saklanmıştır.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan tek başına GSK konsantrasyonu ve Eto + GSK kombinasyonlarının konsantrasyonları

İlaç ve Kombinasyon
GSK 2.5µM
Eto 100µM + GSK 2.5µM
Eto 150µM + GSK 2.5µM
Eto 200µM + GSK 2.5µM
Eto 250µM + GSK 2.5µM

3.2.7. Hücre Kültürü Çalışmalarının ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan A204 hücre dizisiyle kemoterapi ajanı olan etoposid, Wip1 inhibitörü olan GSK2830371 ve her ikisi kombin halinde kullanılarak ayrı ayrı muamele edilmiştir. Hücre canlılığı ve DNA hasarı cevabı gibi tümör baskılayıcı yolların etkili çalışıp çalışmadığı kontrol grubu ile kıyaslanarak test edilmiştir. Literatür araştırması ve ön denemelerle birlikte ilaçların apoptotik indüklediği uygun konsantrasyonlar belirlenmiştir. A204 hücrelerinde; Apoptozun indüklemesi için 24-48-72 saatlik, sürenin sonunda deneme sonlandırılmıştır. Devamında hücre döngüsü, AnnexinV, ve Western Blot analizleri yapılmıştır.

3.2.8. A204 Hücre Hattında MTT Hücre Canlılığı Testi

MTT-proliferasyon yöntemi hücre canlılığının değerlendirilmesinde, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, suda çözülebilir bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin tetrazolyum halkasının canlı hücre mitokondrisinde bulunan süksinatdehidrogenaz enzimine özgüdür. Bu yöntem, canlı hücrelerin mitokondrisinde yer alan süksinat-dehidrogenaz enziminin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak suda çözünmeyen formazanlara dönüşümüne dayanmaktadır. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir ve bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir. Bu formazan kristalleri DMSO ile çözdürülerek spektrofotometrede ölçüm yapılır. Bu işlem aşamasında MTT analizi için bölüm 4.2.'de ve 4.4 de belirtildiği deney düzeneği gibi hazırlanmış 24-48-72 saat inkübasyon süresi dolmuş hücrelerin üzerine 10 µl MTT solüsyonu eklenmiş ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra plakadaki MTT medyum solüsyonu uzaklaştırılıp, canlı hücrelerin oluşturduğu formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 100 µl DMSO ile çözdürülerek plakalar 15 dakika için plaka çalkalayıcıya bırakılmıştır. Ardından absorbans okuma aşamasına geçilmiştir. Ölçülen değer o solüsyondaki canlı hücre sayısını göstermektedir (Plumb, 2004). Hücrede proliferasyon azaldıkça formazan kristalleri azalır. Formazan kristalleri azalırsa absorbans değeri de azalır. Bunun tam aksine,

proliferasyon artıyorsa solüsyondaki formazan kristallerine paralel olarak absorbans değeri de artar. Absorbans okumaları 570 nm dalga boyu spektrofotometrede gerçekleştirilmektedir (Ogbomo ve diğerleri, 2008). MTT ayırıcı ışığa duyarlı olduğu için, MTT deneyleri genellikle doğrudan ışık almayacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. A204 Hücre Hattında Annexin V Apoptozis Testi

Annexin V testi; süspansiyon hücrelerdeki apoptotik hücrelerin membranlarının dış yüzeylerinde bulunan fosfatidilserine Annexin V' in bağlanarak apoptotik hücrelerin ayırt edilmesi temeline dayanır. Sağlıklı hücre membranının sitozolik kısmında bulunan fosfatidilserin, hücre apoptotik hale geldiğinde membranın ekstraselüler kısmına flip-flop hareketi yaparak yer değiştirir. Annexin V testinin prensibi de apoptotik hücrelerde ekstraselüler kısımda bulunan fosfatidilserine bağlanmasına dayanmaktadır. Böylelikle sağlıklı ve apoptotik hücreler birbirinden ayırt edilebilir hale gelmektedir. Bu test ile apoptotik hücrelerin kantitatif analizini Muse hücre analizörü kullanılarak gerçekleştirilir.

Bu çalışmada; GSK 2.5µM, Eto 100µM, Eto 150µM, Eto 200µM, Eto 250µM, Eto 100µM + GSK 2.5µM, Eto 150µM + GSK 2.5µM, Eto 200µM + GSK 2.5µM, Eto 250µM + GSK 2.5µM apoptotik dozları ile muamele edilmiş olan A204 hücrelerinde, 24-48 ve 72 saat inkübasyon sonrası gerçekleşebilecek olan erken apoptozisin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle flakslarda 10⁵-10⁷ ml hücre olacak şekilde ayarlanmıştır. Bölüm 4.2.'de belirtilen hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş olup yine belirtilen sürede inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri alınmış ve hücreler 300µl, 1X PBS ile yıkanıp, PBS uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa 50µl 1X tripsin eklenerek 37°C'de 2 dakika inkübe edilmiştir. Üzerilerine 500µl besiyeri eklenerek pipetaj yardımıyla hücreler yüzeyden kaldırılmış sonrasında ependorflara alınmıştır. Ardından 1200'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatanttan 50 µl kalacak şekilde pellete dokunmadan alınmış olup ve her bir örneğe 50 µl 'Annexin V (Muse özel kit)' solüsyonundan eklenmiştir. 3-5 sn pipetaj yardımıyla süspansiyon edildikten sonra oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun devamında 200 µl distile su konduktan sonra Muse hücre analiz cihazında ölçümü yapılmıştır. Elde edilen veriler grafiksel ve istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir.

3.2.10. Western Blot Analizi İçin Yapılan Çalışmalar

3.2.10.1. Protein İzolasyonu ve Protein Miktar Tayini

Western blotanalizi için bölüm 4.2.'de ve 4.4 de belirtildiği gibi hazırlanmış 48 saatte apoptozis indüklendiği hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler 1X PBS ile 2 kez yıkanmış, ardından PBS uzaklaştırılmıştır. Her bir petride proteinlerin yıkılmasına neden olabilecek proteazların aktivitesini inhibe etmesi için 100µl olacak şekilde RİPA lizis tamponundan eklenmiştir. Protein izolasyonu için kullanılan RİPA lizisbufer içeriği aşağıda verilmiştir.

RİPA LizisBuffer İçeriği (100 ml Stok İçin)

- 10 ml Tris-HCl (0,5M)
- 3 ml NaCl (5M)
- 10 ml Tris-HCl (0,5M)
- 0,5 ml EDTA (0,5M)
- 1 ml Na₃VO₄ (100mM)
- 0,1 g SDS
- 0,5 g Sodyum deoksikolat

Pelet RIPA içerisinde ependorflara sürttürülerek çözdürülmüştür. Soğuk odada (4C^o) 30-40 dakika termal shaker üzerinde 450 rpm'de çalkalanmıştır. Süre sonunda örnekler 30-40 dakika soğutmalı santrifüjde 4°C, 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjü takiben çöken DNA pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmış ve süpernatant yeni ependorflara alınarak protein miktar tayini aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada BCA protein assay kitinin protokolü kullanılmıştır. Spektrofotometrede 562 nm'de ölçülerek miktar tayini yapılmıştır.

3.2.10.2. Western Blot Analizi

Western blot, karmaşık bir numunede bir protein hedefini tespit etme aracı olarak başlayan bir tekniktir. Yani Western blot; elektroforez kullanılarak SDS-PAGE (SDS-Poliakrilamid Gel) yürütülen proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlar. Bu işlemin sonrasında ise jelde ayrılmış olan proteinlerin nitroselüloz veya polivinilidindifluorid (PVDF) membrana transferi gerçekleşir. Membranda bulunan proteinlerden amaca uygun olanını görüntüleyebilmek adına membrandanonspesifik bağlanmayı önlemek gerekmektedir. Bunun için bloklama işlemi gerçekleştirilir. Blotlama işleminde, spesifik primer antikorla muamele edilir. Primer antikora bağlanan sekonder antikorla muamele edilir. Devamında sekonder antikorda bulunan işaretleyiciye spesifik substratla reaksiyon ve görüntüleme basamaklarına sahip bir tekniktir.

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

10X TBS (1L):

- 30,2 g Tris-base
- 43,8 g NaCl
- 932 mg KCl

TOWBIN Transfer Buffer (800 ml):

- 3.03 g Tris-base
- 14,4 g Glycin
- 5 ml SDS (%10 luk SDS solüsyonundan)
- Distile su (pH: 8,1-8,5)

Not: Kullanım önce %20 oranında metanol ilave edilir.

10X RunningBuffer (1L):

- 30 g Tris-base
- 144 g Glycin
- 15 g SDS
- Distile su
- (pH: 8,6)

LowerBuffer (500 ml):

- 91 g Tris-base
- 20 ml SDS (%10 luk SDS solüsyonundan)
- 14 ml HCl (6N)
- Distile su
- (pH: 8,8)

UpperBuffer (500 ml):

- 30,5 g Tris-base
- 20 ml SDS (%10 luk SDS solüsyonundan)
- 30 ml HCl (6N)
- Distile su
- (pH: 6,7)

1X TBS-t (1L):

- 100 ml 10X TBS
- 900 ml Distile su
- 1 ml Tween 20

%40 Amonyum persülfat:

- 0,5 g APS
- 1 ml Distile su

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

- 100 ml 1X TBS-t
- 5 g Skim Milk
- 10 ml Tris-HCl (0,5M)

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

- 100 ml 1X TBS-t
- 5 g BSA

3.2.10.3.Poliakrilamid Jelin (SDS-PAGE) Hazırlanması

Western Blot için kullanılacak olan cam platelerin öncelikle %70 etil alkol ile silinmiş, ardından distile su ile yıkanıp kurulanmış ve düz bir zemin üzerinde bulunan jel döküm standına sızıntı yapmayacak şekilde sıkıca yerleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise hedeflenen proteinin moleküler ağırlığına uygun olan konsantrasyonda %7,5, %8 veya %10'luk ayırıcı jel (separating) çözeltisi Tablo 4'de gösterildiği üzere hazırlanmıştır. Ardından iki cam arasına mikropipet yardımıyla 2cm boşluk kalacak şekilde dökülmüştür. Hazırlanan ayırıcı Jelin üstyüzeyinin bozulmasını engellemek için izopropanol ile kaplanarak düzleştirilmiş ve polimerizasyon için 20-30 oda sıcaklığında polimerleşmesi için beklenmiştir. Polimerleşen jelin üzerindeki izopropanol uzaklaştırılmıştır ve tüm proteinler için sabit olarak kullanılan %3'lük paketleyici (stacking) jel çözeltisi Tablo 3.'de içeriği belirtildiği gibi hazırlanarak polimerleşmiş olan ayırıcı jelin üzerine mikropipet yardımıyla dökülmüştür. Hızlı bir şekilde camların arasına taraklar yerleştirilerek üst jelin gerçekleşmesi için tekrar oda sıcaklığında 15-20 dakika beklenmiştir.

Tablo 5. Paketleyici ve ayırıcı jelin içeriği ve miktarları

Bileşenler	2X Paketleyici Jel	2X Ayırıcı jel konsantrasyonları		
		%7,5	%8	%10
	%3	%7,5	%8	%10
Distile su	3,27 ml	5,73	5,55 ml	4,8 ml
Upper Buffer	1,25 ml	-	-	-
Lower Buffer	-	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
%40 Akrilamid/bisa krilamid	0,380 ml	2,82	3 ml	3,75 ml
%10 SDS	50 µl	150 µl	150 µl	150 µl
Gliserol	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
TEMED	6 µl	12 µl	12 µl	12 µl
%40 APS	12 µl	18 µl	18 µl	18 µl

3.2.10.4. Jele Yüklenecek Protein Örneklerinin Hazırlanması

Total protein izolasyonu ve miktar tayini yapıldıktan sonra belirlenmek istenen fosfop53, p53, Wip1 ve GAPDH proteinlerinin analizi için en az 100 µg olacak şekilde miktarları birbirlerine eşitlenmiştir. Jele yüklemeye önce indirgeyici bir tampon olan '6X loadingdye' ile karıştırılarak 95 °C'de 5 dakika inkübe ederek proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır. Böylece örnekler bu aşamadan sonra jele yüklenmeye hazır hale getirilmiştir.

6X LoadingDye (10 ml):

- 3,75 ml 1M Tris-HCl (pH: 6,8)
- ml Gliserol+H₂O (4 ml Gliserol, 1ml Distile su karışımı)
- 1 g SDS
- 900 µl Merkaptoetanol
- %0,06 Bromfenolblue

- Distile su

3.2.10.5. Elektroforetik Yürütme İşlemi

Bölüm 4.7.3.'de anlatıldığı gibi hazırlanmış olan SDS-PAGE dikey jel elektroforezi kasetine yerleştirdikten sonra kasetlerin arasına ve tanka '1X Running Buffer' eklenmiştir ve jeldeki taraklar çıkartılmıştır. Taraklar çıkartıldıktan sonra oluşan kuyucuklara, protein ağırlık belirteci (protein marker) ve denatürasyonu gerçekleştirilmiş örneklerden 37 µl eklenmiştir. Tankın kapağı kapatılarak güç kaynağıyla bağlantısı yapılmıştır. Örnekler stacking jelden separating jele gelene kadar 30 dakika 95 voltta yürütülmüştür. Markır açıldıktan sonra 120 voltta 220 mA'da yürütme işlemine devam edilmiştir.

3.2.10.6. Yarı-Kuru Transfer (Semi-Dry Blotting)

Transfer aşamasında kullanılacak olan blotlama kağıtları 11cm eni 15cm boyu olacak şekilde 12 adet kesilmiştir ve bu kağıtların 6 tanesi, %20 methanol eklenmiş olan towbinbuffer içerisinde ıslatılmıştır. Sonrasında blotlamayı yapacak olan transfer cihazına yerleştirilmiştir. Transferde kullanılacak olan PVDF membran önce metanolde 5 dakika sonrasında ise birkaç saniye 'Towbin Transfer Buffer' içerisinde bekletilerek aktive edilmiştir ve transfer cihazına blotlama kağıdının üzerine yerleştirilmiştir. Yürüme işlemi tamamlanmış olan jeli çıkarmak için öncelikle kaset tanktan çıkartılmıştır. Ardından iki cam birbirinden ayrılarak, jelin paketleyici kısmı uzaklaştırılıp sadece ayırıcı kısmı membran üzerine alınmıştır. Son olarak tekrar 6 adet whatman filtrekağıdı 'Towbin Transfer Buffer' da ıslatılarak jelin üzerine yerleştirilmiştir ve transfer modülünün kapağı kapatılarak 1A° akım ve 25V'da 30 dakika transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sırasında whatman filtre kağıtları, membran ve jel arasında (özellikle membranın bulunduğu bölgede) hava kabarcığı ya da tütün bulunmamasına dikkat edilmiştir çünkü transfer işlemini olumsuz yönde etkilemektedir.

3.2.10.7. Membranı Bloklama İşlemi

Transfer işlemini takiben, proteinleri bağlamış olan PVDF membran %6'lık süt tozu (Skim Milk Solüsyonu) içerisinde 1 saat açılı orbital çalkalayıcı üzerinde çalkalanmıştır. Bu işlem proteinleri bağlamış olan PVDF membranda, protein olmayan kısımları örterek spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçmek için protein bağlanmamış kısımların ilgisiz proteinlerle kaplanmasını sağlamak amacı ile gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda bloklama için kullanılan skim milk solüsyonu bir falkona alınarak sekonder antikor hazırlanmak üzere +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. PVDF membran ise 1-2 dakika '1X TBS-t' solüsyonu ile yıkanarak fazla süt uzaklaştırılmıştır.

3.2.10.8. Membranın Primer Antikor İle Muamelesi

Wip1, p53, fosfo p53 ve internal kontrol olarak GAPDH, primer antikorları Tablo 5.'de belirtildiği dilüsyon oranlarına göre %5'lik BSA solüsyonunda dilüe edilerek hazırlanmıştır ve hazırlanan primer antikor bloklama basamağını tamamlamış olan membranın üzerine eklenerek 16 saat boyunca 4 °C'de açılı çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda primer antikorlar tekrar kullanılmak üzere 4°C'de bir süre saklanmıştır. Membranlar ise 3 kez 5'er dakika süre ile '1X TBS-t' solüsyonu ile yıkanmıştır. Bu basamağı takiben primer antikor hangi canlıda üretildiyse o canlının sekunder antikoru alınarak %6'lık yağsız süt tozu içerisinde Tablo 5.'deki oranlarla hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan sekunder antikor içerisinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası membran yine 3 kez 5'er dakika 'TBS-t' solüsyonu ile yıkanmıştır.

Tablo 6. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon katsayıları

Antikor	Dilüsyon Oranı
Wip1	1:500
GAPDH	1:10000
Total P53	1:500
FosfoP53 (SER15)	1:1000

Tablo 7. Kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyon katsayıları

Antikor	Dilüsyon
Anti-Mouse IgG-HRP	1:1500

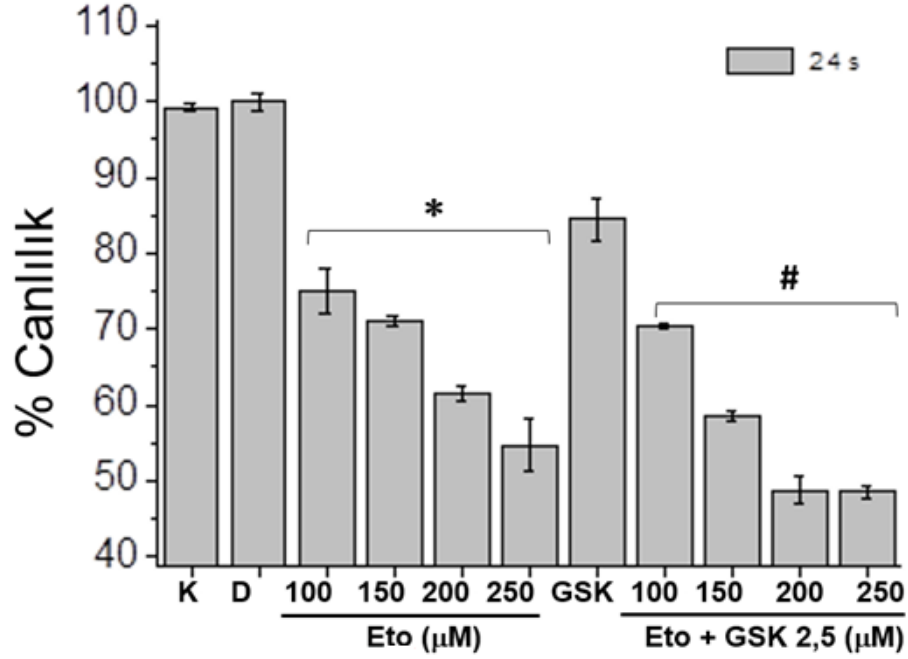
3.2.10.9. Kemilüminesans Yöntemi ile Membranı Görüntüleme

Sekonder antikoru uzaklaştırmak için yapılan yıkama işlemini takiben membran üzerindeki proteinlerin doğru yerde olduğundan emin olmak için protein marker WesternSurePen (Licor) kalem ile işaretlenmiş ve membran ECL solüsyonu ile muamele edilerek 5 dakika kadar karanlıkta inkübe edilmiştir ve devamında ChemiDoc-ItR2 Imager (UVP) cihazında görüntülenmiştir. Elde edilen bant görüntüleri kaydedilerek yazılım programı ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının ve Sitotoksik Etkinin 24, 48 ve 72 s Sonuçları

A204 hücrelerinde canlılığın ve sitotoksik etkinin belirlenmesi için, ilaç dozları ile 24-48 ve 72 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda Bölüm 4.5.'de belirtildiği gibi 'MTT testi' protokolü uygulanmıştır. Veriler spektrofotometrede 570 nm' de ölçülmüştür. 24 – 48 ve 72 saat MTT deney düzeneği ile elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu ile normalize edilerek meydana gelen metabolik aktivitedeki değişim miktarı sırasıyla Şekil 8, Şekil 9 ve Şekil 10.'da gösterildiği gibi student'*st* testi ile yapılan istatistiksel karşılaştırma % ortalama± sapma olarak ayrı ayrı grafiğe aktarılmıştır.



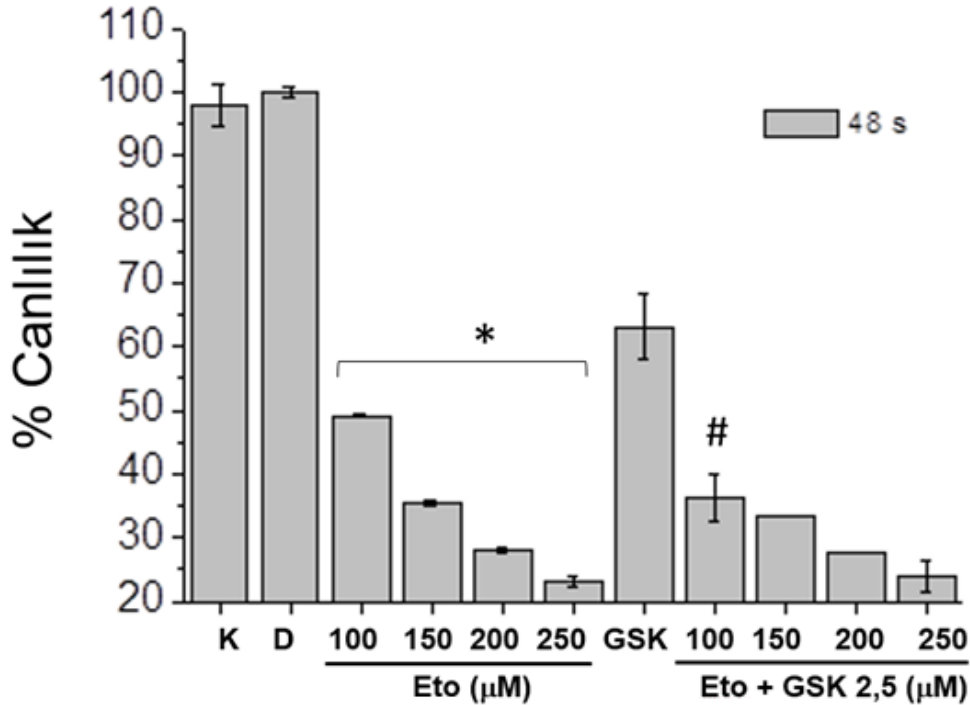
Şekil 8. A204 hücrelerinde 24sEto, GSK ve Eto+ GSK uygulaması, MTT analizi sonuçları

(* : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(# : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Şekil 8.'de ki grafikte gösterildiği üzere MTT analizi ile kontrol ve DMSO grubunda ölçülen metabolik aktivitenin % 99 (± 3) oranında olduğu, Eto, GSK ve Eto+GSK ile muamele edilen gruplarda ise bu oranın sırasıyla GSK 2.5 μ M de % 84 (+3), Eto 100 μ M % 75 (+2), Eto150 μ M % 71 (+3), Eto200 μ M % 61 (+2), Eto250 μ M % 54 (+2), Eto 100 μ M + GSK 2.5 μ M % 70 (+3), Eto 150 μ M + GSK 2.5 μ M % 58 (+3), Eto 200 μ M + GSK 2.5 μ M % 48 (+2), Eto250 μ M + GSK 2.5 μ M % 48 (+2) olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler sonucu A204 hücrelerinde, Eto, GSK ve Eto+ GSK apoptotik dozlarının 24 saatlik inkübasyon sonrasında metabolik aktivite üzerine etki ettikleri ortaya çıkmıştır. 24 saat inkübasyon ile MTT analiziyle elde edilen veriler sonucunda kontrol grubuna göre Eto, kontrole göre GSK, Eto'ya göre Eto + GSK, GSK'ya göre Eto+ GSK kıyaslanmıştır. Sırasıyla p değerleri; GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto 100 μ M ($p < 0,05$), Eto150 μ M ($p < 0,05$), Eto200 μ M ($p < 0,05$), Eto250 μ M ($p < 0,05$), Eto 100 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto 150 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto 200 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto250 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$)

İlaç muamele süreleri 48 saate ve 72 saate ayrı ayrı deneyler kurulması kararlaştırılmıştır. Bu nedenle sonraki analizlerde 48 ve 72 saat süre sonunda gerçekleştirilmiştir. Şekil 9.'de A204 hücrelerinde 48 saat Eto, GSK ve Eto + GSK uygulaması sonucunda MTT analizi sonuçları aktarılmıştır.



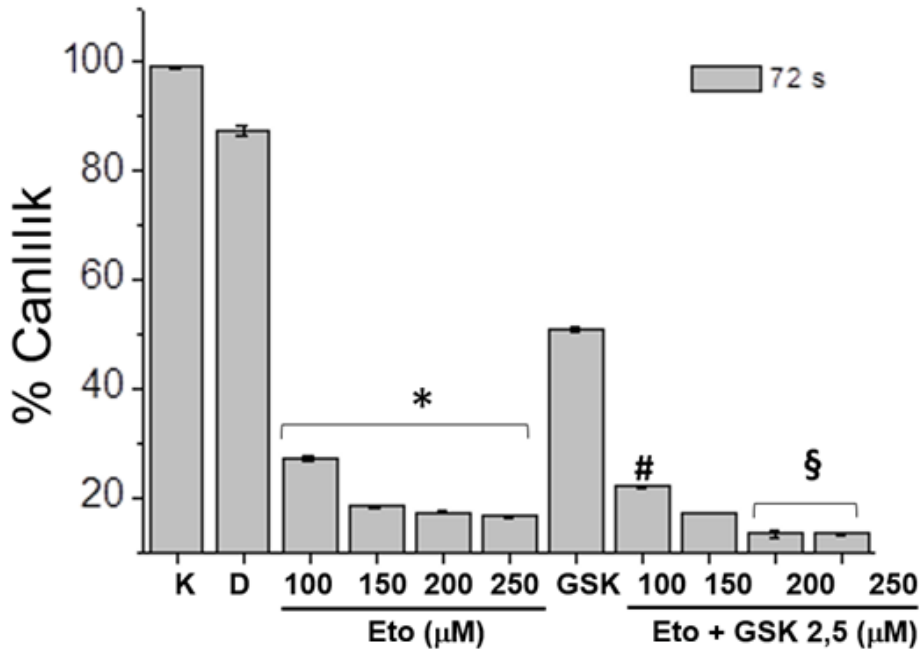
Şekil 9. A204 hücrelerinde 48s Eto, GSK ve Eto+ GSK uygulaması, MTT analizi sonuçları

(* : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(# : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Şekil 9.'de gösterildiği üzere; MTT analizi ile kontrol grubunda ölçülen metabolik aktivitenin %99 (± 3) oranında olduğu, Eto, GSK ve Eto+ GSK kombineleri ile muamele edilen gruplarda ise bu oranın sırasıyla GSK 2.5 μ M %63 (+2) , Eto100 μ M %49 (+3), Eto 150 μ M %35 (+3), Eto200 μ M %28 (+3), Eto 250 μ M %23 (+3), Eto100 μ M + GSK 2.5 μ M %36 (+2), Eto 150 μ M + GSK 2.5 μ M %33 (+3), Eto200 μ M + GSK 2.5 μ M %27 (+3), Eto250 μ M + GSK 2.5 μ M %23 (+2) olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen bu veriler sonucu A204 hücrelerinde Eto, GSK ve Eto + GSK kombine apoptotik dozlarının 48 saatlik inkübasyon sonrasında Kontrole göre Eto, kontrole göre GSK, Eto'ya göre Eto + GSK, GSK'ya göre Eto + GSK'nın kıyaslanarak istatistik oranlarında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Metabolik aktiviteyi önemli derecede azalttıkları ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Sırasıyla p değerleri; GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto 100 μ M ($p < 0,05$), Eto150 μ M ($p < 0,05$), Eto200 μ M ($p < 0,05$), Eto250 μ M ($p < 0,05$), Eto 100 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto 150 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto 200 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto250 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$). Şekil 10.'da A204 hücrelerinde 72 saat Eto, GSK ve Eto+ GSK uygulaması sonucunda MTT analizi sonuçları grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 10. A204 hücrelerinde 72s Eto, GSK ve Eto+ GSK uygulaması, MTT analizi sonuçları

(* : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(# : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

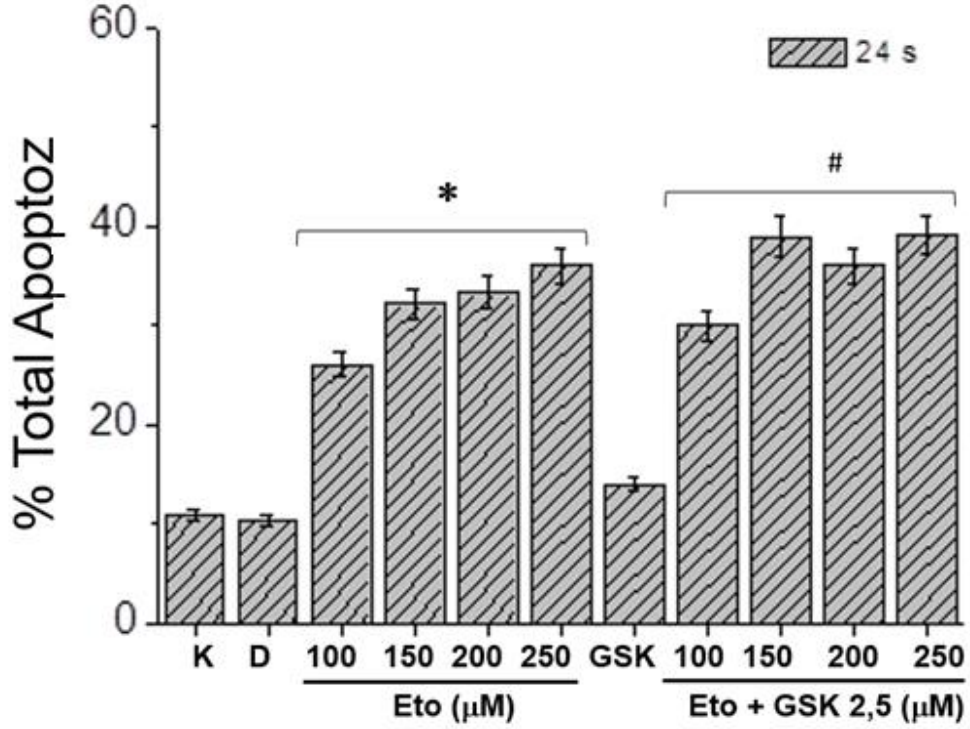
(\$: Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Şekil 10'da ki grafikte gösterildiği üzere MTT analizi ile kontrol grubunda ölçülen metabolik aktivitenin % 99 (± 3) oranında olduğu, Eto, GSK ve Eto+ GSK kombineleri ile muamele edilen gruplarda ise bu oranın istatistiksel verileri sırasıyla GSK 2.5 μ M %58 (+3), Eto100 μ M %31 (+3), Eto 150 μ M %20 (+3), Eto 200 μ M %19 (+3), Eto 250 μ M %18 (+3), Eto 100 μ M + GSK 2.5 μ M %25 (+3), Eto150 μ M + GSK 2.5 μ M %19 (+3), Eto 200 μ M + GSK 2.5 μ M %15 (+3), Eto 250 μ M + GSK 2.5 μ M %15 (+3) olduğu tespit edilmiştir. Sırasıyla p değerleri; Sırasıyla p değerleri; GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto 100 μ M ($p < 0,05$), Eto150 μ M ($p < 0,05$), Eto200 μ M ($p < 0,05$), Eto250 μ M ($p < 0,05$), Eto 100 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto 150 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto 200 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$), Eto250 μ M + GSK 2.5 μ M ($p < 0,05$)

Elde edilen bu veriler sonucu A204 hücrelerinde Eto, GSK ve Eto, GSK kombine apoptotik dozlarının 72 saatlik inkübasyon sonrasında kontrole göre Eto, kontrole göre GSK, Eto'ya göre Eto+GSK, GSK'ya göre Eto+ GSK'nın kıyaslanarak istatistik oranlarında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Metabolik aktiviteyi önemli derecede azalttıkları ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır.

4.2. Annexin-V Testi ile Hücre Ölümü Analizi 24, 48 ve 72 s Sonuçları

A204 hücreleri ilaç dozları ile 24-48-72 saat muamele edilmiş ve meydana gelen apoptozisin belirlenmesi için Bölüm 4.6.'da belirtildiği gibi 'Annexin-V testi' gerçekleştirilmiştir. Meydana gelen apoptozis erken apoptotik, geç apoptotik ve total apoptotik hücre miktarları ile canlı hücre miktarı %94 olarak ölçülmüştür. Birbirinden bağımsız 3 tekrardan oluşan ölçüm sonuçlarının ortalamaları alınarak 24-48 ve 72 saat deney düzeneği sonuçları sırasıyla Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13.'de gösterildiği gibi % ortalama \pm sapma olarak grafiğe aktarılmıştır.

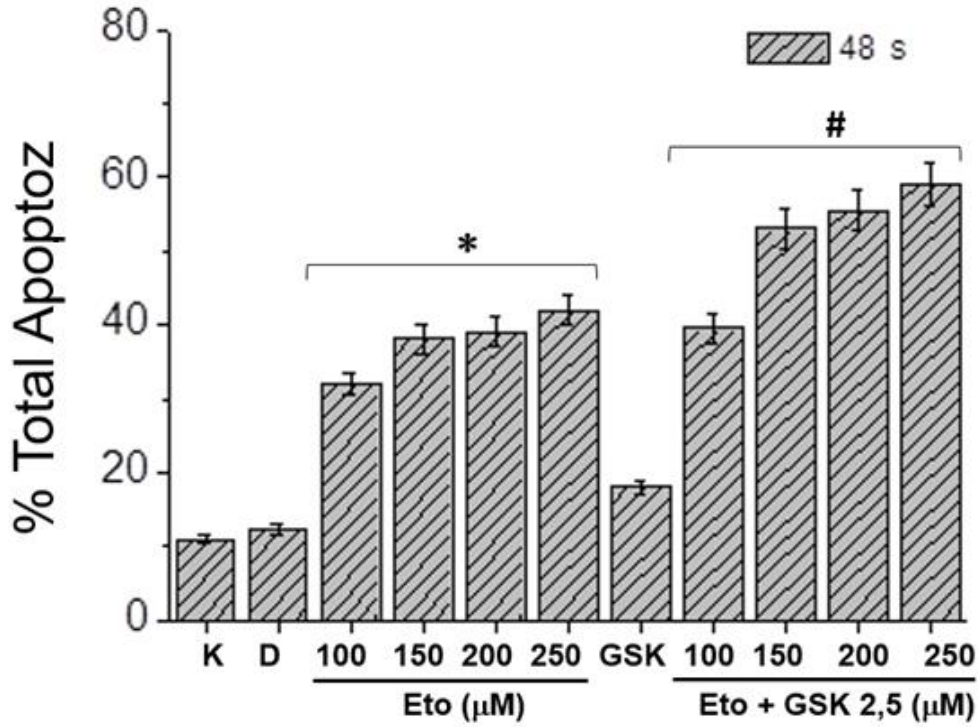


Şekil 11. A204 hücrelerinde 24 Saat ANNEXİN V/7AAD analizi sonuçları

(* : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(# : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Şekil 11. 'da gösterildiği üzere 24 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen veriler sonucu; kontrol grubu hücrelerinde % 3.33 (± 2) oranında total apoptozis belirlenmiş, DMSO, Eto, GSK ve Eto + GSK ile muamele edilen gruplarda ise sırasıyla; DMSO %1.62 (+2), Eto100µM %5.54 (+2), Eto 150µM %7.85 (+2), Eto200µM % 8.08 (+2), Eto250µM %8.37 (+2), GSK 2.5µM %2.81 (+2), Eto100µM + GSK 2.5µM %5.35 (+2), Eto150µM+ GSK 2.5µM %4.76 (+2), Eto200µM GSK 2.5µM %4.56 (+2), Eto250µM GSK 2.5µM %4.33 (+2) oranında apoptozis meydana geldiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla gösterildiği üzere gruplarda meydana gelen total apoptozismiktarınının kontrole göre Eto, kontrole göre GSK, Eto'ya göre Eto+ GSK, GSK' ya göre Eto+ GSK'nın kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği de istatistiksel olarak saptanmıştır. Sırasıyla p değerleri; GSK 2.5µM ($p \geq 0,05$), Eto 100µM ($p < 0,05$), Eto150µM ($p < 0,05$), Eto200µM ($p < 0,05$), Eto250µM ($p < 0,05$), Eto 100µM + GSK 2.5µM ($p < 0,05$), Eto 150µM + GSK 2.5µM ($p < 0,05$), Eto 200µM + GSK 2.5µM ($p < 0,05$), Eto250µM + GSK 2.5µM ($p < 0,05$). Şekil 12.'de A204 hücrelerinde 48 Saat ANNEXİN V/7AAD analizi sonuçları verilmektedir.



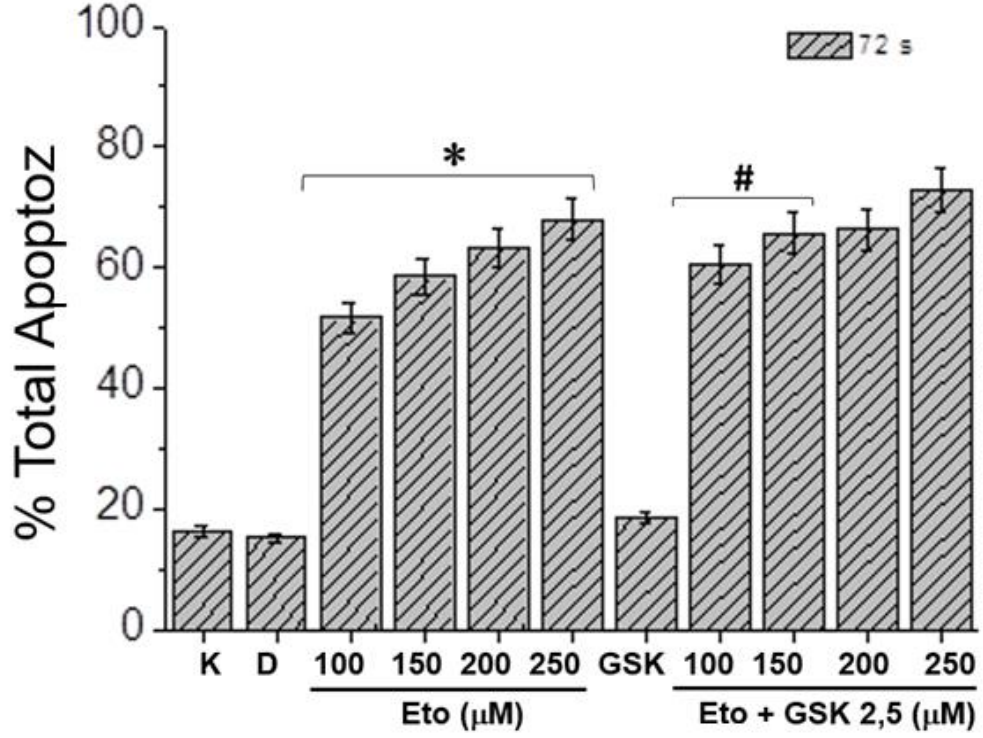
Şekil 12. A204 hücrelerinde 48 Saat ANNEXİN V/7AAD analizi sonuçları

(* : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(# : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Şekil 12.'de gösterildiği üzere; 48 saat inkübasyon sonrası AnnexinV analizleri sonucu; yüzde total apoptozun kontrol grubunda %1.21 (± 2) oranında, DMSO, Eto, GSK ve Eto + GSK ile muamele edilen gruplarda ise total apoptoz yüzdesi sırasıyla DMSO % 2.20 (+2), Eto100µM %25.08 (+2), Eto150µM %36.89 (+2), Eto 200µM %38.13 (+2), Eto250µM %41.13 (+2), GSK 2.5µM %18.45 (+2), Eto100µM + GSK 2.5µM %39.40 (+2), Eto 150µM + GSK 2.5µM %52.40 (+2), Eto 200µM + GSK 2.5µM %55.12 (+2), Eto 250µM + GSK 2.5µM %58.09 (+2) olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlarla gösterildiği üzere kontrole göre Eto, kontrole göre GSK, Eto'ya göre Eto+GSK, GSK'ya göre Eto+ GSK'da kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Sırasıyla p değerleri; GSK 2.5µM ($p \geq 0,05$), Eto 100µM ($p < 0,05$), Eto150µM ($p < 0,05$), Eto200µM ($p < 0,05$), Eto250µM ($p < 0,05$), Eto 100µM + GSK 2.5µM ($p < 0,05$), Eto 150µM + GSK 2.5µM ($p < 0,05$), Eto 200µM + GSK 2.5µM ($p < 0,05$), Eto250µM + GSK 2.5µM ($p < 0,05$)

DMSO, Eto, GSK ve Eto+ GSK ile 72 saat muamele edilmiş A204 hücrelerin de meydana gelen total apoptoz miktarı Şekil 13. gösterildiği gibi % ortalama \pm sapma olarak grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 13. A204 hücrelerinde 72 Saat ANNEXİN V/7AAD analizi sonuçları

(* : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

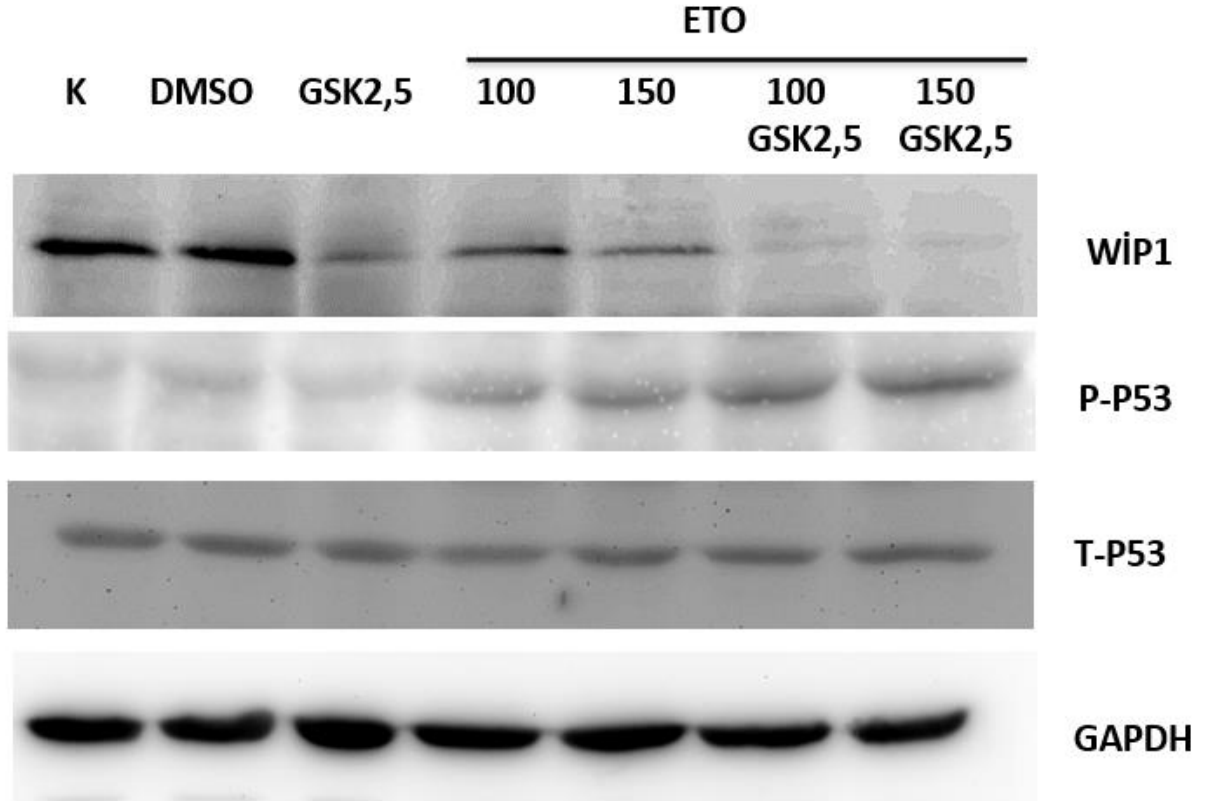
(# : Kontrole kıyasla $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

Şekil 13.'de gösterildiği üzere; 72 saat inkübasyon sonrası AnnexinV analizleri sonucu; yüzde total apoptozun kontrol grubunda %4.56 (±2) oranında, DMSO, Eto, GSK ve Eto + GSK ile muamele edilen gruplarda ise bu miktarın sırasıyla; DMSO %5.66 (±2), Eto100μM %42.63 (±2), Eto150μM %65.25 (±2), Eto200μM %53.05 (±2), Eto 250μM %62.34 (±2), GSK 2.5μM %6.31 (±2), Eto100μM + GSK 2.5μM %39.49 (±2), Eto150μM + GSK 2.5μM %54.28 (±2), Eto200μM + GSK 2.5μM %55.39 (±2), Eto250μM + GSK 2.5μM %60.86 (±2) olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlarla gösterildiği üzere kontrole göre Eto, kontrole göre GSK, Eto'ya göre Eto +GSK, GSK'ya göre Eto+ GSK kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir Sırasıyla p değerleri; GSK 2.5μM ($p \geq 0,05$), Eto 100μM ($p < 0,05$), Eto150μM ($p < 0,05$), Eto200μM ($p < 0,05$), Eto250μM ($p < 0,05$), Eto 100μM + GSK 2.5μM ($p < 0,05$), Eto 150μM + GSK 2.5μM ($p < 0,05$), Eto 200μM + GSK 2.5μM ($p < 0,05$), Eto250μM + GSK 2.5μM ($p < 0,05$). AnnexinVanalizisi sonucuna göre; Wip1 ifadesi baskılanmış A204 hücreleri ile Wip1'i aşırı ifade eden A204 hücrelerinin kontrol gruplarında tespit edilen apoptotik miktarlar arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır.

4.3. Etoposid ve GSK2830371 uygulmasının wip1, p53 seviyesi üzerine Etkileri

Wip1'in aşırı ifade edildiği A204 hücrelerinde GSK 2,5 μ M, Eto100 μ M, Eto150 μ M, Eto100 μ M + GSK 2,5 μ M ve Eto150 μ M + GSK 2,5 μ M (apoptotik dozlarının) 48 saat inkübasyon sonrası DDR'de rol alan Wip1, fosfo p53 ve total p53 proteinlerinin ifade düzeylerini analiz etmek için 'Western Blot (WB) analiz'i gerçekleştirilmiştir.

Her bir analiz için yüklenen protein miktarlarının ne derece eşit olduğunu ortaya çıkartmak amacıyla house-keeping bir gen (herhangi bir çevresel koşuldan etkilenmeyerek hücre içerisindeki ekspresyonu sabit olan genler) olan GAPDH'in ifade düzeyi de analiz edilmiştir. WB sonrası analizi yapılan proteinlere ait bant görüntüleri Şekil 14.'de gösterilmiştir.



Şekil 14. A204 hücrelerinde Eto, GSK ve Eto, GSK'nın 48 saatte western blot sonuçları

(Şekilde gösterilen K: kontrol grubunu, GSK 2,5 μ M, Eto100 μ M, Eto150 μ M, Eto100 μ M + GSK 2,5 μ M ve Eto150 μ M + GSK 2,5 μ M ile muamele edilen grubu, -t: proteinlerin total formlarını, -p: proteinlerin fosforile formlarını ifade etmektedir.)

Şekil 14.'de gösterildiği üzere WB analizi ile 48 saatte; p53 proteininin total formları ayrı ayrı GAPDH ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde kontrol grubu ve etoposid ile muamele edilen gruplar arasında önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Fosfo p53 proteinine bakıldığında etoposid ve GSK ile muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış olduğu saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

DNA'da bir hasar oluştuğunda DDR mekanizması devreye girer. DDR'da ilk olarak DNA hasarının tamiri veya hücre döngüsünün durdurulması sağlanır. DDR mekanizmasında apoptozu p53 proteini aktif hale getirir. P53 proteininin negatif düzenleyicisi ise Wip1 proteindir. Kanserli hücrelerde wip1 proteini sürekli aktif haldedir. Sürekli aktif halde olan Wip1, p53 proteini inaktif ederek dolayısı ile apoptozu inaktif etmektedir. Böylelikle kanserli hücrelerin sağ kalımını indüklenmektedir (Goloudina ve diğerleri, 2016; Le Guezennec ve Bulavin, 2010; Lowe ve diğerleri, 2012; Qian ve Chen, 2010). Bu tez çalışması ile RMS A204 hücre dizisinde aşırı ifade edilen Wip1 fosfataz enziminin kemoterapi üzerine etkileri Eto, GSK ve Eto+ GSK muamelesi ile araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda elde edilen tüm veriler ayrıntılı olarak aşağıda başlıklar altında tartışılmıştır. Buna bağlı olarak çeşitli öneriler sunulmuştur.

5.1. A204 Hücrelerinde Wip1'in GSK2830371 Tarafından İnhibisyonu

Wip1'in solid tümörler de (meme, akciğer, pankreatik ve kolon kanserleri) aşırı ifade edildiği, amplifiye olduğu, mutasyona uğradığı dolayısıyla onkogen özellik kazandığı bilinmektedir (Li ve diğerleri, 2002; Rauta ve diğerleri, 2006; Fuku ve diğerleri, 2007; Castellino ve diğerleri, 2008; Saito-Ohara ve diğerleri, 2003; Tan ve diğerleri, 2009).

Wip1'in regülasyonu bozulmuş ve sürekli ifade edilmeye başlanmışsa ATM/ATR aracılı DNA hasarı cevabını ve p53'ün tümör süpresör fonksiyonunun kaybı meydana gelmekte ve böylece büyüme, genetik istikrar, hücre ölümü, anti-kanser tedavisine duyarlılık gibi pek çok yolak etkilenmektedir. Bu durum tümörögenezi teşvik edebilmektedir. Spesifik bir Wip1 antagonisti olan küçük molekül GSK2830371 (GSK) allosterik bir inhibitör olarak etkisini ve spesifikliğini proteinin flap alt bölgesine bağlanarak fosfataz aktivitesini inhibe ederek göstermektedir (Gilmartin ve diğerleri, 2014; Richter ve diğerleri, 2015). Yapılan bu tez çalışmasında onkogenik Wip1 proteininin aşırı ekspresyonuna sahip olan A204 hücrelerinde GSK, onkogenik Wip1'in etkilerini baskılamak amacıyla kullanılmıştır.

Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HDM201 ve GSK2830371'in hedef üzerindeki etkilerini doğrulamak ve olası mekanizmaları araştırmışlardır. Bu nedenle RBE ve SK-Hep-1 hücrelerinde HDM201 (0.1 uM), GSK2830371 (2.5 uM) veya her ikisinin bir kombinasyonu ile 2, 4, 6 ve 24 saat süren inkübasyona tabi tutmuşlardır. Hücreler, GSK2830371 ile kombinasyon halinde HDM201 ile işlendiğinde, Wip1 fosfataz proteininin azaldığı ve buna karşılık olarak fosforlanmış p53'ün (Ser15) arttığı kaydedilmiştir. Kombinasyon tedavisinden sonra toplam p53 proteininde önemli bir değişiklik gözlenmemesine rağmen, RBE ve SK-Hep-1 hücreleri, 6 saat ve 24 saat boyunca iki doz HDM201 (0.1 uM ve 1 uM) ve GSK2830371 (2.5 uM) ile tedavi edildiğinde benzer bulgular kaydedilmiştir. (Wu ve diğerleri, 2021). Yine Wu ve arkadaşlarının 2018'de, Kutanözmelanom için yeni tedavi stratejileri üzerine yaptıkları başka bir araştırmada; Wip1 inhibitörü, (GSK2830371), nutlin-3, RG7388 ve HDM201'i tek başına ve kombinasyonlarıyla araştırmışlardır. Optimal bir GSK2830371 konsantrasyonunu seçmek için, farklı GSK2830371 konsantrasyonları ile birleştirilmiş MDM2 inhibitörü (5 uM nutlin-3 veya 1 uM RG7388) ile muamele edilmiştir. 2.5 µM'lık bir GSK2830371 konsantrasyonu, her iki MDM2 inhibitörü ile birleştirildiğinde en iyi güçlenmeyi sergilediği ortaya konmuştur. Bu nedenle, WIP1'in p53 üzerindeki rolünü değerlendirmek için sonraki deneylerde 2.5 µM'lık bir GSK2830371 konsantrasyonu kullanılmış. GSK2830371 tek başına kullanıldığında, Ser15 fosforilasyonuna sebep olduğu görülmüştür. Bunun sonucunda, kutanöz melanom hücrelerinde p53'ün apoptozu arttırdığı görülmüştür. (Wu ve diğerleri, 2018). GSK2830371'in MCL hücre hatlarında hücre büyümesi ve canlılığı üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada ise; hücreler, 72 saat boyunca çeşitli GSK2830371 konsantrasyonlarına (0, 2.5, 5, 10 veya 20 uM) maruz bırakılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda GSK ile Wip1'in baskılanması ile bu hücrelerin apoptozise daha duyarlı hale geldikleri gösterilmiştir (Kojima ve diğerleri, 2016).

24-48 ve 72 saat 2,5 µM GSK ile inkübe edilen A204 hücreleriyle yapılan WB analizi sonucunda Wip1'in kontrol grubuna kıyasla protein düzeyinde azalma olduğu görülmektedir. GSK283037 (2.5 µM) aracılığıyla Wip1 ifadesi baskılandığında p53'e sahip hücre dizilerinde apoptozis miktarında artma meydana geldiği bu tez çalışması ile bir kez daha kanıtlanmıştır. Elde edilen veriler literatürde; 2.5 µM'lık bir GSK2830371'in çeşitli hücrelerde Wip1 proteini baskılayarak apoptozaya yol açtığı, çeşitli kemoterapötik ilaçlarla birlikte bir sinerjistik oluşturduğu görülmektedir. Dolayısıyla ile çalışmamızın var olan verilerle birebir örtüşmektedir.

5.2. Etoposid Uygulamasının A204 Hücreleri Üzerinde Etkileri

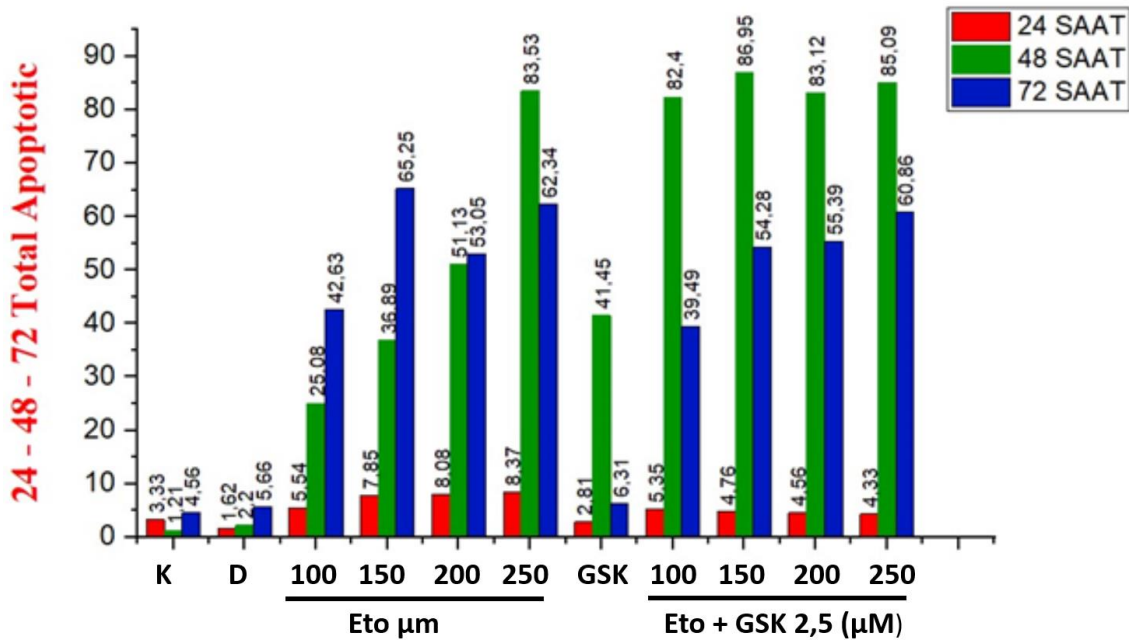
RMS, çocuklarda en sık görülen yumuşak doku sarkomudur (Skapek ve diğerleri 2019). RMS tedavisinde yaygın olarak Vincaalkaloidleri, antrasiklinler, etoposid ve siklofosfamid dahil olmak üzere kemoterapötik ajanlar kullanılarak tedavi edilir. İlk tedavi genellikle başarılıdır, ancak ilaca direnç nedeniyle RMS tekrar nüksetmektedir. Bu durum da hayatta kalmanın önünde büyük bir engel olmaya devam etmektedir (Cockerve diğerleri, 2001). Doksorubisin ve ifosfamid gibi yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanların yumuşak doku sarkomunda %30'dan daha az oranda etkili olduğu kanıtlanmıştır (Karlisch ve diğerleri, 2013). Bu çalışma da DNA hasarı cevabı ve buna bağlı olarak indüklenen apoptozis analizi için DNA hasarı cevabının aktivasyonunu sağlayacak bir anti-kanser ajanı olan Etoposid kullanılmıştır. A204 hücrelerinde DNA hasarı cevabı aktivasyonuna bağlı olarak apoptozis indüksiyonu için A204 hücrelerine; 10 µg/ml etoposid, 15 µg/ml etoposid, 20 µg/ml etoposid ve 25 µg/ml etoposid kullanılmıştır.

Schott ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, onkojenik RAS mutantlarının, RMS13 hücrelerinin antikanser ajanlarına karşı duyarlılığını etkileyip etkilemediği sorusu araştırılmıştır. Bu amaçla, RMS tedavisi için klinik protokollerde yaygın olarak kullanılan iki kemoterapötik ilaç olan Doksorubisin veya Etoposid'in sitotoksitesisi test edilmiştir. Doksorubisin ve Etoposid'in, konsantrasyonlarına (0 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml) ve zamana (24, 48, 72) bağlı bir şekilde RMS13 hücrelerinin hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir (Schott ve diğerleri, 2015). Heinicke ve arkadaşlarının 2015'de yaptığı bir çalışmada ise JNJ-26481585'in etkilerini tek başına ve RMS tedavisi için klinik deney protokollerinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçlarla birlikte test etmişlerdir. Etoposid (0 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml) ve çeşitli antikanser ilaçlarını tek olarak kullanmakla birlikte her birinin JNJ-26481585 ile kombinelerinin apoptoz etkileri test edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlardan biriside Etoposid'in tek başına ve Etoposid + JNJ-26481585 kombinasyonunun sitotoksik etkisi olduğu vurgulanmıştır (Heinicke ve diğerleri, 2015). Yine başka bir çalışmada insan Rabdomyosarkom hücre hatlarında (RD2 ve TE 671) artan dozlarda sitotoksik ilaçlara (sisplatin, doksorubisin ve etoposid) maruz bırakılmış olup; Sisplatin için başlangıç dozu 0.005 µg/ml; doksorubisin için 0,5 ng/ml; ve etoposid için 1.4 ng/ml olarak belirlenmiştir. Bu ilaç konsantrasyonları ile 2 hafta süreyle inkübasyondan sonra, ilaç seviyeleri, tümör dokusunun terapötik olarak ulaşılabilir seviyesinin 10 katına veya tolere edilen maksimum doza ulaşıncaya kadar her 2 haftada bir

arttırılmıştır. Sonuçta, sisplatin, 0,5 µg/ml, doksorubisin, 50 ng/ml ve etoposid, 0.14 µg/ml uygulanmış olmakla beraber hemen hemen tüm dirençli hücre hatlarında çoğalma hızı azaldığı ortaya konmuştur (Leuschner ve diğerleri, 2002). Elde edilen veriler literatürde; Etoposidin çeşitli konsantrasyon ve çeşitli kombinasyonlar ile RMS hücre hatlarında oluşturduğu DNA hasarı cevabına bağlı olarak apoptozisi indüklediği ortaya çıkartılmıştır. Çalışmamızın sonuçları literatürle birebir uyumlu olduğu görülmektedir.

5.3. GSK ve EtoUygulamasının A204 Hücrelerinde Apoptotik Etkileri

Çeşitli kanser türlerinde (meme, nöroblastoma, melanoma, mantlecellenfoma ve glioma) yapılan in vitro ya da in vivo çalışmalarda GSK'nın iyonize radyasyon, Doxo veya Etoposid gibi DNA hasarı ajanlarına karşı bu hücreleri daha duyarlı hale getirdiği ve apoptozis oranını artırdığı görülmektedir. Ayrıca farmokolojik ya da genetik olarak Wip1'in baskılanmasının p53'e sahip tümörlerde kemoterapiye duyarlılık açısından etkili olduğu bilinmektedir (Chen ve diğerleri, 2016; Kojima ve diğerleri, 2016; Pechackova ve diğerleri, 2016; Sriraman ve diğerleri, 2016; Stolte ve diğerleri, 2018; Wu ve diğerleri, 2018).



24 - 48 - 72 Saat ANNEXİN V

Şekil 15. A204 hücrelerinde 24-48-72 Saat ANNEXİN V/7AAD analizi karşılaştırması

Şekil 15’de gösterildiği üzere, A204 hücrelerinde 24-48-72 Saat ANNEXİN V/7AAD analizi karşılaştırıldığında GSK tek başına gösterdiği etki en yüksek 48 saatte %41.45 (+2) olurken, Etoposidin tek başına gösterdiği en iyi etkinin 48 saatte 250µM %83.53 (+2) olduğu görülmektedir. Ancak GSK+Etokombinasyonlarında ise en iyi apoptoz etkisinin 48 saatte (Eto100µM + GSK 2.5µM %82.40 (+2), Eto150µM + GSK 2.5µM %86.95 (+2), Eto 200µM + GSK 2.5µM %83.12 (+2), Eto 250µM+ GSK 2.5µM %85.09 (+2) yüksek oranda olduğu gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında RMS A204 hücre dizisinde GSK ve Eto’nun birlikte etkinliği ilk defa test edilmiştir. Bu veriler Wip1’i aşırı ifade eden tümörlerde de GSK +Eto’nun oldukça iyi bir terapötik ajan olabileceğine işaret etmektedir. Nitekim A204 hücrelerinde GSK veya GSK+Eto uygulaması sonrası yapılan WB analizlerinden elde edilen veriler de bu hipotezi destekler niteliktedir.

Wip1’in DDR üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için bu çalışmada ‘Western Blot’ analizleri gerçekleştirilmiştir. Wip1’in aşırı ifade edildiği ve Wip1’in baskılandığı A204 hücrelerinde gerçekleştirilen WB analizleri karşılaştırıldığında p53 proteininin total formunun eşit düzeyde ifade edildiği ancak aktif olan fosforile formunun ise Wip1 ifadesi baskılanmış hücrelerde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum Wip1 ifadesi artmış A204 hücrelerinde bu proteinin fosforilasyonunun Wip1 tarafından baskılandığına işaret etmektedir. Bu sonuçları Tablo 13. ‘de 48 saatlik Western Blot sonuçlarının karşılaştırılması olarak da görebilmekteyiz.

Tablo 8. 48 saatlik Western Blot sonuçlarının karşılaştırılması olarak işaretel tablosu

WB Apoptozis	Gsk	Eto	Gsk+ Eto
Wip1	---	-	----
Fosfo-p53	-	+++	++++
Total-p53	0	0	0
GAPDH	0	0	0

(Kontrole göre belirgin bir fark olmayan (0), kontrole göre azalan (-) kontrole göre artmış olanlar ise artış miktarlarına oranla (+) işaretiyle ifade edilmiştir.)

Elde edilen sonuçlar A204 hücrelerinde; GSK 2,5 µg/ml deney grubunda Wip1 kontrol grubuna kıyasla WIP1’in ifadesinin çok az olduğu, Eto gruplarında GSK’ya oranla Wip1 ifadesinin biraz artış gösterdiği, ancak GSK ve Eto kombine gruplarında ise Wip1 ifadesinin

tamamen silindiği görülmektedir. Bu sonuçlar GSK'nın etkin bir Wip1 inhibitörü olduğunu göstermektedir.

Tek başına Eto uygulamasıyla DDR'in önemli bileşenlerinden p53'ün fosforilasyonları çok az görülürken GSK + Eto uygulaması sonucunda Wip1'in baskılandığı ve fosfo p53'ün fosforile olduğu net bir şekilde görülmektedir. Bu durum beklenen sonuçlarla uyumludur. Literatürden de bilindiği üzere DDR'nin en önemli elemanlarından olan p53'ün fosforile formu Wip1'in hedef proteinleri arasında yer almakta ve Wip1 tarafından defosforile edilerek DDR'nin baskılanmasına yol açmaktadır. Wip1'in aşırı ifade edildiği ve Wip1'in baskılandığı A204 hücrelerinde gerçekleştirilen WB analizleri karşılaştırıldığında p53 proteininin total formunun eşit düzeyde ifade edildiği bu sonuçlar ile bir kez daha kanıtlanmaktadır. Bu durum Wip1 ifadesi artmış A204 hücrelerinde p53'ün fosforilasyonunun Wip1 tarafından baskılandığına işaret etmektedir.

Hem bizim hem de diğerlerinin gerçekleştirmiş olduğu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde ise bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler literatürde var olan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda onkogenik Wip1'in wt p53 tümörlerde tümörögenезin bir bileşeni ve p53'e bağlı olarak aktive olan tümör süpresör cevapları baskıladığı görülmektedir (Chen ve diğerleri, 2016; Kojima ve diğerleri, 2016; Pechackova ve diğerleri, 2016; Sriraman ve diğerleri, 2016; Stolte ve diğerleri, 2018; Wu ve diğerleri, 2018). Bu tez çalışmasından elde edilen bulgularda RMS'de benzer bir durum olduğuna işaret etmektedir.

Özetle 24-48-72 saat inkübasyon sonrası A204 hücrelerinde meydana getirdiği metabolik aktivite değişimleri 'MTT' testi ve 'Annexin V' testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda Eto ve GSK ile ayrı ayrı muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla zaman artışına bağlı olarak metabolik aktivitede azalma olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte 'MTT' testi ve 'Annexin V' analiziyle elde edilen bulgular 'Western Blot' ile ölçülen Wip1, total p53, p53 protein analiz sonuçlarıyla da desteklenmiştir. Aynı zamanda bu GSK konsantrasyonunun A204 hücrelerinde Eto uygulamasıyla indüklenerek artan Wip1'i de baskılamakta etkili oldukları gösterilmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, PPM1D amplifikasyonundan dolayı aşırı artan Wip1 ekspresyonuna sahip olan A204 hücre dizisinde Wip1 varlığında ve yokluğunda kemoterapiye verdiği yanıt ve DDR'ın önemli elemanı olan fosfo p53 üzerindeki rolü ve kemoterapinin apoptozis üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak Wip1'in aşırı ifade edildiği A204 hücrelerinde;

- 1) Etoposid'in GSK ile kombimesinde 24-48 ve 72 saatte doz artışına bağlı olarak metabolik aktiviteyi azalttığı MTT testi ile tespit edilmiştir.
- 2) Etoposid ve GSK kombinasyonu ile 24-48 ve 72 saatte apoptozisindaha etkin indüklendiği ve zaman artışına bağlı olarak apoptozis miktarında artış olduğu Annexin V testi ile saptanmıştır.
- 3) Etoposid + GSKkombinasyonunun Wip1'in baskılanmasıyla fosfo p53 proteini seviyesinde artışa sebep olduğu Western Blotanalizi ile tespit edilmiştir. Bu sayede çalışmamız RMS kanseri A204 hücrelerinde GSK + Etoindüklü apoptozise DDR'ın önemli elemanlarından fosfo p53 aktivasyonuna aracılık edebileceğini göstermektedir.
- 4) Yapılan testler sonucunda Wip1'in GSK ile inhibisyonu sonrasında A204 hücrelerinin etoposid'e duyarlı hale geldiği, GSK ve Eto kombine olarak beraber uygulandığında daha etkin olduğu gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen veriler ilk defa RMS kanseri A204 hücre hattında GSK + Eto kombinasyonu ile Wip1'in baskılanarak fosfo p53 aktifleştirilerek apoptozis indüklenebileceği ortaya konmuştur. Dolayısıyla elde edilen bu bulgular onkogenik Wip1'i aşırı ifade eden A204 hücrelerinde GSK ile Wip1'in inhibisyonu sonucunda Etoile DDR'nin aktivasyonunun en yüksek düzeyde sağlandığına işaret etmektedir. Esasen bu sonuçlar DDR'nin tümörögenез sırasında onkogenik Wip1 tarafından baskılandığına ve Wip1'in inhibe edilmesiyle DDR'nin yeniden aktive edilebildiğine ve apoptozisin daha etkin biçimde indüklendiğine işaret etmektedir. Ayrıca gelecekte kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesi sırasında onkogenik Wip1'e sahip tümörlerde bu durumun dikkatli değerlendirilmesi gerektiği konusunda önemli bir veri sağlaması açısından dikkat çekici bir çalışmadır. Wip1 ifadesindeki artışın hangi mekanizmaları etkileyerek ilaça duyarlılığı arttırmakta olduğu ise ileride kapsamlı çalışmalarla aydınlatılmayı bekleyen konulardan biridir.

7. KAYNAKLAR

- Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen-Corish, M., & Warusavitarne, J. (2012). Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27(9), 1423-1431.
- Atıcı, E. (2007). Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk onkoloji dergisi*, 22(4), 197-204.
- Barr, F. G., Qualman, S. J., Macris, M. H., Melnyk, N., Lawlor, E. R., Strzelecki, D. M., ... & Sorensen, P. H. (2002). Genetic heterogeneity in the alveolar rhabdomyosarcoma subset without typical gene fusions. *Cancer Research*, 62(16), 4704-4710.
- Bartkova, J., Hořejší, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., ... & Bartek, J. (2005). DNA damageresponse as a candidate anti-cancerbarrier in earlyhumantumorigenesis. *Nature*, 434(7035), 864-870.
- Belova, G., Demidov, O., Fornace, A., andBulavin, D. (2005). Chemicalinhibition of Wip1 phosphatasecontributestosuppression of tumorigenesis. *CancerBiol. Ther.* 4, 1154–1158. doi: 10.4161/cbt.4.10.2204
- Bhattacharjee, S., & Nandi, S. (2017). DNA damage response and cancer therapeutics through the lens of the Fanconi Anemia DNA repair pathway. *Cell Communication and Signaling*, 15(1), 1-10.
- Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damageresponse. *Molecularcell*, 66(6), 801-817.
- Borden, E. C., Baker, L. H., Bell, R. S., Bramwell, V., Demetri, G. D., Eisenberg, B. L., ... & Brennan, M. F. (2003). Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clinical cancer research*, 9(6), 1941-1956.
- Cadet, J. andDavies, KJ (2017). Oxidative DNA damageandrepair: an introduction. *FreeRadicalBiologyandMedicine*, 107, 2-12.
- Castellino, R. C., De Bortoli, M., Lu, X., Moon, S. H., Nguyen, T. A., Shepard, M. A., ... & Kim, J. Y. (2008). Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D. *Journal of neuro-oncology*, 86(3), 245-256.
- Cha, H., Lowe, J. M., Li, H., Lee, J. S., Belova, G. I., Bulavin, D. V., & Fornace, A. J. (2010). Wip1 directlydephosphorylates γ -H2AX andattenuatesthe DNA damageresponse. *Cancerresearch*, 70(10), 4112-4122.

- Charrier-Savournin, F., Château, M.-T., Gire, V., Sedivy, J., Piette, J., and Dulic, V. (2004). p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. *Mol. Biol. Cell.* 15, 3965–3976. doi: 10.1091/mbc.E03-12-0871.
- Charytonowicz, E., Cordon-Cardo, C., Matushansky, I., & Ziman, M. (2009). Alveolar rhabdomyosarcoma: is the cell of origin a mesenchymal stem cell?. *Cancer letters*, 279(2), 126-136.
- Chen, Z., Wang, L., Yao, D., Yang, T., Cao, W. M., Dou, J., ... & Nuchtern, J. G. (2016). Wip1 inhibitor GSK2830371 inhibits neuroblastoma growth by inducing Chk2/p53-mediated apoptosis. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Chew, J., Biswas, S., Shreeram, S., Humaidi, M., Wong, E. T., Dhillon, M. K., ... & Tergaonkar, V. (2009). Wip1 phosphatase is a negative regulator of NF- κ B signalling. *Nature cell biology*, 11(5), 659-666.
- Cocker, H. A., Tiffin, N., Pritchard-Jones, K., Pinkerton, C. R., & Kelland, L. R. (2001). In vitro prevention of the emergence of multidrug resistance in a pediatric rhabdomyosarcoma cell line. *Clinical cancer research*, 7(10), 3193-3198.
- Cosse, J. P., Sermeus, A., Vannuvel, K., Ninane, N., Raes, M., & Michiels, C. (2007). Differential effects of hypoxia on etoposide-induced apoptosis according to the cancer cell lines. *Molecular cancer*, 6(1), 1-16.
- Dashti, N. K., Perry, K., & Cates, J. M. (2021). Rhabdomyosarcoma—Updated Histologic and Molecular Classification for 2021. *AJSP: Reviews & Reports*, 26(1), 56-62.
- Demidov, O. N., Timofeev, O., Lwin, H. N., Kek, C., Appella, E., & Bulavin, D. V. (2007). Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine. *Cell stem cell*, 1(2), 180-190.
- Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mercer, W. E., ... & Appella, E. (1997). Wip1 is a novel human protein phosphatase induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (12), 6048- 6053.
- Franklin, R. D., Smilg, J. S., Zipfel, B., Odes, E. J., De Beer, F., Randolph-Quinney, P. S., ... & Throckmorton, Z. (2016). Earliest human cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *South African Journal of Science*, 112(7), 1-5.
- Fredericks, W. J., Ayyanathan, K., Herlyn, M., Friedman, J. R., & Rauscher III, F. J. (2000). An engineered PAX3-KRAB transcriptional repressor inhibits the malignant phenotype

- of alveolar rhabdomyosarcoma cells harboring the endogenous PAX3-FKHR oncogene. *Molecular and Cellular Biology*, 20(14), 5019-5031.
- Fuku, T., Semba, S., Yutori, H., & Yokozaki, H. (2007). Increased wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1 or PPM1D) expression correlated with downregulation of checkpoint kinase 2 in human gastric carcinoma. *Pathology international*, 57(9), 566-571.
- Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., & Stratton, M. R. (2001). Cancer and genomics. *Nature*, 409(6822), 850-852.
- Gilmartin, A. G., Faitg, T. H., Richter, M., Groy, A., Seefeld, M. A., Darcy, M. G., ... & Kumar, R. (2014). Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction. *Nature chemical biology*, 10(3), 181-187.
- Goloudina, A. R., Mazur, S. J., Appella, E., Garrido, C., & Demidov, O. N. (2012). Wip1 sensitizes p53-negative tumors to apoptosis by regulating the Bax/Bcl-xL ratio. *Cell cycle*, 11(10), 1883-1887.
- Goloudina, A. R., Kochetkova, E. Y., Pospelova, T. V., & Demidov, O. N. (2016). Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. *Oncotarget*, 7(21), 31563.
- Göhler, T., Sabbioneda, S., Green, C. M., & Lehmann, A. R. (2011). ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase η is needed for efficient recovery from UV damage. *Journal of Cell Biology*, 192(2), 219-227.
- Hande, K. R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European journal of cancer*, 34(10), 1514-1521.
- Hoeijmakers JH, DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 361(2009)1475-1485.
- Iyama, T., & Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12(8), 620-636.
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078.
- Karlisch, C., Harati, K., Chromik, AM, Cloud, D., Klein-Hitpass, L., Goertz, O., ... & Daigeler, A. (2013). Effects of TRAIL and taurolidine on apoptosis and proliferation in human rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma and epithelioid cellsarcoma. *International journal of oncology*, 42(3), 945-956.
- Karlsson-Rosenthal, C., & Millar, J. B. (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends in cell biology*, 16(6), 285-292.

- Kojima, K., Maeda, A., Yoshimura, M., Nishida, Y., & Kimura, S. (2016). The pathophysiological significance of PPM1D and therapeutic targeting of PPM1D-mediated signaling by GSK2830371 in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*, 7(43), 69625.
- Krishna Agrawal, Etoposide, Editor(s): S.J. Enna, David B. Bylund, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Elsevier, (2007), Pages 1-5, ISBN 9780080552323, <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61729-5>.
- Lavin, M. F., & Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. *Cell cycle*, 6(8), 931-942.
- Le Guezennec, X., & Bulavin, D. V. (2010). Wip1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging. *Trends in biochemical sciences*, 35(2), 109-114.
- Leuschner, I., Heuer, T., & Harms, D. (2002). Induction of drug resistance in human rhabdomyosarcoma cell lines is associated with increased maturation: possible explanation for differentiation in recurrences? *Pediatric and Developmental Pathology*, 5(3), 276-282.
- Li, J., Yang, Y., Peng, Y., Austin, R. J., van Eyndhoven, W. G., Nguyen, K. C., ... & Powers, S. (2002). Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23. *Nature genetics*, 31(2), 133-134.
- Lin, T., Mak, N. K., & Yang, M. S. (2008). MAPK regulate p53-dependent cell death induced by benzo [a] pyrene: involvement of p53 phosphorylation and acetylation. *Toxicology*, 247(2-3), 145-153.
- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., & Medema, R. H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *Journal of Cell Biology*, 185(2), 193-202.
- Lowe, J., Cha, H., Lee, M. O., Mazur, S. J., Appella, E., & Fornace Jr, A. J. (2012). Regulation of the Wip1 phosphatase and its effects on the stress response. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 17, 1480.
- Lu, X., Bocangel, D., Nannenga, B., Yamaguchi, H., Appella, E., & Donehower, L. A. (2004). The p53-induced oncogenic phosphatase PPM1D interacts with uracil DNA glycosylase and suppresses base excision repair. *Molecular cell*, 15(4), 621-634.
- Lu, X., Nannenga, B., and Donehower, LA (2005). PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes and development*, 19 (10), 1162-1174.
- Lu, X., Nguyen, T. A., Moon, S. H., Darlington, Y., Sommer, M., & Donehower, L. A. (2008). The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(2), 123-135.

- Mamely, I., vanVugt, M. A., Smits, V. A., Semple, J. I., Lemmens, B., Perrakis, A., et al. (2006). Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of claspins during checkpoint recovery. *Curr. Biol.* 16, 1950–1955. doi: 10.1016/j.cub.2006.08.026.
- Manvati, S., Mangalhar, K. C., Kalaiarasan, P., Srivastava, N., Kumar, B., & Bamezai, R. N. K. (2014). MiR-101 induces senescence and prevents apoptosis in the background of DNA damage in MCF7 cells. *PloSone*, 9(10), e111177.
- Merlino, G., & Helman, L. J. (1999). Rhabdomyosarcoma—working out the pathways. *Oncogene*, 18(38), 5340-5348.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, Y. W., & Murray, D. (2013). Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *International journal of molecular sciences*, 14(11), 22409-22435.
- Neuber lamının mikroskop altındaki temsili görünüşü <https://slideplayer.biz.tr/slide/2709491/> 'den 05.08.2021 tarihinde alınmıştır.
- Newton Jr, W. A., Gehan, E. A., Webber, B. L., Marsden, H. B., Van Unnik, A. J. M., Hamoudi, A. B., ... & Ninfo, V. (1995). Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification—an intergroup rhabdomyosarcoma study. *Cancer*, 76(6), 1073-1085.
- O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA damage response in cancer. *Molecular cell*, 60(4), 547-560.
- Ogbomo, H., Michaelis, M., Klassert, D., Doerr, H. W., & Cinatl Jr, J. (2008). Resistance to cytarabine induces the up-regulation of NKG2D ligands and enhances natural killer cell lysis of leukemic cells. *Neoplasia*, 10(12), 1402-1410.
- Ognjanovic, S., Linabery, A. M., Charbonneau, B., & Ross, J. A. (2009). Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 115(18), 4218-4226.
- Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., & Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358(6381), 80-83.
- Parham, D. M., & Ellison, D. A. (2006). Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 130(10), 1454-1465.
- Pecháčková, S., Burdová, K., & Macurek, L. (2017). Wip1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy. *Journal of Molecular Medicine*, 95(6), 589-599.

- Pechackova, S., Burdova, K., Benada, J., Kleiblova, P., Jenikova, G., & Macurek, L. (2016). Inhibition of WIP1 phosphatase sensitizes breast cancer cells to genotoxic stress and to MDM2 antagonist nutlin-3. *Oncotarget*, 7(12), 14458.
- Peng, A. (2013). Working hard for recovery: mitotic kinases in the DNA damage checkpoint. *Cell Biosci.* 3:20. doi: 10.1186/2045-3701-3-20.
- Plumb, J. A. (2004). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture* (pp. 165-169). Humana Press.
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology*, 17(5), 421-433.
- PPM1D/Wip1 geninin, 17q23 bölgesi içinde gösterimi. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PPM1D05.08.2021> tarihinde modifiye edilerek alınmıştır.
- Qian, Y., & Chen, X. (2010). Tumor suppression by p53: making cells senescent. *Histology and histopathology*, 25(4), 515-26.
- Rauta, J., Alarmo, E. L., Kauraniemi, P., Karhu, R., Kuukasjärvi, T., & Kallioniemi, A. (2006). The serine-threonine protein phosphatase PPM1D is frequently activated through amplification in aggressive primary breast tumours. *Breast cancer research and treatment*, 95(3), 257-263.
- Ray, D., and Kiyokawa, H. (2008). CDC25A phosphatase: a rate-limiting onco-gene that determines genomic stability. *Cancer Res.* 68, 1251–1253. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5983
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American journal of pathology*, 157(5), 1415-1430.
- Richter, M., Dayaram, T., Gilmartin, A. G., Ganji, G., Pemmasani, S. K., Van Der Key, H., ... & Kumar, R. (2015). Wip1 phosphatase as a potential therapeutic target in neuroblastoma. *PloSone*, 10(2), e0115635.
- Rodríguez, A., Naveja, J. J., Torres, L., García de Teresa, B., Juárez-Figueroa, U., Ayala-Zambrano, C., ... & Frías, S. (2019). WIP1 contributes to the adaptation of fanconi anemia cells to DNA damage as determined by the regulatory network of the fanconi anemia and checkpoint recovery pathways. *Frontiers in genetics*, 10, 411.
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*, 12(9), 440-450.
- V Roschke, A., & R Kirsch, I. (2010). Targeting karyotypic complexity and chromosomal instability of cancer cells. *Current drug targets*, 11(10), 1341-1350.

- Safarzadeh, E., Shotorbani, S. S., & Baradaran, B. (2014). Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(Suppl 1), 421.
- Saito-Ohara, F., Imoto, I., Inoue, J., Hosoi, H., Nakagawara, A., Sugimoto, T., & Inazawa, J. (2003). PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer research*, 63(8), 1876-1883.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 39-85.
- Sasada, S., Kodaira, M., Shimoi, T., Shimomura, A., Yunokawa, M., Yonemori, K., ... & Tamura, K. (2016). Ifosfamide and topotecan chemotherapy in the treatment of recurrent/refractory rhabdomyosarcoma in adults. *Anticancer research*, 36(5), 2429-2432.
- Schmitz, M. (2010). Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55 [alpha] and importin [beta] 1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nat. Cell Biol.* 12, 133–154. doi: 10.1038/ncb2092.
- Schott, C., Graab, U., Cuvelier, N., Hahn, H., & Fulda, S. (2015). Oncogenic RAS mutants confer resistance of RMS13 rhabdomyosarcoma cells to oxidative stress-induced ferroptotic cell death. *Frontiers in oncology*, 5, 131.
- Seki, A., Coppinger, J. A., Jang, C., Yates, J., and Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora A cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*. 320, 1655–1658. doi: 10.1126/science.1157425.
- Shaltiel, I. A., Aprelia, M., Saurin, A. T., Chowdhury, D., Kops, G. J., Voest, E. E., & Medema, R. H. (2014). Distinct phosphatases antagonize the p53 response in different phases of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20), 7313-7318.
- Shern, J. F., Chen, L., Chmielecki, J., Wei, J. S., Patidar, R., Rosenberg, M., ... & Khan, J. (2014). Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer discovery*, 4(2), 216-231.
- Sigerist HE. (1960) The historical development of the pathology and therapy of cancer. In: Marti -Ibanez F, editor. On the history of medicine. *New York: MD Publications Inc*; p. 59-65.
- Skapek, SX, Ferrari, A., Gupta, AA, Lupo, PJ, Butler, E., Shipley, J., ... & Hawkins, DS (2019). Rhabdomyosarcoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 5 (1), 1-19.

- Song JY, Ryu SH, Cho YM, Kim YS, Lee BM, Lee SW, Choi J. Wip1 suppresses apoptotic cell death through direct phosphorylation of BAX in response to γ -radiation. *Cell Death Dis.* 2013 Aug 1; 4():e744.
- Sriraman, A., Radovanovic, M., Wienken, M., Najafova, Z., Li, Y., & Dobbelstein, M. (2016). Cooperation of Nutlin-3a and a Wip1 inhibitor to induce p53 activity. *Oncotarget*, 7(22), 31623.
- Stolte, B., Iniguez, A. B., Dharia, N. V., Robichaud, A. L., Conway, A. S., Morgan, A. M., ... & Stegmaier, K. (2018). Genome-scale CRISPR-Cas9 screen identifies druggable dependencies in TP53 wild-type Ewing sarcoma. *Journal of Experimental Medicine*, 215(8), 2137-2155.
- Stout, AP (1946). Rhabdomyosarcoma of skeletal muscles. *Annals of the surgery*, 123 (3), 447.
- Kallen, M. E., & Hornick, J. L. (2021). The 2020 WHO classification: what's new in soft tissue tumor pathology? *The American journal of surgical pathology*, 45(1), e1-e23.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., & Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular cancer*, 14(1), 1-14.
- Tan, D. S., Lambros, M. B., Rayter, S., Natrajan, R., Vatcheva, R., Gao, Q., ... & Reis-Filho, J. S. (2009). PPM1D is a potential therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas. *Clinical cancer research*, 15(7), 2269-2280.
- Vesela, E., Chroma, K., Turi, Z., & Mistrik, M. (2017). Common chemical inducers of replication stress: focus on cell-based studies. *Biomolecules*, 7(1), 19.
- Wachtel, M., Dettling, M., Koscielniak, E., Stegmaier, S., Treuner, J., Simon-Klingenstein, K., ... & Schäfer, B. W. (2004). Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t (2; 2)(q35; p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer research*, 64(16), 5539-5545.
- Wamsley, J. J., Issaeva, N., An, H., Lu, X., Donehower, L. A., & Yarbrough, W. G. (2017). LZAP is a novel Wip1 binding partner and positive regulator of its phosphatase activity in vitro. *Cell Cycle*, 16(2), 213-223.
- Wang, H. Y., Liu, Z. S., Qiu, L., Guo, J., Li, Y. F., Zhang, J., ... & Liu, X. D. (2015). Knockdown of Wip1 enhances sensitivity to radiation in HeLa cells through activation of p38 MAPK. *Oncology research*, 22(4), 225.
- Wu, C. E., Esfandiari, A., Ho, Y. H., Wang, N., Mahdi, A. K., Aptullahoglu, E., ... & Lunec, J. (2018). Targeting negative regulation of p53 by MDM2 and Wip1 as a therapeutic strategy in cutaneous melanoma. *British journal of cancer*, 118(4), 495-508.

- Wu, C. E., Huang, C. Y., Chen, C. P., Pan, Y. R., Chang, J. W. C., Chen, J. S., ... & Lunec, J. (2021). Wip1 Inhibition by GSK2830371 Potentiates HDM201 through Enhanced p53 Phosphorylation and Activation in Liver Adenocarcinoma Cells. *Cancers*, 13(15), 3876.
- Xia, S. J., Pressey, J. G., & Barr, F. G. (2002). Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer biology & therapy*, 1(2), 97-104.
- Yao, Y., & Dai, W. (2014). Genomic instability and cancer. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis*, 5.
- Yin, S., Wang, P., Yang, L., Liu, Y., Wang, Y., Liu, M., ... & Zang, R. (2016). Wip1 suppresses ovarian cancer metastasis through the ATM/AKT/Snail mediated signaling. *Oncotarget*, 7(20), 29359.
- Zannini, L., Delia, D., & Buscemi, G. (2014). CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of molecular cell biology*, 6(6), 442-457.

EKLER

Ek 1 (24 Saat MTT İstatik Analizleri)

ANOVAOneWay (24.01.2022 21:08:40)

Descriptive Statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
K	2	0	0,8925	0,00495	0,0035
DMSO	2	0	0,9005	0,01061	0,0075
ETO 100	2	0	0,676	0,02687	0,019
ETO 150	2	0	0,6395	0,00636	0,0045
ETO 200	2	0	0,5535	0,00919	0,0065
ETO 250	2	0	0,4925	0,03041	0,0215
GSK 2.5	2	0	0,76	0,02404	0,017
ETO 100 GSK 2.5	2	0	0,6335	0,00212	0,0015
ETO 150 GSK 2.5	2	0	0,5265	0,00636	0,0045
ETO 200 GSK 2.5	2	0	0,439	0,01697	0,012
ETO 250 GSK 2.5	2	0	0,437	0,00849	0,006

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	10	0,54072	0,05407	205,70175	5,00245E-11
Error	11	0,00289	2,62864E-4		
Total	21	0,54361			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
	0,99468	0,02566	0,01621	0,63186

Means Comparisons

Bonferroni Test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
DMSO K	0,008	0,01621	0,49343	1	0,05	0	-0,06487	0,08087
ETO 100 K	-0,2165	0,01621	-13,35342	2,11769E-6	0,05	1	-0,28937	-0,14363
ETO 100 DMSO	-0,2245	0,01621	-13,84685	1,45048E-6	0,05	1	-0,29737	-0,15163
ETO 150 K	-0,253	0,01621	-15,60469	4,13201E-7	0,05	1	-0,32587	-0,18013
ETO 150 DMSO	-0,261	0,01621	-16,09812	2,97306E-7	0,05	1	-0,33387	-0,18813
ETO 150 ETO 100	-0,0365	0,01621	-2,25127	1	0,05	0	-0,10937	0,03637
ETO 200 K	-0,339	0,01621	-20,90906	1,82362E-8	0,05	1	-0,41187	-0,26613
ETO 200 DMSO	-0,347	0,01621	-21,40249	1,41897E-8	0,05	1	-0,41987	-0,27413
ETO 200 ETO 100	-0,1225	0,01621	-7,55563	6,15959E-4	0,05	1	-0,19537	-0,04963
ETO 200 ETO 150	-0,086	0,01621	-5,30436	0,01379	0,05	1	-0,15887	-0,01313
ETO 250 K	-0,4	0,01621	-24,67145	3,06036E-9	0,05	1	-0,47287	-0,32713
ETO 250 DMSO	-0,408	0,01621	-25,16488	2,46997E-9	0,05	1	-0,48087	-0,33513
ETO 250 ETO 100	-0,1835	0,01621	-11,31803	1,16468E-5	0,05	1	-0,25637	-0,11063
ETO 250 ETO 150	-0,147	0,01621	-9,06676	1,0724E-4	0,05	1	-0,21987	-0,07413
ETO 250 ETO 200	-0,061	0,01621	-3,7624	0,17279	0,05	0	-0,13387	0,01187
GSK 2.5 K	-0,1325	0,01621	-8,17242	2,93171E-4	0,05	1	-0,20537	-0,05963
GSK 2.5 DMSO	-0,1405	0,01621	-8,66585	1,66678E-4	0,05	1	-0,21337	-0,06763
GSK 2.5 ETO 100	0,084	0,01621	5,18101	0,01668	0,05	1	0,01113	0,15687
GSK 2.5 ETO 150	0,1205	0,01621	7,43228	7,18254E-4	0,05	1	0,04763	0,19337
GSK 2.5 ETO 200	0,2065	0,01621	12,73664	3,46018E-6	0,05	1	0,13363	0,27937
GSK 2.5 ETO 250	0,2675	0,01621	16,49903	2,29089E-7	0,05	1	0,19463	0,34037
ETO 100 GSK 2.5 K	-0,259	0,01621	-15,97477	3,22523E-7	0,05	1	-0,33187	-0,18613
ETO 100 GSK 2.5 DMSO	-0,267	0,01621	-16,4682	2,3368E-7	0,05	1	-0,33987	-0,19413
ETO 100 GSK 2.5 ETO 100	-0,0425	0,01621	-2,62134	1	0,05	0	-0,11537	0,03037
ETO 100 GSK 2.5 ETO 150	-0,006	0,01621	-0,37007	1	0,05	0	-0,07887	0,06687
ETO 100 GSK 2.5 ETO 200	0,08	0,01621	4,93429	0,02456	0,05	1	0,00713	0,15287
ETO 100 GSK 2.5 ETO 250	0,141	0,01621	8,69669	1,61029E-4	0,05	1	0,06813	0,21387
ETO 100 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,1265	0,01621	-7,80235	4,55383E-4	0,05	1	-0,19937	-0,05363
ETO 150 GSK 2.5 K	-0,366	0,01621	-22,57438	7,98993E-9	0,05	1	-0,43887	-0,29313
ETO 150 GSK 2.5 DMSO	-0,374	0,01621	-23,06781	6,32733E-9	0,05	1	-0,44687	-0,30113
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	-0,1495	0,01621	-9,22096	9,0877E-5	0,05	1	-0,22237	-0,07663
ETO 150 GSK 2.5 ETO 150	-0,113	0,01621	-6,96969	0,0013	0,05	1	-0,18587	-0,04013
ETO 150 GSK 2.5 ETO 200	-0,027	0,01621	-1,66532	1	0,05	0	-0,09987	0,04587
ETO 150 GSK 2.5 ETO 250	0,034	0,01621	2,09707	1	0,05	0	-0,03887	0,10687

ETO 150 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,2335	0,01621	-14,40196	9,61176E-7	0,05	1	-0,30637	-0,16063
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	-0,107	0,01621	-6,59961	0,00213	0,05	1	-0,17987	-0,03413
ETO 200 GSK 2.5 K	-0,4535	0,01621	-27,97126	7,84858E-1	0,05	1	-0,52637	-0,38063
ETO 200 GSK 2.5 DMSO	-0,4615	0,01621	-28,46469	6,49088E-1	0,05	1	-0,53437	-0,38863
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	-0,237	0,01621	-14,61784	8,22219E-7	0,05	1	-0,30987	-0,16413
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	-0,2005	0,01621	-12,36657	4,69317E-6	0,05	1	-0,27337	-0,12763
ETO 200 GSK 2.5 ETO 200	-0,1145	0,01621	-7,0622	0,00115	0,05	1	-0,18737	-0,04163
ETO 200 GSK 2.5 ETO 250	-0,0535	0,01621	-3,29981	0,38942	0,05	0	-0,12637	0,01937
ETO 200 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,321	0,01621	-19,79884	3,27599E-8	0,05	1	-0,39387	-0,24813
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	-0,1945	0,01621	-11,99649	6,41731E-6	0,05	1	-0,26737	-0,12163
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	-0,0875	0,01621	-5,39688	0,01197	0,05	1	-0,16037	-0,01463
ETO 250 GSK 2.5 K	-0,4555	0,01621	-28,09462	7,48233E-1	0,05	1	-0,52837	-0,38263
ETO 250 GSK 2.5 DMSO	-0,4635	0,01621	-28,58805	6,19298E-1	0,05	1	-0,53637	-0,39063
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	-0,239	0,01621	-14,74119	7,52737E-7	0,05	1	-0,31187	-0,16613
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	-0,2025	0,01621	-12,48992	4,23605E-6	0,05	1	-0,27537	-0,12963
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	-0,1165	0,01621	-7,18556	9,81909E-4	0,05	1	-0,18937	-0,04363
ETO 250 GSK 2.5 ETO 250	-0,0555	0,01621	-3,42316	0,31302	0,05	0	-0,12837	0,01737
ETO 250 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,323	0,01621	-19,9222	3,66488E-8	0,05	1	-0,39587	-0,25013
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	-0,1965	0,01621	-12,11985	5,77638E-6	0,05	1	-0,26937	-0,12363
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	-0,0895	0,01621	-5,52024	0,00994	0,05	1	-0,16237	-0,01663
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	-0,002	0,01621	-0,12336	1	0,05	0	-0,07487	0,07087

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.
Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.

Ek 2 (48 Saat MTT İstatik Analizleri)

ANOVAOneWay (24.01.2022 21:05:17)

Descriptive Statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
K	2	0	0,8225	0,02899	0,0205
DMSO	2	0	0,8405	0,00636	0,0045
ETO 100	2	0	0,4135	7,07107E-4	5E-4
ETO 150	2	0	0,298	0,00424	0,003
ETO 200	2	0	0,236	0,00283	0,002
ETO 250	2	0	0,194	0,00707	0,005
GSK 2.5	2	0	0,53	0,04243	0,03
ETO 100 GSK 2.5	2	0	0,305	0,03111	0,022
ETO 150 GSK 2.5	2	0	0,2805	7,07107E-4	5E-4
ETO 200 GSK 2.5	2	0	0,2315	7,07107E-4	5E-4
ETO 250 GSK 2.5	2	0	0,201	0,0198	0,014

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	10	1,12092	0,11209	299,38276	6,4442E-12
Error	11	0,00412	3,74409E-4		
Total	21	1,12503			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99634	0,0489	0,01935	0,39568

Means Comparisons

Bonferroni Test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
DMSO K	0,018	0,01935	0,93025	1	0,05	0	-0,06897	0,10497
ETO 100 K	-0,409	0,01935	-21,13733	1,62265E-8	0,05	1	-0,49597	-0,32203
ETO 100 DMSO	-0,427	0,01935	-22,06758	1,02059E-8	0,05	1	-0,51397	-0,34003
ETO 150 K	-0,5245	0,01935	-27,10643	1,10369E-9	0,05	1	-0,61147	-0,43753
ETO 150 DMSO	-0,5425	0,01935	-28,03668	7,65198E-10	0,05	1	-0,62947	-0,45553
ETO 150 ETO 100	-0,1155	0,01935	-5,9691	0,00513	0,05	1	-0,20247	-0,02853
ETO 200 K	-0,5865	0,01935	-30,31062	3,2781E-10	0,05	1	-0,67347	-0,49953
ETO 200 DMSO	-0,6045	0,01935	-31,24087	2,35908E-10	0,05	1	-0,69147	-0,51753
ETO 200 ETO 100	-0,1775	0,01935	-9,17329	9,56266E-5	0,05	1	-0,26447	-0,09053
ETO 200 ETO 150	-0,062	0,01935	-3,20419	0,46155	0,05	0	-0,14897	0,02497
ETO 250 K	-0,6285	0,01935	-32,4812	1,54378E-10	0,05	1	-0,71547	-0,54153
ETO 250 DMSO	-0,6465	0,01935	-33,41145	1,13485E-10	0,05	1	-0,73347	-0,55953
ETO 250 ETO 100	-0,2195	0,01935	-11,34387	1,13791E-5	0,05	1	-0,30647	-0,13253
ETO 250 ETO 150	-0,104	0,01935	-5,37477	0,01238	0,05	1	-0,19097	-0,01703
ETO 250 ETO 200	-0,042	0,01935	-2,17058	1	0,05	0	-0,12897	0,04497
GSK 2.5 K	-0,2925	0,01935	-15,11655	5,77753E-7	0,05	1	-0,37947	-0,20553
GSK 2.5 DMSO	-0,3105	0,01935	-16,0468	3,07528E-7	0,05	1	-0,39747	-0,22353
GSK 2.5 ETO 100	0,1165	0,01935	6,02078	0,00477	0,05	1	0,02953	0,20347
GSK 2.5 ETO 150	0,232	0,01935	11,98988	6,45379E-6	0,05	1	0,14503	0,31897
GSK 2.5 ETO 200	0,294	0,01935	15,19407	5,47441E-7	0,05	1	0,20703	0,38097
GSK 2.5 ETO 250	0,336	0,01935	17,36465	1,33065E-7	0,05	1	0,24903	0,42297
ETO 100 GSK 2.5 K	-0,5175	0,01935	-26,74466	1,27687E-9	0,05	1	-0,60447	-0,43053
ETO 100 GSK 2.5 DMSO	-0,5355	0,01935	-27,67491	8,81082E-10	0,05	1	-0,62247	-0,44853
ETO 100 GSK 2.5 ETO 100	-0,1085	0,01935	-5,60734	0,00872	0,05	1	-0,19547	-0,02153
ETO 100 GSK 2.5 ETO 150	0,007	0,01935	0,36176	1	0,05	0	-0,07997	0,09397
ETO 100 GSK 2.5 ETO 200	0,069	0,01935	3,56596	0,24345	0,05	0	-0,01797	0,15597
ETO 100 GSK 2.5 ETO 250	0,111	0,01935	5,73654	0,0072	0,05	1	0,02403	0,19797
ETO 100 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,225	0,01935	-11,62812	8,83662E-6	0,05	1	-0,31197	-0,13803
ETO 150 GSK 2.5 K	-0,542	0,01935	-28,01084	7,72899E-10	0,05	1	-0,62897	-0,45503
ETO 150 GSK 2.5 DMSO	-0,56	0,01935	-28,94109	5,41971E-10	0,05	1	-0,64697	-0,47303
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	-0,133	0,01935	-6,87351	0,00147	0,05	1	-0,21997	-0,04603
ETO 150 GSK 2.5 ETO 150	-0,0175	0,01935	-0,90441	1	0,05	0	-0,10447	0,06947
ETO 150 GSK 2.5 ETO 200	0,0445	0,01935	2,29978	1	0,05	0	-0,04247	0,13147
ETO 150 GSK 2.5 ETO 250	0,0865	0,01935	4,47036	0,05205	0,05	0	-4,71114	0,17347

ETO 150 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,2495	0,01935	-12,89429	3,04600E-6	0,05	1	-0,33047	-0,16253
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	-0,0245	0,01935	-1,26617	1	0,05	0	-0,11147	0,06247
ETO 200 GSK 2.5 K	-0,591	0,01935	-30,54318	3,01651E-10	0,05	1	-0,67797	-0,50403
ETO 200 GSK 2.5 DMSO	-0,609	0,01935	-31,47343	2,17607E-10	0,05	1	-0,69597	-0,52203
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	-0,182	0,01935	-9,40585	7,47267E-5	0,05	1	-0,26897	-0,09503
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	-0,0665	0,01935	-3,43675	0,3056	0,05	0	-0,15347	0,02047
ETO 200 GSK 2.5 ETO 200	-0,0045	0,01935	-0,23256	1	0,05	0	-0,09147	0,08247
ETO 200 GSK 2.5 ETO 250	0,0375	0,01935	1,93802	1	0,05	0	-0,04947	0,12447
ETO 200 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,2985	0,01935	-15,42663	4,66417E-7	0,05	1	-0,38547	-0,21153
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	-0,0735	0,01935	-3,79852	0,1623	0,05	0	-0,16047	0,01347
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	-0,049	0,01935	-2,53235	1	0,05	0	-0,13597	0,03797
ETO 250 GSK 2.5 K	-0,6215	0,01935	-32,11944	1,74412E-10	0,05	1	-0,70847	-0,53453
ETO 250 GSK 2.5 DMSO	-0,6395	0,01935	-33,04969	1,27783E-10	0,05	1	-0,72647	-0,55253
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	-0,2125	0,01935	-10,98211	1,58245E-5	0,05	1	-0,29947	-0,12553
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	-0,097	0,01935	-5,01301	0,02169	0,05	1	-0,18397	-0,01003
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	-0,035	0,01935	-1,80882	1	0,05	0	-0,12197	0,05197
ETO 250 GSK 2.5 ETO 250	0,007	0,01935	0,36176	1	0,05	0	-0,07997	0,09397
ETO 250 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,329	0,01935	-17,00289	1,66459E-7	0,05	1	-0,41597	-0,24203
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	-0,104	0,01935	-5,37477	0,01238	0,05	1	-0,19097	-0,01703
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	-0,0795	0,01935	-4,1086	0,09536	0,05	0	-0,16647	0,00747
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	-0,0305	0,01935	-1,57626	1	0,05	0	-0,11747	0,05647

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.

Ek 3 (72 Saat MTT İstatik Analizleri)

ANOVAOneWay (24.01.2022 20:49:41)

Descriptive Statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
K	2	0	1,3885	0,00354	0,0025
DMSO	2	0	1,2225	0,01202	0,0085
ETO 100	2	0	0,3805	0,00354	0,0025
ETO 150	2	0	0,256	0,00141	1E-3
ETO 200	2	0	0,242	0,00424	0,003
ETO 250	2	0	0,2305	0,00636	0,0045
GSK 2.5	2	0	0,715	0,00707	0,005
ETO 100 GSK 2.5	2	0	0,312	0	0
ETO 150 GSK 2.5	2	0	0,2385	7,07107E-4	5E-4
ETO 200 GSK 2.5	2	0	0,188	0,00849	0,006
ETO 250 GSK 2.5	2	0	0,186	0,00424	0,003

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	10	3,73709	0,37371	11095,278	1,56287E-20
Error	11	3,705E-4	3,36818E-5		
Total	21	3,73746			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,9999	0,01191	0,0058	0,48723

Means Comparisons

Bonferroni Test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
DMSO K	-0,166	0,0058	-28,60292	6,15809E-10	0,05	1	-0,19209	-0,13991
ETO 100 K	-1,008	0,0058	-173,68518	1,58933E-18	0,05	1	-1,03409	-0,98191
ETO 100 DMSO	-0,842	0,0058	-145,08227	1,14948E-17	0,05	1	-0,86809	-0,81591
ETO 150 K	-1,1325	0,0058	-195,13737	4,41598E-19	0,05	1	-1,15859	-1,10641
ETO 150 DMSO	-0,9665	0,0058	-166,53445	2,52342E-18	0,05	1	-0,99259	-0,94041
ETO 150 ETO 100	-0,1245	0,0058	-21,45219	1,38399E-8	0,05	1	-0,15059	-0,09841
ETO 200 K	-1,1465	0,0058	-197,54966	3,85788E-19	0,05	1	-1,17259	-1,12041
ETO 200 DMSO	-0,9805	0,0058	-168,94675	2,15433E-18	0,05	1	-1,00659	-0,95441
ETO 200 ETO 100	-0,1385	0,0058	-23,86448	4,38483E-9	0,05	1	-0,16459	-0,11241
ETO 200 ETO 150	-0,014	0,0058	-2,41229	1	0,05	0	-0,04009	0,01209
ETO 250 K	-1,158	0,0058	-199,53119	3,45686E-19	0,05	1	-1,18409	-1,13191
ETO 250 DMSO	-0,992	0,0058	-170,92827	1,89507E-18	0,05	1	-1,01809	-0,96591
ETO 250 ETO 100	-0,15	0,0058	-25,84601	1,84955E-9	0,05	1	-0,17609	-0,12391
ETO 250 ETO 150	-0,0255	0,0058	-4,39382	0,05908	0,05	0	-0,05159	5,85526E-4
ETO 250 ETO 200	-0,0115	0,0058	-1,98153	1	0,05	0	-0,03759	0,01459
GSK 2.5 K	-0,6735	0,0058	-116,04858	1,33835E-16	0,05	1	-0,69959	-0,64741
GSK 2.5 DMSO	-0,5075	0,0058	-87,44566	2,99998E-15	0,05	1	-0,53359	-0,48141
GSK 2.5 ETO 100	0,3345	0,0058	57,6366	2,91366E-13	0,05	1	0,30841	0,36059
GSK 2.5 ETO 150	0,459	0,0058	79,08879	9,04214E-15	0,05	1	0,43291	0,48509
GSK 2.5 ETO 200	0,473	0,0058	81,50108	6,50076E-15	0,05	1	0,44691	0,49909
GSK 2.5 ETO 250	0,4845	0,0058	83,48261	4,99316E-15	0,05	1	0,45841	0,51059
ETO 100 GSK 2.5 K	-1,0765	0,0058	-185,48819	7,71304E-19	0,05	1	-1,10259	-1,05041
ETO 100 GSK 2.5 DMSO	-0,9105	0,0058	-156,88528	4,8643E-18	0,05	1	-0,93659	-0,88441
ETO 100 GSK 2.5 ETO 100	-0,0685	0,0058	-11,80301	7,58328E-6	0,05	1	-0,09459	-0,04241
ETO 100 GSK 2.5 ETO 150	0,056	0,0058	9,64918	5,80301E-5	0,05	1	0,02991	0,08209
ETO 100 GSK 2.5 ETO 200	0,07	0,0058	12,06147	6,0706E-6	0,05	1	0,04391	0,09609
ETO 100 GSK 2.5 ETO 250	0,0815	0,0058	14,043	1,2521E-6	0,05	1	0,05541	0,10759
ETO 100 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,403	0,0058	-69,43961	3,77316E-14	0,05	1	-0,42909	-0,37691
ETO 150 GSK 2.5 K	-1,15	0,0058	-198,15274	3,7307E-19	0,05	1	-1,17609	-1,12391
ETO 150 GSK 2.5 DMSO	-0,984	0,0058	-169,54982	2,07155E-18	0,05	1	-1,01009	-0,95791
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	-0,142	0,0058	-24,46756	3,34783E-9	0,05	1	-0,16809	-0,11591
ETO 150 GSK 2.5 ETO 150	-0,0175	0,0058	-3,01537	0,64639	0,05	0	-0,04359	0,00859
ETO 150 GSK 2.5 ETO 200	-0,0035	0,0058	-0,60307	1	0,05	0	-0,02959	0,02259
ETO 150 GSK 2.5 ETO 250	0,008	0,0058	1,37845	1	0,05	0	-0,01809	0,03409

ETO 150 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,4765	0,0058	-62,10416	5,99512E-15	0,05	1	-0,50259	-0,45041
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	-0,0735	0,0058	-12,66454	3,66959E-6	0,05	1	-0,09959	-0,04741
ETO 200 GSK 2.5 K	-1,2005	0,0058	-206,85423	2,3256E-19	0,05	1	-1,22659	-1,17441
ETO 200 GSK 2.5 DMSO	-1,0345	0,0058	-178,25131	1,19477E-18	0,05	1	-1,06059	-1,00841
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	-0,1925	0,0058	-33,16905	1,2286E-10	0,05	1	-0,21859	-0,16641
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	-0,068	0,0058	-11,71686	8,17472E-6	0,05	1	-0,09409	-0,04191
ETO 200 GSK 2.5 ETO 200	-0,054	0,0058	-9,30456	8,315E-5	0,05	1	-0,08009	-0,02791
ETO 200 GSK 2.5 ETO 250	-0,0425	0,0058	-7,32304	8,24167E-4	0,05	1	-0,06859	-0,01641
ETO 200 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,527	0,0058	-90,80565	1,98257E-15	0,05	1	-0,55309	-0,50091
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	-0,124	0,0058	-21,36603	1,44524E-8	0,05	1	-0,15009	-0,09791
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	-0,0505	0,0058	-8,70149	1,60169E-4	0,05	1	-0,07659	-0,02441
ETO 250 GSK 2.5 K	-1,2025	0,0058	-207,19884	2,28341E-19	0,05	1	-1,22859	-1,17641
ETO 250 GSK 2.5 DMSO	-1,0365	0,0058	-178,59592	1,16967E-18	0,05	1	-1,06259	-1,01041
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	-0,1945	0,0058	-33,51366	1,09769E-10	0,05	1	-0,22059	-0,16841
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	-0,07	0,0058	-12,06147	6,0706E-6	0,05	1	-0,09609	-0,04391
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	-0,056	0,0058	-9,64918	5,80301E-5	0,05	1	-0,08209	-0,02991
ETO 250 GSK 2.5 ETO 250	-0,0445	0,0058	-7,66765	5,36564E-4	0,05	1	-0,07059	-0,01841
ETO 250 GSK 2.5 GSK 2.5	-0,529	0,0058	-91,15026	1,90176E-15	0,05	1	-0,55509	-0,50291
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	-0,126	0,0058	-21,71065	1,21657E-8	0,05	1	-0,15209	-0,09991
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	-0,0525	0,0058	-9,0461	1,09664E-4	0,05	1	-0,07859	-0,02641
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	-0,002	0,0058	-0,34461	1	0,05	0	-0,02809	0,02409

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.

Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.

Ek 4 (24 Saat Annexin İstatik Analizleri)

ANOVAOneWay (24.01.2022 20:48:34)

Descriptive Statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
K	2	0	10,65	0,21213	0,15
DMSO	2	0	5,55	6,71751	4,75
ETO 100	2	0	25,51	0,72125	0,51
ETO 150	2	0	31,55	0,77782	0,55
ETO 200	2	0	32,545	0,91217	0,645
ETO 250	2	0	35,5	0,70711	0,5
GSK 2.5	2	0	13,45	0,6364	0,45
ETO 100 GSK 2.5	2	0	29,5	0,70711	0,5
ETO 150 GSK 2.5	2	0	38,45	0,6364	0,45
ETO 200 GSK 2.5	2	0	35,5	0,70711	0,5
ETO 250 GSK 2.5	2	0	38,5	0,70711	0,5

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	10	2757,58343	275,75834	60,74307	3,66552E-8
Error	11	49,93725	4,53975		
Total	21	2807,52068			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,98221	0,07899	2,13067	26,97318

Means Comparisons

Bonferroni Test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
DMSO K	-5,1	2,13067	-2,39361	1	0,05	0	-14,67674	4,47674
ETO 100 K	14,86	2,13067	6,97434	0,00129	0,05	1	5,28326	24,43674
ETO 100 DMSO	19,96	2,13067	9,36795	7,77655E-5	0,05	1	10,38326	29,53674
ETO 150 K	20,9	2,13067	9,80913	4,928E-5	0,05	1	11,32326	30,47674
ETO 150 DMSO	26	2,13067	12,20274	5,38489E-6	0,05	1	16,42326	35,57674
ETO 150 ETO 100	6,04	2,13067	2,83479	0,89278	0,05	0	-3,53674	15,61674
ETO 200 K	21,895	2,13067	10,27612	3,09522E-5	0,05	1	12,31826	31,47174
ETO 200 DMSO	26,995	2,13067	12,66973	3,65408E-6	0,05	1	17,41826	36,57174
ETO 200 ETO 100	7,035	2,13067	3,30178	0,38806	0,05	0	-2,54174	16,61174
ETO 200 ETO 150	0,995	2,13067	0,46699	1	0,05	0	-8,58174	10,57174
ETO 250 K	24,85	2,13067	11,663	8,56971E-6	0,05	1	15,27326	34,42674
ETO 250 DMSO	29,95	2,13067	14,05662	1,23946E-6	0,05	1	20,37326	39,52674
ETO 250 ETO 100	9,99	2,13067	4,68867	0,03642	0,05	1	0,41326	19,56674
ETO 250 ETO 150	3,95	2,13067	1,85388	1	0,05	0	-5,62674	13,52674
ETO 250 ETO 200	2,955	2,13067	1,38689	1	0,05	0	-6,62174	12,53174
GSK 2.5 K	2,8	2,13067	1,31414	1	0,05	0	-6,77674	12,37674
GSK 2.5 DMSO	7,9	2,13067	3,70776	0,19	0,05	0	-1,67674	17,47674
GSK 2.5 ETO 100	-12,06	2,13067	-5,66019	0,00806	0,05	1	-21,63674	-2,48326
GSK 2.5 ETO 150	-18,1	2,13067	-8,49498	2,02105E-4	0,05	1	-27,67674	-8,52326
GSK 2.5 ETO 200	-19,095	2,13067	-8,96197	1,20163E-4	0,05	1	-28,67174	-9,51826
GSK 2.5 ETO 250	-22,05	2,13067	-10,34886	2,88344E-5	0,05	1	-31,62674	-12,47326
ETO 100 GSK 2.5 K	18,85	2,13067	8,84699	1,36306E-4	0,05	1	9,27326	28,42674
ETO 100 GSK 2.5 DMSO	23,95	2,13067	11,2406	1,24908E-5	0,05	1	14,37326	33,52674
ETO 100 GSK 2.5 ETO 100	3,99	2,13067	1,87265	1	0,05	0	-5,58674	13,56674
ETO 100 GSK 2.5 ETO 150	-2,05	2,13067	-0,96214	1	0,05	0	-11,62674	7,52674
ETO 100 GSK 2.5 ETO 200	-3,045	2,13067	-1,42913	1	0,05	0	-12,62174	6,53174
ETO 100 GSK 2.5 ETO 250	-6	2,13067	-2,81602	0,92328	0,05	0	-15,57674	3,57674
ETO 100 GSK 2.5 GSK 2.5	16,05	2,13067	7,53285	6,33607E-4	0,05	1	6,47326	25,62674
ETO 150 GSK 2.5 K	27,8	2,13067	13,04755	2,69459E-6	0,05	1	18,22326	37,37674
ETO 150 GSK 2.5 DMSO	32,9	2,13067	15,44116	4,61808E-7	0,05	1	23,32326	42,47674
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	12,94	2,13067	6,07321	0,00442	0,05	1	3,36326	22,51674
ETO 150 GSK 2.5 ETO 150	6,9	2,13067	3,23842	0,43429	0,05	0	-2,67674	16,47674
ETO 150 GSK 2.5 ETO 200	5,905	2,13067	2,77143	0,99992	0,05	0	-3,67174	15,48174
ETO 150 GSK 2.5 ETO 250	2,95	2,13067	1,38454	1	0,05	0	-6,62674	12,52674

ETO 150 GSK 2.5 GSK 2.5	25	2,13067	11,7334	6,05735E-6	0,05	1	15,42326	34,57674
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	8,95	2,13067	4,20056	0,08163	0,05	0	-0,62674	18,52674
ETO 200 GSK 2.5 K	24,85	2,13067	11,663	8,56971E-6	0,05	1	15,27326	34,42674
ETO 200 GSK 2.5 DMSO	29,95	2,13067	14,05662	1,23946E-6	0,05	1	20,37326	39,52674
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	9,99	2,13067	4,68867	0,03642	0,05	1	0,41326	19,56674
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	3,95	2,13067	1,85388	1	0,05	0	-5,62674	13,52674
ETO 200 GSK 2.5 ETO 200	2,955	2,13067	1,38689	1	0,05	0	-6,62174	12,53174
ETO 200 GSK 2.5 ETO 250	0	2,13067	0	1	0,05	0	-9,57674	9,57674
ETO 200 GSK 2.5 GSK 2.5	22,05	2,13067	10,34886	2,88344E-5	0,05	1	12,47326	31,62674
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	6	2,13067	2,81602	0,92328	0,05	0	-3,57674	15,57674
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	-2,95	2,13067	-1,38454	1	0,05	0	-12,52674	6,62674
ETO 250 GSK 2.5 K	27,85	2,13067	13,07101	2,64477E-6	0,05	1	18,27326	37,42674
ETO 250 GSK 2.5 DMSO	32,95	2,13067	15,46463	4,54466E-7	0,05	1	23,37326	42,52674
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	12,99	2,13067	6,09668	0,00428	0,05	1	3,41326	22,56674
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	6,95	2,13067	3,26189	0,41655	0,05	0	-2,62674	16,52674
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	5,955	2,13067	2,7949	0,95882	0,05	0	-3,62174	15,53174
ETO 250 GSK 2.5 ETO 250	3	2,13067	1,40801	1	0,05	0	-6,57674	12,57674
ETO 250 GSK 2.5 GSK 2.5	25,05	2,13067	11,75687	7,89403E-6	0,05	1	15,47326	34,62674
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	9	2,13067	4,22403	0,07847	0,05	0	-0,57674	18,57674
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	0,05	2,13067	0,02347	1	0,05	0	-9,52674	9,62674
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	3	2,13067	1,40801	1	0,05	0	-6,57674	12,57674

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.

Ek 5(48 Saat Annexin İstatik Analizleri)

ANOVAOneWay (24.01.2022 21:13:04)

Descriptive Statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
K	2	0	15,85	0,77782	0,55
DMSO	2	0	14,65	0,77782	0,55
ETO 100	2	0	50,85	1,20208	0,85
ETO 150	2	0	58,005	0,71418	0,505
ETO 200	2	0	62,59	0,83439	0,59
ETO 250	2	0	67,3	0,84853	0,6
GSK 2.5	2	0	17,9	0,70711	0,5
ETO 100 GSK 2.5	2	0	60,05	0,6364	0,45
ETO 150 GSK 2.5	2	0	65	0,98995	0,7
ETO 200 GSK 2.5	2	0	65,75	0,77782	0,55
ETO 250 GSK 2.5	2	0	72,5	0,70711	0,5

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	10	10098,30525	1009,83052	1467,14687	1,05699E-15
Error	11	7,57125	0,6883		
Total	21	10105,8765			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99925	0,01658	0,82964	50,04045

Means Comparisons

Bonferroni Test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
DMSO K	-1,2	0,82964	-1,44642	1	0,05	0	-4,92897	2,52897
ETO 100 K	35	0,82964	42,18719	8,88867E-12	0,05	1	31,27103	38,72897
ETO 100 DMSO	36,2	0,82964	43,63361	6,14716E-12	0,05	1	32,47103	39,92897
ETO 150 K	42,155	0,82964	50,81146	1,16E-12	0,05	1	38,42603	45,88397
ETO 150 DMSO	43,355	0,82964	52,25787	8,52858E-13	0,05	1	39,62603	47,08397
ETO 150 ETO 100	7,155	0,82964	8,62427	1,74635E-4	0,05	1	3,42603	10,88397
ETO 200 K	46,74	0,82964	56,33798	3,74082E-13	0,05	1	43,01103	50,46897
ETO 200 DMSO	47,94	0,82964	57,7844	2,83296E-13	0,05	1	44,21103	51,66897
ETO 200 ETO 100	11,74	0,82964	14,15079	1,15579E-6	0,05	1	8,01103	15,46897
ETO 200 ETO 150	4,585	0,82964	5,52652	0,00984	0,05	1	0,85603	8,31397
ETO 250 K	51,45	0,82964	62,01517	1,30507E-13	0,05	1	47,72103	55,17897
ETO 250 DMSO	52,65	0,82964	63,46159	1,01339E-13	0,05	1	48,92103	56,37897
ETO 250 ETO 100	16,45	0,82964	19,82798	3,22474E-8	0,05	1	12,72103	20,17897
ETO 250 ETO 150	9,295	0,82964	11,20371	1,2916E-5	0,05	1	5,56603	13,02397
ETO 250 ETO 200	4,71	0,82964	5,67719	0,00786	0,05	1	0,98103	8,43897
GSK 2.5 K	2,05	0,82964	2,47096	1	0,05	0	-1,67897	5,77897
GSK 2.5 DMSO	3,25	0,82964	3,91738	0,1322	0,05	0	-0,47897	6,97897
GSK 2.5 ETO 100	-32,95	0,82964	-39,71623	1,71964E-11	0,05	1	-36,67897	-29,22103
GSK 2.5 ETO 150	-40,105	0,82964	-48,34049	2,00278E-12	0,05	1	-43,83397	-36,37603
GSK 2.5 ETO 200	-44,69	0,82964	-53,86701	6,11666E-13	0,05	1	-48,41897	-40,96103
GSK 2.5 ETO 250	-49,4	0,82964	-59,5442	2,03866E-13	0,05	1	-53,12897	-45,67103
ETO 100 GSK 2.5 K	44,2	0,82964	53,27639	6,90236E-13	0,05	1	40,47103	47,92897
ETO 100 GSK 2.5 DMSO	45,4	0,82964	54,72281	5,14603E-13	0,05	1	41,67103	49,12897
ETO 100 GSK 2.5 ETO 100	9,2	0,82964	11,0892	1,4339E-5	0,05	1	5,47103	12,92897
ETO 100 GSK 2.5 ETO 150	2,045	0,82964	2,46494	1	0,05	0	-1,68397	5,77397
ETO 100 GSK 2.5 ETO 200	-2,54	0,82964	-3,06158	0,59517	0,05	0	-6,26897	1,18897
ETO 100 GSK 2.5 ETO 250	-7,25	0,82964	-8,73877	1,53652E-4	0,05	1	-10,97897	-3,52103
ETO 100 GSK 2.5 GSK 2.5	42,15	0,82964	50,80543	1,16151E-12	0,05	1	38,42103	45,87897
ETO 150 GSK 2.5 K	49,15	0,82964	59,24287	2,15533E-13	0,05	1	45,42103	52,87897
ETO 150 GSK 2.5 DMSO	50,35	0,82964	60,68929	1,65425E-13	0,05	1	46,62103	54,07897
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	14,15	0,82964	17,05568	1,61063E-7	0,05	1	10,42103	17,87897
ETO 150 GSK 2.5 ETO 150	6,995	0,82964	8,43141	2,17294E-4	0,05	1	3,26603	10,72397
ETO 150 GSK 2.5 ETO 200	2,41	0,82964	2,90489	0,78756	0,05	0	-1,31897	6,13897
ETO 150 GSK 2.5 ETO 250	-2,3	0,82964	-2,7723	0,99837	0,05	0	-6,02897	1,42897

ETO 150 GSK 2.5 GSK 2.5	47,1	0,82964	50,7719	3,43697E-13	0,05	1	43,37103	50,82897
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	4,95	0,82964	5,96647	0,00515	0,05	1	1,22103	8,67897
ETO 200 GSK 2.5 K	49,9	0,82964	60,14688	1,82545E-13	0,05	1	46,17103	53,62897
ETO 200 GSK 2.5 DMSO	51,1	0,82964	61,5933	1,40656E-13	0,05	1	47,37103	54,82897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	14,9	0,82964	17,95969	9,2933E-8	0,05	1	11,17103	18,62897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	7,745	0,82964	9,33542	8,048E-5	0,05	1	4,01603	11,47397
ETO 200 GSK 2.5 ETO 200	3,16	0,82964	3,8089	0,15941	0,05	0	-0,56897	6,88897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 250	-1,55	0,82964	-1,86829	1	0,05	0	-5,27897	2,17897
ETO 200 GSK 2.5 GSK 2.5	47,85	0,82964	57,67591	2,89195E-13	0,05	1	44,12103	51,57897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	5,7	0,82964	6,87049	0,00148	0,05	1	1,97103	9,42897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	0,75	0,82964	0,90401	1	0,05	0	-2,97897	4,47897
ETO 250 GSK 2.5 K	56,65	0,82964	68,28298	4,53708E-14	0,05	1	52,92103	60,37897
ETO 250 GSK 2.5 DMSO	57,85	0,82964	69,7294	3,60455E-14	0,05	1	54,12103	61,57897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	21,65	0,82964	26,09579	1,66648E-9	0,05	1	17,92103	25,37897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	14,495	0,82964	17,47152	1,24652E-7	0,05	1	10,76603	18,22397
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	9,91	0,82964	11,945	6,70732E-6	0,05	1	6,18103	13,63897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 250	5,2	0,82964	6,26781	0,00336	0,05	1	1,47103	8,92897
ETO 250 GSK 2.5 GSK 2.5	54,6	0,82964	65,81202	6,79923E-14	0,05	1	50,87103	58,32897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	12,45	0,82964	15,00659	6,23923E-7	0,05	1	8,72103	16,17897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	7,5	0,82964	9,04011	1,10378E-4	0,05	1	3,77103	11,22897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	6,75	0,82964	8,1361	3,05919E-4	0,05	1	3,02103	10,47897

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.

Ek 6 (72 Saat Annexin İstatik Analizleri)

ANOVAOneWay (24.01.2022 21:13:04)

Descriptive Statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
K	2	0	15,85	0,77782	0,55
DMSO	2	0	14,65	0,77782	0,55
ETO 100	2	0	50,85	1,20208	0,85
ETO 150	2	0	58,005	0,71418	0,505
ETO 200	2	0	62,59	0,83439	0,59
ETO 250	2	0	67,3	0,84853	0,6
GSK 2.5	2	0	17,9	0,70711	0,5
ETO 100 GSK 2.5	2	0	60,05	0,6364	0,45
ETO 150 GSK 2.5	2	0	65	0,98995	0,7
ETO 200 GSK 2.5	2	0	65,75	0,77782	0,55
ETO 250 GSK 2.5	2	0	72,5	0,70711	0,5

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	10	10098,30525	1009,83052	1467,14687	1,05699E-15
Error	11	7,57125	0,6883		
Total	21	10105,8765			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
0,99925	0,01658	0,82964	50,04045

Means Comparisons

Bonferroni Test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
DMSO K	-1,2	0,82964	-1,44642	1	0,05	0	-4,92897	2,52897
ETO 100 K	35	0,82964	42,18719	8,88867E-12	0,05	1	31,27103	38,72897
ETO 100 DMSO	36,2	0,82964	43,63361	6,14716E-12	0,05	1	32,47103	39,92897
ETO 150 K	42,155	0,82964	50,81146	1,16E-12	0,05	1	38,42603	45,88397
ETO 150 DMSO	43,355	0,82964	52,25787	8,52858E-13	0,05	1	39,62603	47,08397
ETO 150 ETO 100	7,155	0,82964	8,62427	1,74635E-4	0,05	1	3,42603	10,88397
ETO 200 K	46,74	0,82964	56,33798	3,74082E-13	0,05	1	43,01103	50,46897
ETO 200 DMSO	47,94	0,82964	57,7844	2,83296E-13	0,05	1	44,21103	51,66897
ETO 200 ETO 100	11,74	0,82964	14,15079	1,15579E-6	0,05	1	8,01103	15,46897
ETO 200 ETO 150	4,585	0,82964	5,52652	0,00984	0,05	1	0,85603	8,31397
ETO 250 K	51,45	0,82964	62,01517	1,30507E-13	0,05	1	47,72103	55,17897
ETO 250 DMSO	52,65	0,82964	63,46159	1,01339E-13	0,05	1	48,92103	56,37897
ETO 250 ETO 100	16,45	0,82964	19,82798	3,22474E-8	0,05	1	12,72103	20,17897
ETO 250 ETO 150	9,295	0,82964	11,20371	1,2916E-5	0,05	1	5,56603	13,02397
ETO 250 ETO 200	4,71	0,82964	5,67719	0,00786	0,05	1	0,98103	8,43897
GSK 2.5 K	2,05	0,82964	2,47096	1	0,05	0	-1,67897	5,77897
GSK 2.5 DMSO	3,25	0,82964	3,91738	0,1322	0,05	0	-0,47897	6,97897
GSK 2.5 ETO 100	-32,95	0,82964	-39,71623	1,71964E-11	0,05	1	-36,67897	-29,22103
GSK 2.5 ETO 150	-40,105	0,82964	-48,34049	2,00278E-12	0,05	1	-43,83397	-36,37603
GSK 2.5 ETO 200	-44,69	0,82964	-53,86701	6,11666E-13	0,05	1	-48,41897	-40,96103
GSK 2.5 ETO 250	-49,4	0,82964	-59,5442	2,03866E-13	0,05	1	-53,12897	-45,67103
ETO 100 GSK 2.5 K	44,2	0,82964	53,27639	6,90236E-13	0,05	1	40,47103	47,92897
ETO 100 GSK 2.5 DMSO	45,4	0,82964	54,72281	5,14603E-13	0,05	1	41,67103	49,12897
ETO 100 GSK 2.5 ETO 100	9,2	0,82964	11,0892	1,4339E-5	0,05	1	5,47103	12,92897
ETO 100 GSK 2.5 ETO 150	2,045	0,82964	2,46494	1	0,05	0	-1,68397	5,77397
ETO 100 GSK 2.5 ETO 200	-2,54	0,82964	-3,06158	0,59517	0,05	0	-6,26897	1,18897
ETO 100 GSK 2.5 ETO 250	-7,25	0,82964	-8,73877	1,53652E-4	0,05	1	-10,97897	-3,52103
ETO 100 GSK 2.5 GSK 2.5	42,15	0,82964	50,80543	1,16151E-12	0,05	1	38,42103	45,87897
ETO 150 GSK 2.5 K	49,15	0,82964	59,24287	2,15533E-13	0,05	1	45,42103	52,87897
ETO 150 GSK 2.5 DMSO	50,35	0,82964	60,68929	1,65425E-13	0,05	1	46,62103	54,07897
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	14,15	0,82964	17,05568	1,61063E-7	0,05	1	10,42103	17,87897
ETO 150 GSK 2.5 ETO 150	6,995	0,82964	8,43141	2,17294E-4	0,05	1	3,26603	10,72397
ETO 150 GSK 2.5 ETO 200	2,41	0,82964	2,90489	0,78756	0,05	0	-1,31897	6,13897
ETO 150 GSK 2.5 ETO 250	-2,3	0,82964	-2,7723	0,99837	0,05	0	-6,02897	1,42897

ETO 150 GSK 2.5 GSK 2.5	47,1	0,82964	59,7719	3,43697E-13	0,05	1	43,37103	59,82897
ETO 150 GSK 2.5 ETO 100	4,95	0,82964	5,96647	0,00515	0,05	1	1,22103	8,67897
ETO 200 GSK 2.5 K	49,9	0,82964	60,14688	1,82545E-13	0,05	1	46,17103	53,62897
ETO 200 GSK 2.5 DMSO	51,1	0,82964	61,5933	1,40656E-13	0,05	1	47,37103	54,82897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	14,9	0,82964	17,95969	9,2933E-8	0,05	1	11,17103	18,62897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	7,745	0,82964	9,33542	8,048E-5	0,05	1	4,01603	11,47397
ETO 200 GSK 2.5 ETO 200	3,16	0,82964	3,8089	0,15941	0,05	0	-0,56897	6,88897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 250	-1,55	0,82964	-1,86829	1	0,05	0	-5,27897	2,17897
ETO 200 GSK 2.5 GSK 2.5	47,85	0,82964	57,67591	2,89195E-13	0,05	1	44,12103	51,57897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 100	5,7	0,82964	6,87049	0,00148	0,05	1	1,97103	9,42897
ETO 200 GSK 2.5 ETO 150	0,75	0,82964	0,90401	1	0,05	0	-2,97897	4,47897
ETO 250 GSK 2.5 K	56,65	0,82964	68,28298	4,53708E-14	0,05	1	52,92103	60,37897
ETO 250 GSK 2.5 DMSO	57,85	0,82964	69,7294	3,60455E-14	0,05	1	54,12103	61,57897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	21,65	0,82964	26,09579	1,66648E-9	0,05	1	17,92103	25,37897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	14,495	0,82964	17,47152	1,24652E-7	0,05	1	10,76603	18,22397
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	9,91	0,82964	11,945	6,70732E-6	0,05	1	6,18103	13,63897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 250	5,2	0,82964	6,26781	0,00336	0,05	1	1,47103	8,92897
ETO 250 GSK 2.5 GSK 2.5	54,6	0,82964	65,81202	6,79923E-14	0,05	1	50,87103	58,32897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 100	12,45	0,82964	15,00659	6,23923E-7	0,05	1	8,72103	16,17897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 150	7,5	0,82964	9,04011	1,10378E-4	0,05	1	3,77103	11,22897
ETO 250 GSK 2.5 ETO 200	6,75	0,82964	8,1361	3,05919E-4	0,05	1	3,02103	10,47897

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.
Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.