



AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

1

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE
ARID1A VE EZH2 ARASINDA
SENTETİK LETAL İNTERAKSİYON
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

AKINCAN KOLUMAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. MEHTAP KILIÇ EREN

AYDIN - 2024

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE ARID1A VE EZH2
ARASINDA SENTETİK LETAL İNTERAKSİYON İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

AKINCAN KOLUMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

TPF-23021 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2024

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Akıncan KOLUMAN tarafından hazırlanan “Akut Lenfoblastik Lösemide ARID1A ve EZH2 Arasında Sentetik Letal İnteraksiyon İlişkisinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/11/2024

Üye : Prof. Dr. Mehta KILIÇ EREN Aydın Adnan Menderes
(T.D.) Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ali ÖZMEN Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI Ankara Yıldırım Beyazıt
Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan no’lu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yol gösterici ve çalışmalarımı destekleyen değerli ve saygıdeğer danışman hocam Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e teşekkürlerimi sunarım.

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

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

Tezimin her aşamasında ve her durumda yardım ederek, bilgi birikimlerini esirgmeden bana destek olan saygı değer Tez süresi boyunca desteklerini hep hissettiğim sevgili laboratuvar arkadaşlarım Ayfer KARLITEPE'ye, Ceylan AK'a, Hatice PİLEVNELİ'ye, Fevziye ÖZDEMİR ŞİMŞEK'e ve Hayrettin ÇANAKÇI'ya destekleri için teşekkür ederim.

Hayatımın önemli bir kısmını oluşturan ve her konuda desteklerini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Nur Sevim KALKAN'a, Muhammed Ali ÇINAR'a ve Alparslan CAYIK'a teşekkür ederim

Aldığım her karar da beni destekleyip asla ayrı yolda bırakmayan, beni motive edip sonsuz sevgilerini hissettiğim babam Aledin KOLUMAN'a, annem Ayfer KOLUMAN'a ve abim Atakan KOLUMAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamı TPF-23021' Nolu proje ile destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar	vi
ŞEKİLLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	14
2. GENEL BİLGİLER.....	17
2.1. Kanser	17
2.1.1. Lösemi ve Sınıflandırılması.....	17
2.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi	18
2.2. ARID1A	19
2.3. EZH2.....	21
2.4. Sentetik Letalite	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	23
3.1. Gereç.....	23
3.1.1. Hücreler.....	23

3.1.2. Çalışma Kimyasalları.....	23
3.1.3. Kullanılan antikorlar	24
3.1.4. Kullanılan Sarf malzemeleri.....	25
3.1.5. Kullanılan Cihazlar	25
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Hücre Kültürü.....	26
3.2.2. Dondurma.....	26
3.2.3. Çözdürme	27
3.2.4. Sayım	28
3.2.5. GSK2816126 (GSK126) Stoklarının Hazırlanması	29
3.2.6. Hücre Testleri.....	30
3.2.6.1. Jurkat Hücresinin Çalışmalara Hazırlanması	30
3.2.6.2. Jurkat Hücresi ve WST-1	31
% Canlılık = (İLAÇ / KONTROL) x 100	31
3.2.6.3. Apoptoz Analizi.....	32
3.2.6.4. Hücre Döngüsü	32
3.2.7. Western Blot.....	33
Bu çalışma için proteinler izolasyonu ardından miktarlarının hesaplanması gerekmektedir.....	33
3.2.7.1.1. İzolasyon	33
3.2.7.1.2. Protein Miktar Tayini.....	34
3.2.7.1.3. SDS-PAGE, Transfer ve Görüntüleme	35

3.2.8. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi	43
4. BULGULAR	44
4.1. WST-1 Testi Bulguları.....	44
4.2. Annexin-V Testi	47
4.4. Western Blot Analizi ile Jurkat Hücrelerinde GKS126 Kullanılarak EZH2 ve H3K27me3 Etkilerinin Belirlenmesi.....	53
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
7. KAYNAKÇA	66
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	69
ÖZ GEÇMİŞ	70

TABLÖLAR

Tablo 1. Kimyasal ve besiyeri maddelerinin listesi	24
Tablo 2. Çalışmalar sırasında kullanılan antikorlar	24
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemelerin listesi.....	25
Tablo 4. Çalışmada ki cihazların listesi.....	25
Tablo 6. Ayırıcı jel bileşenleri ve miktarları.....	39
Tablo 7. Paketleyici jel bileşenleri ve miktarları	40
Tablo 8. İmmunoblotlamada kullanılan birincil antikorların spesifitesi, firma bilgileri ve dilüsyon oranları.....	42
Tablo 9. İmmunoblotlamada kullanılan ikincil antikorların ürün kodu, firma bilgileri ve dilüsyon oranları.....	42

ŞEKİLLER

Şekil 1. Dünya Sağlık Örgütü Kanser İnsidans Oranları	15
Şekil 2. SWI/SNF bağımlı kromatin yeniden modellenmesinin diyagramı.....	19
Şekil 3. ARID1A protein yapısının şematik gösterimi	20
Şekil 4. Polycomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2) yapısı.....	21
Şekil 5. GSK2816126'nın açık kimyasal formülü.....	22
Şekil 6. Neuber lamının mikroskop altındaki temsili görünüşü	29
Şekil 7. Jurkat hücrelerinde 24 saat GSK126 uygulaması, WST-1 analizi sonuçları.....	44
Şekil 8. Jurkat hücrelerinde 72 saat GSK126 uygulaması, WST-1 analizi sonuçları.....	45
Şekil 9. Jurkat hücrelerinde 120 saat GSK126 uygulaması, WST-1 analizi sonuçları.....	46
Şekil 10. 24 saat muamele edilen hücrelerin apoptotik değişimi	47
Şekil 11. 72 saatlik muamele edilen hücrelerin apoptotik değişimi	48
Şekil 12. 120 saatlik muamele edilen hücrelerin apoptotik değişimi	49
Şekil 13. Şekil 13'de grafiği gösterilen Jurkat Hücrelerinin Annexin V/7AAD verilerinin apoptoz profilleri.	50
Şekil 14. 24 saat muamele edilen hücreler	51
Şekil 15. 72 saat muamele edilen hücreler	52
Şekil 16. Jurkat hücre grubunda GSK126'nın 24 saatte WB sonuçları.....	54
ŞEKİL 17. 24 Saatte WB istatistik sonuçlarının densitometrik analizi.	55

Şekil 18. Jurkat hücre grubunda GSK126'nın 72 saatte WB sonuçları	56
Şekil 19. 72 Saatte WB istatistik sonuçlarının densitometrik analizi.	57
Şekil 20. Jurkat hücre grubunda GSK126'nın 120 saatte WB sonuçları	58
Şekil 21. 120 Saatte WB istatistik sonuçlarının densitometrik analizi.	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
FBS	: Fetal bovin serum
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz
mRNA	: Mesajcı RNA
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
U.V.	: Ultraviole ışık
Wst-1	: Water-soluble tetrazolium tuzu
GSK2816126	:GSK126
ATP	: Adenozin trifosfat
BAF	: Bromo ilişkili faktör

ÖZET

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE ARID1A VE EZH2 ARASINDA SENTETİK LETAL İNTERAKSİYON İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Koluman A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2024.

Amaç: SWI/SNF kompleksi; kromatinin yeniden modellenmesini sağlayan proteinleri kodlayan genlerdir. İnsanlarda izlenen kanser türlerinde bu genler çoğunlukla mutasyona uğrarlar. SWI/SNF kompleksinin önemli bir alt birimi ARID1A'dır. ARID1A DNA'ya bağlanır ve SWI/SNF kompleksinin yeniden modellenmesi gereken kromatin konumuna hedeflenmesini sağlar. Kanser türlerinde yapılan genom çalışmalarında, sıklıkla ARID1A mutasyonu belirlenmiştir. Bununla beraber mtARID1A kanserlerde yapılmış olan çalışmalarda güvenlik açığı niteliğini taşıyan genlerin hedeflenmesi tipik olarak sentetik letaliteye neden olabilmektedir. Polycomb baskılayıcı kompleks 2'nin katalitik alt birimi olan EZH2, histon metilasyonunun ve transkripsiyonunun baskılanmasını sağlamaktadır. mtARID1A aracılığı ile SWI/SNF işlev bozuklukları, kromatin üzerindeki Polycomb aktivasyonunu kolaylaştırarak hücrelerin EZH2 inhibisyonuna karşı duyarlı hale getirmesini sağlar. Bu çalışmada kullanılan Jurkat hücrelerinde ARID1A'da çerçeve kayması mutasyonu bulunmaktadır ve EZH2'nin bir inhibitör ile inhibe edilmesiyle sentetik letalite etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. **Metot:** GSK2816126 ile Jurkat hücrelerinde EZH2'nin inhibe edilmesi sağlandı. Hücrenin metabolik aktivasyonu (hücre canlılığını) ölçmek için WST-1 analizi, apoptozis ve nekroz ölçümü için Annexin V/7AAD testi ve hücre döngüsü arrestlerini tespit etmek için hücre döngüsü analizleri yapılmıştır. Western Blot analizi ile ARID1A, EZH2, H3K27me3, total H3 ve GAPDH protein seviyeleri gösterildi.

Bulgular: Jurkat hücrelerinin GSK2816126 ile muamelesi sonucu EZH2'nin inhibisyonu H3K27me3'ün WB analizi ile protein seviyesinde görülen azalma ile tespit edilmiştir. Jurkat hücrelerinde GSK2816126 ile EZH2'nin inhibisyonu zamana ve dozlara bağlı olarak hücre canlılığını azalttı ve apoptozu indükledi. 10 µM GSK2816126 muamelesi Jurkat hücrelerinde

120 saatin sonunda hücre canlılığını %60 oranında azalttığı ve apoptozun indüklendiği tespit edilmiştir. Jurkat hücrelerinde GSK2816126 muamelesi sonrası 24 saatte G0/G1 evresinde arrest olduğu hücre döngüsü testi ile tespit edilmiştir.

Sonuç: mtARID1A olarak bulunan Jurkat hücrelerinde GSK2816126 ile EZH2'nin inhibe edilmesi apoptoz aracılığı ile sentetik letal etkiye yol açmaktadır. Bu sonuçlar ışığında ARID1A defektif Akut Lenfoblastik Lösemide EZH2'nin terapötik bir potansiyel hedef olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: ARID1A, EZH2, Jurkat, Sentetik Letalite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SYNTHETIC LETHAL INTERACTION BETWEEN ARID1A AND EZH2 IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Koluman A. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Medical Biology Program, Master's Thesis, Aydın, 2024.

Objective: The SWI/SNF complex is composed of genes encoding proteins that enable chromatin remodeling. These genes are often mutated in human cancers. An important subunit of the SWI/SNF complex is ARID1A. ARID1A binds to DNA and allows the SWI/SNF complex to be targeted to the chromatin location that needs to be remodeled. In genome studies of cancer types, ARID1A mutations are frequently identified. However, targeting vulnerable genes in studies of *mtARID1A* cancers typically leads to synthetic lethality. EZH2, the catalytic subunit of Polycomb repressor complex 2, represses histone methylation and transcription. ARID1A-mediated SWI/SNF dysfunction facilitates Polycomb activation on chromatin, sensitizing cells to EZH2 inhibition. The Jurkat cells used in this study have a frameshift mutation in ARID1A, and we aim to investigate the synthetic lethality effects of inhibiting EZH2 with an inhibitor.

Methods: GSK2816126 was used to inhibit EZH2 in Jurkat cells. WST-1 assay was performed to measure cell metabolic activation (cell viability), Annexin V/7AAD assay to measure apoptosis and necrosis, and cell cycle analysis to detect cell cycle arrest. Western blot analysis showed ARID1A, EZH2, H3K27me3, total H3, and GAPDH protein levels.

Results: EZH2 inhibition by GSK2816126 treatment in Jurkat cells was detected by a decrease in the protein level of H3K27me3. EZH2 inhibition in Jurkat cells decreases cell viability and induces apoptosis in a time- and dose-dependent manner. 10 μ M GSK2816126 treatment decreased cell viability by an average of 60% and induced apoptosis after 120 hours.

Conclusion: Inhibition of EZH2 by GSK2816126 in Jurkat cells with mtARID1A leads to synthetic lethal effects via apoptosis. These results suggest that EZH2 may be a potential therapeutic target in ARID1A-defective acute lymphoblastic leukemia.

Keywords: ARID1A, EZH2, Jurkat , Synthetic Lethalit

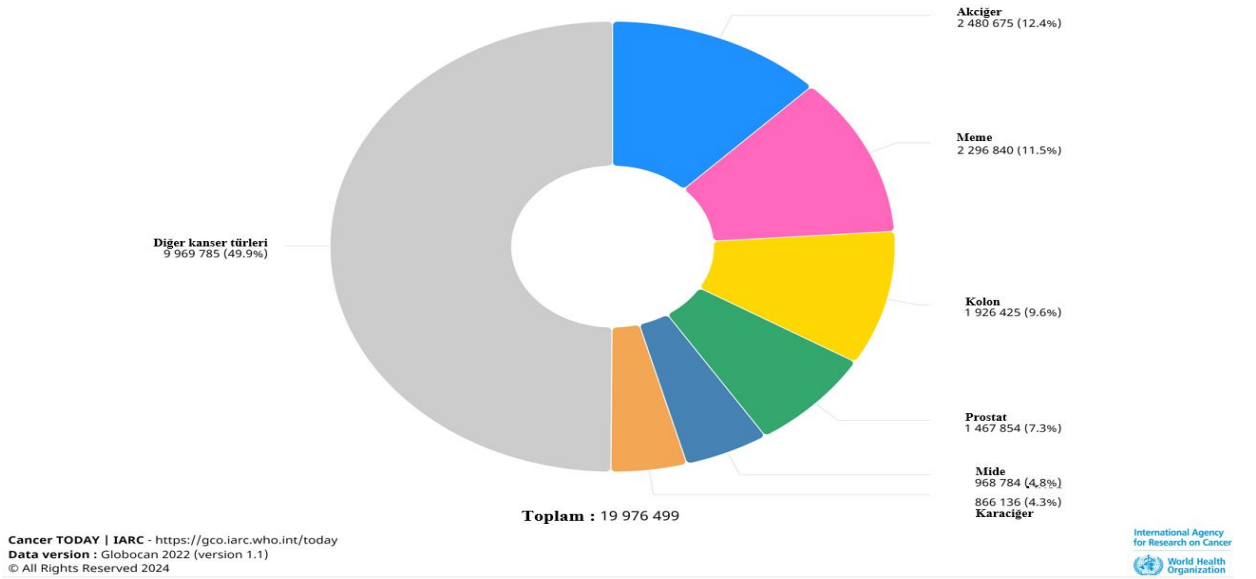
1. GİRİŞ

Çağımızın en büyük problemlerinden biri olan ve birçok farklı nedenden kaynaklı kendini gösterebilen, sınırsız ve kontrolsüz hücre bölünmesi ile bulunduğu canlıya farklı boyutlarda zararlar verebilen kanser hastalığı, insanlığın birçok farklı şekilde çözüm aradığı bir hastalık türüdür. Normal ve sağlıklı bir birey normal bir günde büyüme, gelişme, yenilenme ve üreme gibi faaliyetlerini düzgün bir şekilde ortaya koyabilmek için yenilenen hücrelere ihtiyaç duyar. Vücudumuz bu yeni hücreleri mitoz bölünme ile gerçekleştirir ve gerekli bölgelerde yeni hücre grupları yer alarak bu döngü devam eder. Bu döngü içerisinde hücrelerin bölünmeleri esnasında görev alan hücresel mekanizmalar bulunmaktadır. Bu kontrol mekanizmaları sayesinde kontrollü ve düzenli bir şekilde yeni hücreler meydana gelebilmektedir. Fakat kanser denilen anomali durumunda hücrelerin içerisindeki kontrol mekanizmaları farklı etkenlerden kaynaklı tam olarak görevlerini yerine getiremeyebilir. Bu tarz durumlarda hücreler kontrolsüz ve sınırsız bir şekilde büyüme durumuna gidebilmektedirler. Böyle bir durum meydana geldiğinde kontrolsüz çoğalmanın olduğu hücre topluluğuna kanser hücreleri adı verilmektedir. Kanser hücreleri çoğaldıkları yere göre isimlendirilebilmektedirler. Bulundukları organın veya sistemin adını alabilen kanser hücreleri, vücudun bütünlüğü ve düzeni için oldukça büyük tehlikelere neden olabilmekte ve eğer gerekli tedavi sağlanamaz ise ölüme kadar gidebilen etkilere neden olmaktadır.

Kanser, hücrelerin kontrolsüz ve aşırı bölünerek çoğalmasıdır. Bu durumda kalan hücreleri immün sistem yakalayamaz, uzak doku ve organlara yayılarak (metastaz) yayıldıkları kısımlarda klonlaşarak çoğalmaya devam ederler (Do, J.T., ve Scholer, H.R. 2004). Kanserlerin sınıflandırılması kökenlendikleri hücre ve/veya dokulara uyumlu olacak şekilde sınıflandırılır. Sarkoma; bağ- kas dokusundan köken alan kanser çeşididir. Karsinoma; epitel hücrelerden köken alan kanser çeşididir. Lösemi hematopoietik hücrelerden kökenlenen kanser çeşididir (Alberts B L ve diğerleri 2002).

Lösemi; hematopoetik kök hücrelerden kökenlenir alır. Hematopoetik kök hücrelerin alt sınıflarına göre miyeloid lösemi ve lenfoid lösemi olarak iki gruba ayrılmaktadır (Shiffman F 1998; Lanzkowsy P 1999). Akut lenfoblastik lösemi; lenfoif progenitor hücrelerin transformesi ile yetişkin ve çocuk yaş grubunun büyük bir kısmını etkileyen bir kanserdir. Blast adı verilen immatür prekürsor hematopoietik elemanların aşırı çoğalması ile ortaya çıkar. Akut lenfoblastik lösemi, B-ALL ve T-ALL olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu alanda yapılan çalışmalar neticesinde B-ALL'ler hakkında bilinenler T-ALL'den daha çoktur (Poplack DG ve diğerleri 1997; Niemeyer CY ve diğerleri 1993; Bennet JM ve diğerleri 1976). Sentetik letalite, Sentetik letalite: en az iki veya daha fazla genin inaktivasyonu ile hücre ölümünün gerçekleştiği bir durumdur. Sentetik letal tedavi, son yılların kanser için en etkili çaresi olarak görülen sentetik letal etki, bir tedavi olarak değerlendirilmektedir (Topatana ve diğerleri, 2020). Akut lenfoblastik lösemili çocuk bir hastadan elde edilen Jurkat hücrelerinde ARID1A mutant olarak bulunur. Bu çalışmanın amacı, ARID1A mutant olarak bulunan Jurkat hücre hattında EZH2 doğru bir terapötik hedef olarak değerlendirilerek GSK126 ile inhibe edilerek sentetik letal etkisinin araştırılmasıdır.

2022 Yılı Dünya Kanser İnsidans Oranları



Şekil 1. Dünya Sağlık Örgütü Kanser İnsidans Oranları
(https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1)

2022 yılı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünya çapında toplamda 20 milyona yakın kayıtlı hasta kansere yakalanmış durumdadır. Bu da bu hastalığın ulaştığı boyutu gözler önüne sermektedir. Kanserin dünya çapındaki yayılımı göz önüne alındığında oldukça dikkat edilmesi gereken ve tedavisi için büyük emekler harcanması gereken bir rahatsızlık olduğu açıkça görülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrol mekanizması olmadan ve aşırı bölünerek artış göstermesidir. Bu durumda kalan hücreleri immün sistem yakalayamaz, uzak doku ve organlara yayılarak (Do, J.T., and Scholer, H.R. (2004)) (metastaz) yayıldıkları kısımlarda klonlaşır (malign) (T). Kanserin sınıflandırılması köken aldıkları hücre veya doku gruplarına uyum olacak şekilde gerçekleştirilir. Örneğin bağ doku ve kas dokudan köken alarak gelişen kanser türüne sarkoma denirken, epitel hücrelerden köken alarak gelişen kanser türüne karsinoma denmektedir. Lösemi de ise hematopoietik hücrelerden köken alan kanser türlerinden biridir (Alberts B L ve diğerleri 2002). DNA’da meydana gelen modifikasyonlar genetik değişiklikler ile kanserin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bununla beraber insan genomunda bilinen genleri hedef alan epigenetik regülasyonlarla, DNA’yı sararak onu okuma, onarma ve kopyalama mekanizmaları ile DNA’ya erişilmesini düzenleyen kromatin yapının üç boyutlu konformasyonunun bozulması da bu modifikasyonlardan biridir (Croce, ve diğerleri 2008).

2.1.1. Lösemi ve Sınıflandırılması

Löseminin tanımı klinik tabloları ile beraber ilk defa 1826 yılında Velpau tanımlanmış daha sonra 1846 yılında Virchow, ileri safha lösemi ve aşırı lökositozu olan bir hastada “leukemia” kelimesini kullanarak tanımlamıştır. 1870 yılına geldiğinde löseminin kemik iliğini tutan bir hastalık olduğu Neuman tarafından belirlenmiştir (Poplack DG ve diğerleri 1997). Hematopoietik kök hücrelerinden köken alan lösemi, normal miyeloid ya da lenfoid

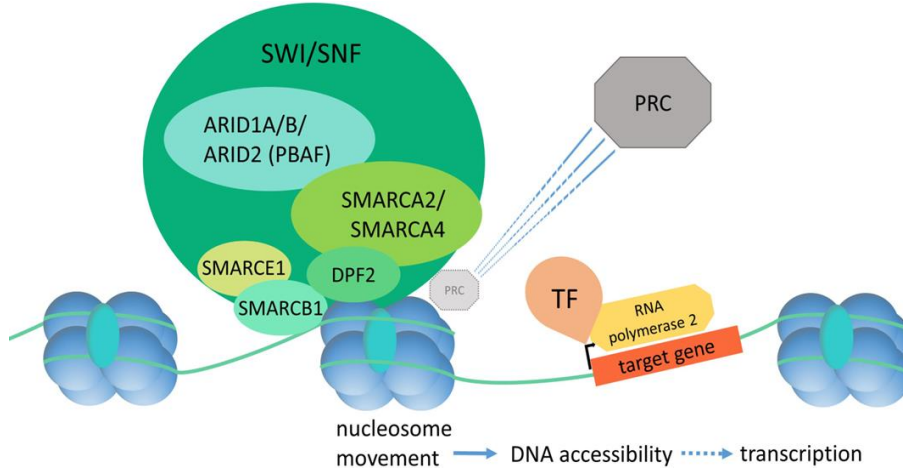
hematopoezin için spesifik bir aşamasında duraklama ve klonlaşma ile neoplastik hücrelerin kemik iliği ve diğer dokulara sıçrayarak periferel kanda birikimi ile karakterizedir. Hastalığın etiyojik değerdendirmeleri tamamen bilinmemek ile beraber viral ajanlar, radyasyon, genetik faktörler ve kimyasal maddelerin büyük ölçüde etkili olduğu ve tedavi edilmediğinde ölüm ile sonuçlanan bir hastalıktır. Lösemi, lökosit ve ana hücrelerin vücudun çeşitli doku ve organlarına yayılarak kontrolsüzce çoğalması ile meydana gelir (Shiffman F 1998).

2.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi

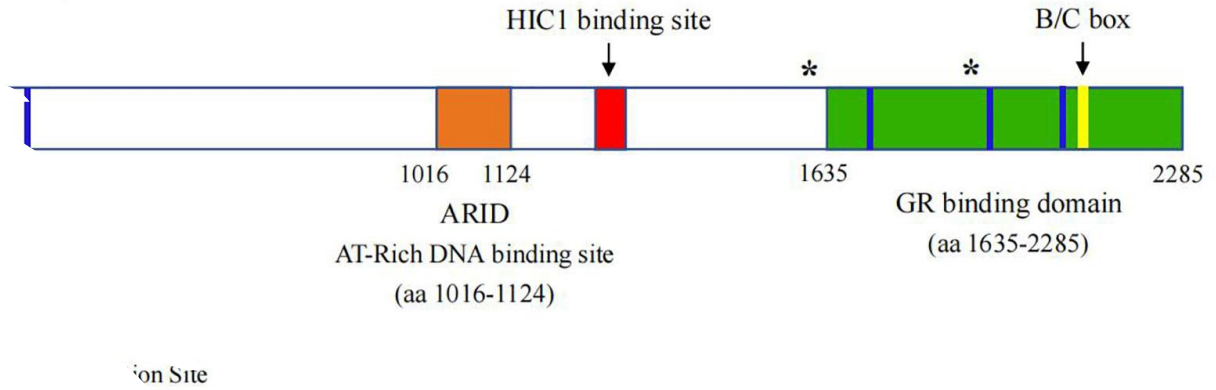
Lösemi, hematopoetik kök hücrelerden köken alır. Miyeloid ve lenfoid olmak üzere iki gruba ayrılan lösemi hematopoetik kök hücrelerden köken alır (Shiffman F 1998; Lankowsy P 1999). Akut lenfoblastik lösemi lenfoid progenitor hücrelerde tranformesi ile yetişkin ve çocuk yaştakilerin büyü bir kısmını etkileyen bir kanser türüdür.. Blast adı verilen immatür prekürsör hematopoetik elemanların artışı ile ortaya çıkabilmektedir. ALL, B-ALL ve T-ALL olmak üzere ikiye ayrılır. Bu alanda yapılan çalışmalar neticesinde B-ALL'ler hakkında bilinenler T-ALL'den daha fazladır (Poplack DG ve diğerleri 1997; Niemeyer CY ve diğerleri 1993). ALL immünolojik olarak 4 gruba ayrılır; erken pre-B hücreli ALL, pre-B hücreli ALL, B hücreli ALL ve T hücreli ALL'dir (Sklar J ve Weiss LM 1988). T-ALL, olgunlaşmamış T hücrelerinin malign bir çeşididir. 1 yaş altı ve 50 yaş üstünde sık görülmemesiyle beraber çocuk ve yetişkinlerde ALL'lerin 10-15%'ini oluşturur (Champlin R 1991). Bilinen tedaviler ile tedavi edilemeyen ve süre gereği tedavi edilemeyecek hastalarda kan yolu ile karaciğer ve dalak başta olmak üzere diğer organlara hızla yayılarak ölüm gerçekleşir (Hinds, P. Ve diğerleri 2004).

2.2. ARID1A

ARID1A kromatin yeniden şekillendirici özelliğe sahip bir gendir. ARID1A SWI/SNF kompleksinde yer alan en büyük BAF alt biriminde bulunur. SWI/SNF (SWI/SNF) kompleksleri, kromatin yapısının ATP'ye bağımlı yeniden şekillendiricileridir ve kromatini transkripsiyon faktörü bağlanması için daha erişilebilir hale getirir. SWI/SNF kompleksi çoğalma, farklılaşma, hasar onarımı, genomik kararsızlık gibi hücresel süreçlerde önemli rol oynar. SWI/SNF komplekslerinin üç formu vardır; Kanonikal BRG1/BRM ile ilişkili faktör (BAF), Polibromo ile ilişkili BAF (PBAF), Non-kanonikal BAF'ler (ncBAF'ler). ARID1A genellikle SWI/SNF komplekslerini güçlendiricilerini (enhancer) hedefler, böylece gen aktivasyonunu teşvik etmek için transkripsiyon faktörleri ile iş birliği yapar (Xu S ve Tang C 2021). ARID1A'nın yapısında N-terminal ARID alanı (AT zengin etkileşimli alan) ve üç LXXLL motifli C-terminali dahil olmak üzere iki korunmuş alan içerir. N-terminal ARID alanı; belirli hedefler için kromatine BAF afinitesini arttırmada çok önemli olduğu düşünülmektedir. LXXLL motifli C-terminali; çeşitli proteinler ve nükleer hormon reseptörleri arasındaki etkileşimi sağladığı tespit edilmiştir (Wu RC 2014).



Şekil 2. SWI/SNF bağımlı kromatin yeniden modellemesinin diyagramı (Bögershausen N. ve Wollnik B. 2018).

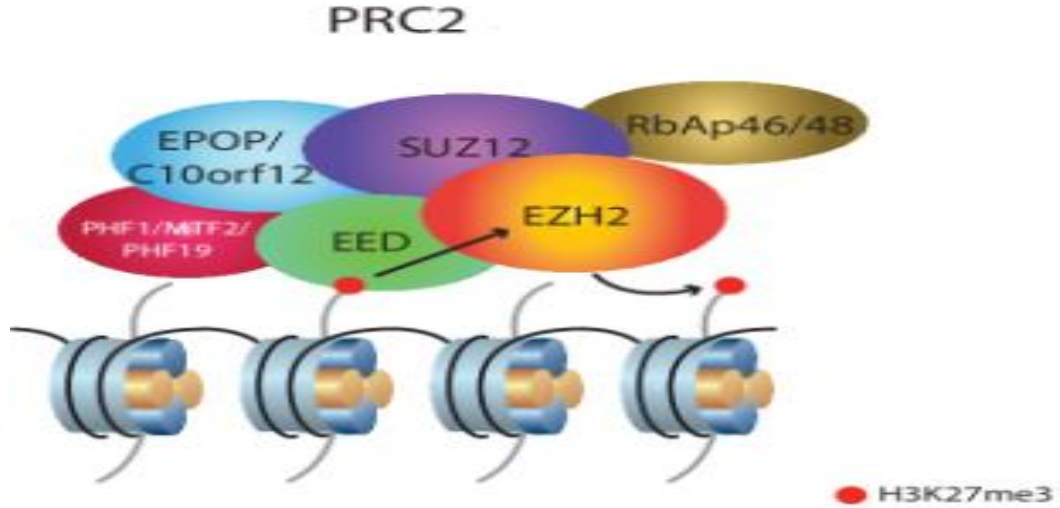


Şekil 3. ARID1A protein yapısının şematik gösterimi (Xu S. ve Tang C.; 2022).

ARID1A'nın mutasyonu sonucu; hepatosellüler karsinoma (10-17% ARID1A mutasyonu), yumurtalık berrak hücreli karsinomlar (%46-56 ARID1A mutasyonu), endometrioid adenokarsinomlar (47-60% ARID1A mutasyonu), kolon kanseri (%10 ARID1A mutasyonu) ve mide kanseri (10% ARID1A mutasyonu) gibi kanser türlerinde tümör supressör olarak karşımıza çıkmaktadır. Ek olarak, Pankreas kanseri (PC) olarak bilinen; pankreas duktal adenokarsinomunda, dünyada kadınlar özelinde kansere bağlı ölümlerin arasında 2. sırada yer alan meme kanserinde de ARID1A mutasyonu tümör supressör rolüyle karşımıza çıkmaktadır (Chang MT ve Asthana S 2016). ARID1A'nın insan kanserlerinde görülen diğer rolü ise onkogen rolüdür. ARID1A çeşitli kanser türlerinde farklı koşullarda duruma bağlı olarak onkogen gibi davranabilmektedir. Endometriyal kanserde birincil tümörler wild-type (yabanıl-tip) ARID1A'ya sahipken, metastatik alt klonlar zararlı mutasyonlar taşır, bu da birincil kanserlerin oluşumu için ARID1A'nın gerekli olabileceğini gösterir. Bu durum ARID1A'nın bu kanser türünde onkogen gibi davrandığını işaret etmektedir. Örneğin; ARID1A mutasyonlu Endometrial tümör numunelerinde erken fonksiyonel proteogenomik analizi, ARID1A mutasyonlarının sıklıkla PI3K yolağında gerçekleşen mutasyonlarla birlikte meydana geldiğini ve PI3K yolağı aktivasyonu ile ilişkili olduğunu gösterir. Kanser hücrelerinde PI3K önemli bir yolak olarak değerlendirilir (Liang H ve diğerleri 2012).

2.3. EZH2

Enhancer Zeste Homolog 2 (EZH2), histon-lizin N metiltransferaz enzimidir. Histon metilasyonunu ve transkripsiyonun baskılanmasını sağlar. EZH2, Polycomb Baskılayıcı Kompleks 2'nin (PRC2) katalitik alt birimidir. SWI/SNF kompleksi ve Polycomb baskılayıcı kompleksi arasında antagonistik bir ilişki bulunmaktadır. Bu iki kompleksin kromatin üzerinde zıt etkileri bulunmaktadır. SWI/SNF kompleksi, güçlendiricilerde (enhancerlarda) kromatin erişilebilirliğini artırırken Polycomb kompleksi kompakt kromatin oluşturur (Jemal A ve diğerleri 2010).



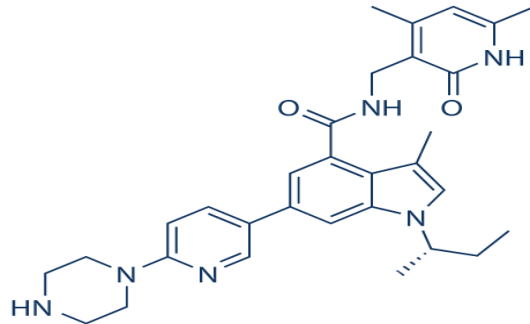
Şekil 4. Polycomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2) yapısı. Düzenleme işlevi ve zeste homolog 2 (EZH2) alanlarının arttırıcısının şematik diyagramı. PRC2 kompleksi EZH2, EED, SUZ12 ve RbAp46/48'i içeren dört çekirdek alt birim içerir. PRC2, EZH2 aracılı H3K27 trimetilasyonu yoluyla hedef genlerin transkripsiyonel represyonunu indükler (Huang J.;2021).

SWI/SNF işlevindeki defektler, kromatin üzerindeki Polycomb aktivitesini kolaylaştırır, böylece hücreleri EZH2 inhibisyonuna karşı duyarlı hale getirebilir. EZH2 metiltransferaz aktivitesinin inhibisyonunun ARID1A mutasyonlu hücrelerde sentetik letal bir etki gösterebilmektedir. EZH2'nin inhibisyonu, ARID1A mutasyonlarını içeren kanserler için yeni bir tedavi stratejisi geliştirmek için olanak sağlar (Knutson SK ve diğerleri 2012). Son yapılan

çalışmalarda EZH2'nin terapötik hedef olarak kullanıldığı kanser türleri arasında meme kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri ve T hücreli ALL vardır. EZH2'nin enzimatik aktivitesini baskılayan bazı kimyasallar yakın zamanda geliştirilmiştir. Bileşiklerin çoğu hala klinik öncesi geliştirme aşamasındadır ancak üç ajan (tazemetostat, GSK2816126 ve CPI-1205) faz I/II klinik denemelerine girmiştir (Shih AH ve Abdel-Wahab O 2012). ARID1A eksikliği olan OCCC'de, EZH2 metiltransferaz inhibitörlerinin, tümör taşıyan farelerde ARID1A-mutant yumurtalık tümör hücrelerinin çoğalmasına engel olarak sentetik letal bir şekilde etki ettiği bildirilmiştir (Bitler BG ve Aird KM, 2015). Bu çalışmada da ARID1A-mutant Jurkat hücre dizilerinde EZH2'yi hedefleyen inhibitör olarak GSK2816126 kullanılarak sentetik letalite etki incelenecektir.

2.4. Sentetik Letalite

Sentetik letalite; Hücresel süreçlerin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi için gerekli olan iki genden en az biri inaktive veya mutatt diğeri ise bir inhibitör ile inhibe edilmesidir (Lord ve diğerleri., 2015; Huang vd., 2020; Toy Y.,2022). Bu bağlamda, önemli hücresel yollarda görevli proteinlerin rollerinin karakterize edilmesi ve kanserli hücrelerinde bulunan mutasyonların tanımlanması, sentetik letal etkileşim gösterme potansiyeline sahip daha fazla terapötik hedefin ortaya çıkarılmasına neden olarak günümüz çalışmalarına ışık tutmaktadır.



Şekil 5. GSK2816126'nın açık kimyasal formülü.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Gereç

3.1.1. Hücreler

Bu tezin uygulama aşamasında laboratuvar da kullanılan hücreler ATCC tarafından sağlanmıştır.

3.1.2. Çalışma Kimyasalları

ÜRÜN	FİRMA
Tris-base	AppliChem
Glisin	ChemCruz®
Sodyum Dodesil Sülfat	BioShop®
Sodyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Potasyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Asetik Asit	Merc
Hidroklorik Asit (HCl)	Merc
Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)	SIGMA®
Gliserol	ChemCruz
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS),	SIGMA®
Merkaptoetanol	SIGMA®
Magnezyum (II) Klorür	SIGMA
Amonyum Persülfat	SIGMA
Bromfenol Blue	SIGMA-ALDRICH
Tween 20	SIGMA-ALDRICH
Skim Milk	Fluka®
Bowin Serum Albumin	ChemCruz
Sodyum Deoksikolat	SIGMA-ALDRICH

Sodyum Ortovanadat	SIGMA-ALDRICH
Proteaz İnhibitör Cocktail	Santa Cruz
Sodyum Hidroksit	SIGMA-ALDRICH®
RPMI 1640	Gibco
Fetal Bovin Serum (FBS)	ChemCruz
Penisilin Streptomisin	Gibco
GSK126	Cell Signal
Tetrametilendiamin (TEMED)	SIGMA
Akrilamid-bis (%40)	BIO-RAD
Etanol	SIGMA-ALDRICH
Metanol	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	SIGMA-ALDRICH
BCA-Assay Kit	Thermo Scientific
Western- ECL	BİO-RAD
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	ChemCruz
AnnexinV Muse Kit	Muse
Cell Cycle Muse Kit	Muse
DNA İzolasyon Kiti	QIAGEN

Tablo 1. Kimyasal ve besiyeri maddelerinin listesi

3.1.3. Kullanılan antikorlar

ÜRÜN	FİRMA
GAPDH	Proteintech
EZH2	SantaCruz
Anti-mouse IgG	SantaCruz
Anti-rabbit IgG	SantaCruz
H3K27me3	Cell Signal

Tablo 2. Çalışmalar sırasında kullanılan antikorlar

3.1.4. Kullanılan Sarf malzemeleri

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

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemelerin listesi

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

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

Tablo 4. Çalışmadaki cihazların listesi

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasının kültür laboratuvarı kısmında Jurkat adı verilen hücreler yer almaktadır. Jurkat hücreleri incelendiğinde büyüme özelliği olarak süspanse bir büyüme özelliği göstermektedirler. İnsan T lenfosit hücrelerinden elde edilmiş hücreler olup akut T lenfosit lösemi özelliği gösteren hücreler olarak görülmektedirler.

Çalışmada kullanılan bu hücrelerin canlılıklarını en yüksek seviyelerde tutmak ve hücrelerin büyümelerinin sağlanması açısından farklı bir besiyeri kullanılarak amaca ulaşılmıştır. İstenilen özelliklere ulaşılırken normal bir besiyerinden farklı olarak %10 fetal serum (FBS) ve %1'lik penisilin kullanılarak RPMI 1640 kodlu besiyeri zenginleştirilmiştir. Hücrelere bu besiyeriyle muamele edilerek canlılıkları ve çalışma boyunca gerekli olacak seviyelerde büyümeleri sağlanmıştır. Kültür çalışmaları için kullanılan T lenfosit hücreleri 95% O₂ içeren 75 cm²'lik flasklarda 37°C derecede muhafaza edilmişlerdir. Sağlanan bu koşullar sayesinde hücrelerin büyümesinin devamlılığı sağlanmış ve belirli bir doygunluğa ulaşan hücreler tekrardan pasajlanarak büyümelerinin devamlılığı elde edilmiştir. Ortalama 50000 hücre ortalamasıyla kültür çalışmalarına başlanmasının ardından bu rakam iki veya üç milyon değerlerine yaklaştığı senaryoda hücreler tekrardan bölünmüş ve büyümeleri için gerekli ortam elde edilmiştir.

3.2.2. Dondurma

Yapılan çalışmalar sonucunda yukarıda da bahsedildiği gibi kullanılan hücrelerin bir süre sonra yeterli büyüme oranına erişmesi ve bundan sonraki süreçte tekrardan oranlanarak bölünmeleri gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu sayede çalışmada kullanılacak hücrelerin hem sayı hem de doygunluk olarak ne seviyelerde olduğu daha rahat bir şekilde kontrol altına

alınabilmektedir. Bu kontrol altına alınma durumu olsa bile çalışma için kullanım fazlası olabilecek veya sonraki süreçte lazım olabilecek hücre gruplarının hücresel aktivitelerinin durdurulup saklanması gerekmektedir. Bu işlem hücrelerin dondurulmasını ve muhafaza edilmesini kapsamaktadır. En fazla 10% ölü hücre grubuna sahip kültürler 1100 devir derecesi ile 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve çökmeyen kısmı atılmıştır. Bu tarz soğuk saklama için uygun olan bir besiyeri ile hücrelerin homojenizasyonu sağlanmıştır. Ardından tüpler sıvı azot tankına alınarak burada muhafaza edilmiştir.

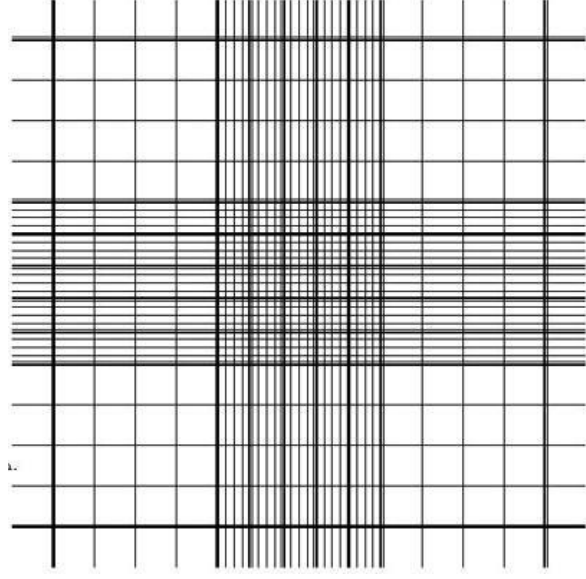
3.2.3. Çözdürme

Yapılan çalışmada doygunluk ve canlılık oranları belirli bir seviyeye gelen hücrelerin fazlaları dondurularak saklanmış ve ihtiyaç durumlarında kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. Bu ihtiyaç durumlarında ise hücre grupları sıvı azot içerisinden çıkarılarak çözünmelerinin sağlanması için 37 °C'lık su banyolarına alınmıştır. Burada belirli bir süre bekletildikten sonra çözünme süreçlerini tamamlamış hücrelerin 15 mililitrelik kaplara alınması ve burada üzerlerine besiyeri eklenerek 1100 devir derecesinde santrifüj edilmeleri sağlanmıştır. Bu süreç beş dakika sürmüştür. Bu süreç ardından flaskın dibine çöken kısım harici kabın içinden uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine 1640 kodlu besiyeri eklemesi gerçekleştirilmiştir. Bu besiyerinin içeriği yukarıda verilmiştir. Burada kimyasal ile hücrelerin teması sağlanmış ve ardından daha rahat bir şekilde incelenmek ve büyümelerinin devamlılığın sağlanması açısından hücreler 25 mililitrelik kaplar içerisine alınmıştır. Bu sayede ihtiyaç duyulması halinde daha önceden muhafazası sağlanan hücrelerin çalışma için kullanımı tekrardan uygun bir hale getirilmiştir.

3.2.4. Sayım

Bu tarz çalışmalarda çalışmanın etkilerinin daha iyi anlaşılması ve kullanılan kimyasalların tam olarak etki mekanizmalarının anlaşılması için kullanılan hücrelerin sayısı oldukça büyük bir önem arz etmektedir. Çalışmada kullanılan hücrelerin de sayımının yapılması ve uygulanacak kimyasalların elde edilen bu hücre sayılarına göre ayarlanması kaçınılmazdır. Bu işlemin gerçekleşmesi içinde özel ekipmanlar kullanılarak olabildiğince net bir değer elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmada sayım için Neubauer lamı adı verilen farklı bir lam çeşidi kullanılmıştır. Bu lam sayesinde hücrelerin sayımı daha kolay ve daha basit bir biçimde ayarlanabilmektedir. Lam üzerinde dört adet büyük on altı adet küçük kare şeklinde bölmeler yer almaktadır.

Fakat sayım aşamasında sadece canlı hücreler bulunmamaktadır. Bu yüzden diğer hücrelerin bu hücrelerle karışmaması adına özel boyalar kullanılarak aradaki fark daha net bir şekilde ortaya koyulmaktadır. Bu çalışmadan tripan blue adı verilen bir hücre boyası kullanılmıştır. Oranlaması 1:1 şeklinde yapılarak canlı ve canlı olmayan hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bu boya sayesinde hücresel aktivitelere devam etmekte olan hücrelerin hücre zarları sayesinde boyadan daha az etkilenecek beyaz ve parlak bir renkte görüntü vermektedirler. Fakat hücresel aktivitelere devam edemeyen hücrelerde boya hücre zarlarından içeri nüfuz etmekte ve bunun sonucunda koyu mavi bir renkte görünüm vermektedirler. Lamın üzerine 10 µl hücre ve boya karışımı eklendikten sonra 1 mililitrede bulunan canlı hücre miktarının hesaplanması için ortalama canlı hücre sayısını dilüsyon faktörünün bin katıyla çarpmak gerekmektedir.



Şekil 6. Neuber lamının mikroskop altındaki temsili görünüşü

Elde edilen hücre sayımı sonuçları doğrultusunda çalışma kapsamında en fazla 20% ölü hücre içeren kültür grupları kullanılmıştır.

3.2.5. GSK2816126 (GSK126) Stoklarının Hazırlanması

Yapılan çalışma içerisinde farklı kimyasallar yer almaktadır. GSK126 bu kimyasallardan biridir ve satın alım şeklinde elde edilmiş ve kullanımı gerçekleştirilmiştir. Kimyasalın bozulmaması ve kimyasal aktivitesini kaybetmemesi açısından 100 mM şeklinde eşit şekilde dağıtılarak DMSO içerisine karıştırılarak -20 °C soğukluğunda muhafazası sağlanmıştır. Yapılan literatür çalışmalarına göre Jurkat hücreleri 1 uM, 2.5 uM, 5 uM, 10 uM ve 20 uM şeklinde artan konsantrasyonlarda GSK126 ile muamele edilerek deney seti kurulması kararlaştırılmıştır.

3.2.6. Hücre Testleri

Çalışma esnasında Jurkat hücreleri GSK126 ile muamele edilerek hücre canlılığı, hücre döngüsü, Annexin V testleri kontrol grubu ile kıyaslanarak test edilmiştir. Literatür çalışmalarının ardından farklı saat aralıklarında, farklı GSK126 konsantrasyonlarında ve farklı hücre sayılarında optimizasyonlar gerçekleştirilmiş olup GSK126'nın EZH2'yi inhibe ederek letal bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Jurkat hücrelerine 24, 72 ve 120 saat boyunca GSK126 uygulaması yapılarak kimyasalın EZH2'nin inhibisyonundaki etkisi incelenmiştir. İncelemenin ardından planlanan derişim ve zaman belirteçleri ortaya koyularak kimyasalın çalışma hücrelerine etkilerinin daha iyi bir şekilde anlaşılması için daha farklı testlerde gerçekleştirilmiştir. Bu testler hücre döngüsü, apoptoz ve Western Blot testleri şeklinde uygulanmış ve bunlardan elde edilen verilerde gösterilmiştir.

3.2.6.1. Jurkat Hücresinin Çalışmalara Hazırlanması

Bu çalışmada hazırlama yapılırken hücrelerin sonrasında hangi test için kullanılacağı büyük bir önem arz etmektedir. Kullanılacak test tipine göre hücreler ya 12 bölmeli 2 milimetrelik konsantrasyonlarda veya 6 bölmeli 4 milimetrelik konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Her ne kadar çalışma tipleri için farklı konsantrasyonlar kullanılsa da bütün bölmelere bir milyon hücre uygulaması yapılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasalın etkilerinin anlaşılması için kimyasalın etki sağlayabileceği beş farklı grup, bunların farklarını anlayabilmek adına bir adet kontrol grubu ve kimyasalın dimetil sülfoksit içerisinde muhafaza edilmesinden kaynaklı ayrıca bir dimetil sülfoksit grubu şeklinde bir çalışma dizaynı gerçekleştirilmiştir. Jurkat hücre grubunda EZH2'nin inhibe edilmesi amaçlanmış ve bu amaca bağlı kalınarak farklı zaman aralıklarında hücrelere belirlenen çalışma dizaynına uygun olacak şekilde muamele yapılmıştır. Süre bakımından incelendiğinde hücre gruplarına 24, 72 ve 120 saat olacak şekilde kimyasal muamelesi uygulanmış ve bu muamele esnasında 5% CO₂ içeren bir inkübe ortamı sağlanmıştır. Bu ortamın sıcaklık ortalaması 37 °C olarak ölçülmüştür.

3.2.6.2.Jurkat Hücresi ve WST-1

Çalışma dizaynı yapılırken amaçlanan başka bir parametrede hücrelerin aktivasyon oranlarının hesaplanması ve bunların sonuçlarının incelenmesidir. Bu verileri elde etmek için kullanılabilecek testlerden birisi de WST-1 testidir. WST-1; Tetrazolim tuzlarının süksinat-tetrazolim redüktaz tarafından renkli formazan bileşiklerine indirgenmesi, hücre canlılığını ve çoğalmasını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Tetrazolim tuzlarının formazana dönüşmesi metabolik olarak canlı hücrelerin mitokondrilerinde gerçekleşir. WST-1, Hücre Canlılığı ve Proliferasyon Testi bir tetrazolim tuzu olan WST-1[2-(4Iodophenyl)-3 (4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] kullanır. WST-1, metabolik olarak aktif hücreler üzerinde suda çözünürlüğü yüksek bir formazan üreterek ek bir ekstraksiyon adımı olmaksızın hücre canlılığı ve proliferasyonunun doğrudan ve kullanıcı kolaylığında kolorimetrik ölçümüne olanak tanır. WST kiti, kullanıcıya istenirse farklı zaman noktalarında absorbans kaydetme esnekliği sağlar.

Jurkat hücrelerinde; 1 uM, 2.5 uM, 5 uM, 10 uM ve 20 uM GSK126 ile 24,72 ve 120 saatte ayrı ayrı deney setleri planlanmıştır. Bununla beraber GSK126 DMSO'da çözündüğünden dolayı 20 uM ve 5uM DMSO grubu deney setine eklenmiştir.

Yukarıda belirtilen zaman ve miktarlarda uygulanan kimyasal maddenin etkilerinin daha net ve daha farklı bir şekilde yorumlanması için uygulanan bu testte 96 bölmeli plakalar kullanılarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu bölmelere 100µl besiyeri ve bu besiyerinin içinde beş bin hücre olacak şekilde ekim sağlanmış ve ardından yukarıdaki dizaynda belirtildiği gibi farklı zaman aralıkları boyunca inkübe edilerek renk değişiminin gözlemlenmesi sağlanmıştır. Renk değişiminin fark edilmesi için plaka üzerindeki bölmelerin hepsine 10 µl test solüsyonu eklenmiştir. Eklenen bu solüsyon sonrasında bütün plakalar iki saat daha inkübasyon süreci için kaldırılmış ardından spektrofotometre cihazı ile renk değişiminin ölçümü sağlanmıştır. Cihaz ölçümü 450 nanometre aralığında yapılarak, elde edilen değer belirli bir formül ile hesaplanarak canlılık oranı hesaplaması ortaya konmaktadır.

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

Elde edilen veriler ‘Origin 8’ adlı program aracılığıyla grafik haline getirilmiş ve değerlendirilmiştir.

3.2.6.3. Apoptoz Analizi

Çalışma tasarımı yapılacak başka bir test ise apoptoz testidir. Bu test ile GSK126 ile hücrelerin ölümüne ne kadar etki ettiği araştırılıp buna göre yorumlamalar ortaya koyulmuştur. Bu testin birden fazla yöntemi olmakla beraber çalışmada Annexin V testi kullanılmıştır. Bu testin sonuçlarını elde etmek için muse hücre analizörü kullanılmıştır. Jurkat hücrelerinde; 1 uM, 2.5 uM, 5 uM, 10 uM ve 20 uM GSK126 konsantrasyonlarında 24,72 ve 120 saatte inkübasyon uygulanarak etkileri incelenmiştir. Bu süreler sonunda her örnekten 1.5 mililitre alınarak 1100 devirde santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonrasında 1.4 mililitresi uzaklaştırılan süpernatantların, 0.1 mililitreleri uygulanacak testin içinden çıkan solüsyonun 0.1 mililitresi ile karıştırılarak 20 dakika boyunca karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Muse cihazında ölçümleri yapılmış ve sonuçlar ortaya koyulmuştur.

3.2.6.4.Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü testi; 1 uM, 2.5 uM, 5 uM, 10 uM ve 20 uM GSK126 konsantrasyonları ile 24 ve 72 saatte inkübasyon uygulanarak apoptozisin indüklendiği Jurkat hücreleri üzerinde yapılmıştır. Bu testin amacı hücre bölünmesi gerçekleşirken kontrol mekanizmalarının da görev aldığı hücre döngüsünün hangi aşamasında ne kadar hücrenin bölünmesine engel olup olunmadığının anlaşılmasını sağlamaktır. Bu testteki asıl temel ise gen yapısının propidyum iyodür ile boyanmasından oluşmaktadır. Yine anti kanserojenik kimyasallar ile birlikte belirtilen sürelerde inkübasyona bırakılan hücrelerin bu süreç sonrasında 24 bölmeli plakaların her bir bölmesinden 1 mililitre örnek alınarak 1100 devirde 5 dakika boyunca santrifüj edilmesi,

ardından süpernatantların uzaklaştırılmasıyla beraber 1 mililitre 1x PBS ile yıkanmalarının sağlanması, ardından tekrar aynı devir ve aynı süreyle santrifüj edilmesinin ardından 1 mililitre %70'lik soğuk etil alkol eklenmesi ve en az 3 saat süreyle bu şekilde bekletilmesi şeklinde ilerlemiştir. Bekleme sonrasında bu karışımdan 200-500 µl alınarak 1100 devirde 5 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve bu sayede karışımdaki alkolün uçması sağlanmıştır. Dibe çöken kalıntı tekrardan PBS ile yıkanmış ve santrifüj ile uzaklaştırılmıştır. Ardından her bir ependorfdaki kalıntı üzerine muse cell cycle ajanından 200 µl eklenmiş ve yarım saat süreyle karanlıkta bekletilmiştir. Hücre analizöründe ölçümler yapılmış ve sonuçları eklenmiştir.

3.2.7. Western Blot

Bu çalışma için proteinler izolasyonu ardından miktarlarının hesaplanması gerekmektedir.

3.2.7.1.1. İzolasyon

Çalışma dizaynı için belirlenen süre ve oranlarda inkübe edilen hücrelerden analiz için protein izolasyonu yapılmaktadır. Bu işlem için hücreler 1100 devirde santrifüj edilmiş ardından iki defa PBS ile yıkamaları yapılmıştır. Tekrardan pelet durumuna getirilen hücrelerden izolasyon gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte kullanılan buffer aşağıda gösterilmiştir.

RİPA Lizis Buffer İçeriği (100 ml Stok için)

0,5M- 10 mililitre Tris-HCl
5M 3 mililitre NaCl
0,5 mililitre EDTA (0,5M)
1 mililitre Na₃VO₄ (100mM)
0,1 gram SDS
0,5 gram SO
Dyum Deoksikolat

İzolasyon için elde edilen peletlere 50-100 µl buffer eklenmiş ve ardından 4°C sıcaklıkta 450 devir ayarında yarım saat boyunca karıştırıcıda bekletilmiş ardından yine aynı sıcaklıkta 13000 devir ayarında yarım saat santrifüj edilmişlerdir. Dibe kalan çöküntü uzaklaştırılıp kalan kısım üzerinden protein miktarı belirlenmiştir.

3.2.7.1.2. Protein Miktar Tayini

Süpernatantlar üzerinden incelenecek protein miktarı belirlenmesi için BCA Protein Assay Kit kullanılmıştır.

Kit içerisinde bulunan BSA stoğu kite uygun şekilde hazırlanarak 9 standart 96 bölmeli plakalara yoğunluğu çoktan aza doğru 10 µl oranında aktarılmıştır. Ardından kitin etkinliğinin ölçülmesi adına kontrol grubu hazırlanmış ve kite uygun olarak 200 µl kit solüsyonu her bir bölmeye eklenmiştir. Bu işlem sonrasında 37 °C’de yarım saat beklenilmiş ve örnekler spektrofotometre cihazında 562 nanometrede ölçülerek miktar tayini yapılmıştır.

3.2.7.1.3. SDS-PAGE, Transfer ve Görüntüleme

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

10X TBS (1L):

30,2 gram Tris-base
43,8 gram Sodyum klorür (NaCl)
932 miligram Potasyum Klorür (KCl)

TOWBIN Transfer Buffer (800 ml):

3.03 gram Tris-base
14,4 gram Glisin
5 mililitre Sodyum dodesil sülfat (SDS) (10% luk SDS solüsyonundan)
Distile su (pH: 8,1-8,5)

Not: Kullanım önce 20% oranında metanol ilave edilir.

10X Running Buffer (1L):

30 gram Tris-base
144 gram Glisin
15 gram Sodyum dodesil sülfat (SDS)
Saf su (pH: 8,6)

Lower Buffer (500 ml):

91 gram Tris-base

20 mililitre Sodyum dodesil sülfat (SDS) (10% luk SDS solüsyonundan)
14 mililitre HCl (6N)

Upper Buffer (500 ml):

30,5 gram Tris-base
20 ml Sodyum dodesil sülfat (SDS) (10 % + 5luk SDS solüsyonundan)
30 mililitre Hidroklorik asit (HCl) (6N)
Saf su (pH: 6,7)

1X TBS-t (1L) :

100 mililitre 10X TBS
900 mililitre saf su
1 mililitre Tween 20

%40 Amonyum persülfat:

0,5 gram Amonyum persülfat (APS)
1 mililitre Saf su

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

100 mililitre 1X TBS-t
5 gram Skim Milk
0,5M- 10 mililitre Tris-HCl

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

100 mililitre 1X TBS-t
5 gram BSA

Hazırlanacak jel için kullanılan malzemelerin temiz ve steril olması elde edilecek sonuçlar açısından önem arz etmektedir. Bu yüzden bu çalışmada kullanılacak cam tabakalar etil alkol ile muameleye maruz bırakılmış ardından saf su ile yıkanarak temizlikleri sağlanmıştır. Kurutma işleminden sonra jelin döküleceği bölmeye yerleştirilmişlerdir. İstenilen proteinin molekül ağırlığına göre hazırlanan ayırıcı jel tabakalar üzerine dökülmüş ve jelin yüzeyi alkol ile kaplanarak düzleşmesi sağlanmıştır. Ardından polimerizasyon için yarım saat beklenilmiş ve yüzeydeki alkol uzaklaştırılmıştır. Bundan sonra 5%'lik paketleyici jel hazırlanmış ve ayırıcı jelin üzerine dökümü sağlanmıştır. Bu süreçte tabakalar arasına jel tırağı adı verilen parçalar eklenmiş ve yine yarım saat kadar beklemiştir.

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

Tablo 5. Ayırıcı jel bileşenleri ve miktarları (Belirtilen miktarlar 2 adet jel hazırlamak için kullanılmıştır.)

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

Tablo 6. Paketleyici jel bileşenleri ve miktarları (Belirtilen miktarlar 2 adet jel hazırlamada kullanılır.)

6X Loading Dye (10 ml):

3,75 mililitre 1M Tris-HCl (PH: 6,8)
3,75 mililitre 1M Tris-HCl (pH: 6,8)
5 mililitre Gliserol + H2O (4 mililitre Gliserol, 1mililitre saf su mixi)
1 gram Sodyum Dodesil Sülfat
900 mikrolitre (µl) Merkapto-etanol
%0,06 Bromfenol blue
Saf su

Analiz için yukarıda belirtilen belirli süre ve konsantrasyonlarda inkübe edilmiş ve ardından protein miktarı belirlenen örnekler kullanılmıştır. Protein miktarları kit ile belirlenen örneklerden ARID1A, EZH2, H3K27me3 proteinlerinin analizi için 100 µg olacak şekilde alınmış ve jele yüklemeden önce 6X loading dye ile karıştırılmıştır. Karışımın 5 dakika boyunca

95 °C’de inkübasyonu sağlanmış ve böylece örnekler jele yüklemeye hazır hale getirilmiştir. Yürütme aşaması için hazır hale gelen jelin içerisine 1X running buffer eklenmiş ve proteinlerin yükleme işlemi yapılmıştır. Bu işlemden önce jel tarakları çıkartılmıştır. Ortalama 45 dakika boyunca 70 volt gücünde ardından ortalama 90 dakika boyunca 120 volt gücünde yürütme gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi bittikten sonra jelin aktarımının sağlanması için kullanılacak olan membran önce beş dakika boyunca metanolde ardından yine beş dakika boyunca Towbin transfer buffer ile muamele edilerek aktif hale getirilmiştir. Ayrıca aktarım sürecinde lazım olacak filtre kağıtları yine aynı solüsyon ile ıslatılarak hazır hale getirilmiş ve transfer sistemine yerleştirilmiştir. Filtre kağıtlarının üstüne membran konulmuş onun üzerine ise jel alınmıştır. Ardından yine aynı prosedürle hazır hale getirilen filtre kağıtları jelin üzerine konulmuş ve transfer modülü aracılığıyla 1 amper akımda 25 volt gücünde yarım saat olacak şekilde transferin gerçekleşmesi sağlanmıştır. Bütün bu süreç gerçekleşirken materyaller arasında hava boşluğu olmamasına özen gösterilmiştir.

Transfer işleminin ardından membran üzerindeki gerekli olmayan proteinlerin ilgisiz başka proteinler ile bağlanmasını sağlamak amacıyla bloklama işlemi uygulanmaktadır. Bu işlem aktarım sonrasında membranın 6%’lık süt tozu ile bir saat muamelesiyle meydana gelmektedir. Bu süre sonrasında süt tozu solüsyonu sekonder antikor için kullanılacakken, membran TBS-t solüsyonu ile birkaç dakika yıkanmaktadır.

Antikor bağlanmalarının gerçekleşmesi için kullanılacak olan gruplar aşağıdaki tablodaki oranlarda dilüe edilmiştir. İlk olarak membranlar primer antikorlar ile bir gece 4°C’de inkübe edilmiş ve sonrasında 1X TBS-t solüsyonu ile 3x5 dakika olacak şekilde yıkanmışlardır. Ardından membranlar, sekonder antikor bağlanması için 6%’lık süt tozu solüsyonu içerisinde dilüe edilmiş ve bir saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Bu süreç sonrasında yine 3x5 dakika olacak şekilde yıkama gerçekleştirilmiştir.

ANTİKOR	DİLÜSYON ORANI
GAPDH	1:8000
EZH2	1:3000
H3K27me3	1:1000
H3	1:1000
ARID1A	1:3000

Tablo 7. İmmunoblotlamada kullanılan birincil antikorların spesifitesi, firma bilgileri ve dilüsyon oranları

ANTİKOR	DİLÜSYON ORANI
Anti-Mouse IgG	1:1000
Anti-Rabbit IgG	1:1000

Tablo 8. İmmunoblotlamada kullanılan ikincil antikorların ürün kodu, firma bilgileri ve dilüsyon oranları

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

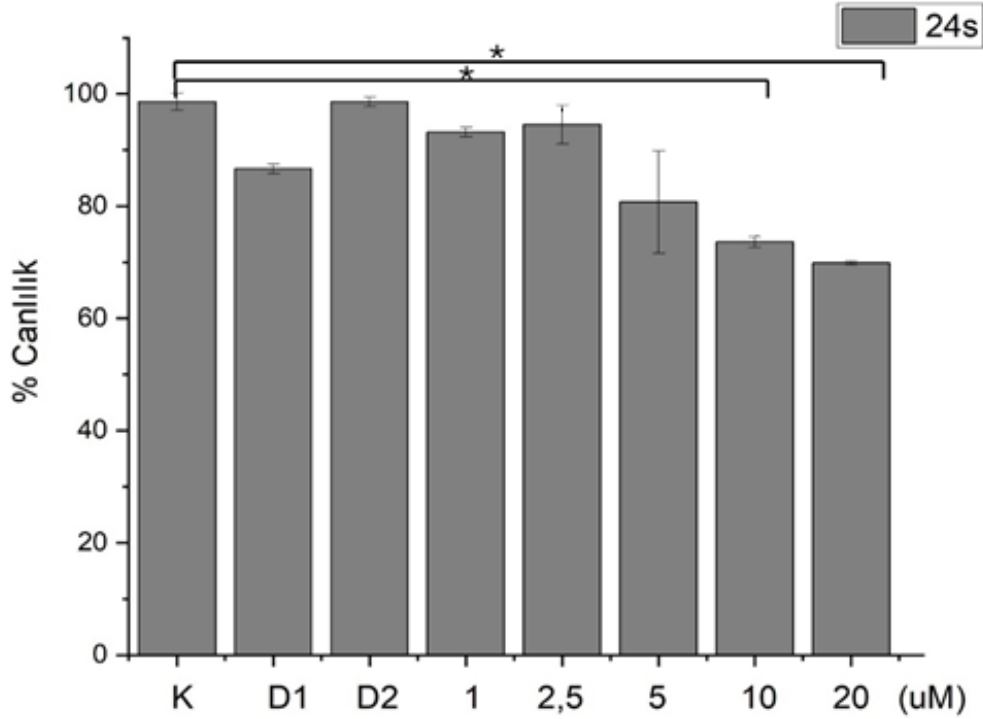
3.2.8. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi

Grafikler birbirinden bağımsız 3 tekrardan oluşan ölçüm sonuçlarının ortalamaları alınarak 'Origin 2019b' programıyla hazırlanmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde ise; gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar 'One-Way ANOVA' kullanılarak belirlenmiş olup $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir

4. BULGULAR

4.1.WST-1 Testi Bulguları

Çalışma içerisinde kullanılan Jurkat hücre hattına hücresel aktivitelerin devamlılığıyla alakalı olarak değişikliklerin gözlemlenmesi için 1, 2.5, 5, 10 ve 20 uM çalışma kimyasalı olan GSK126 uygulanmıştır. Bu uygulama 24, 72 ve 120 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamanın ardından yukarıda bahsedildiği şekilde WST-1 analiz protokolleri uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 7.'de 24 saat inkübasyon sonuçlarını Şekil 8.'da 72 saat inkübasyon sonuçlarını ve Şekil 9.'da 120 saat inkübasyon sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 7. Jurkat hücrelerinde 24 saat GSK126 uygulaması, WST-1 analizi sonuçları

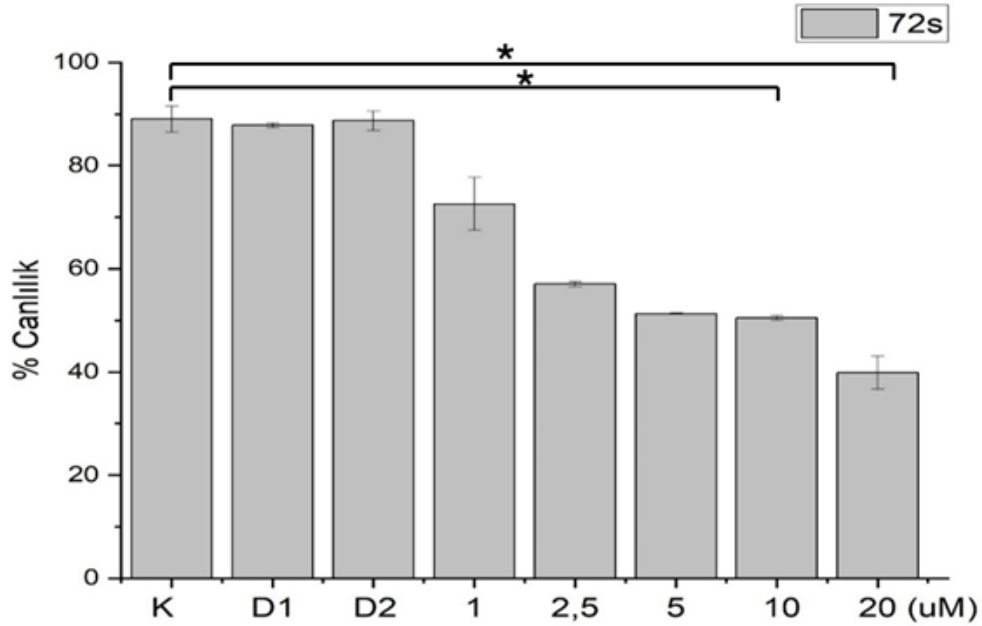
(* : Kontrole kıyasla $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(Kontrol grubuna göre 10 uM ve 20 uM GSK126 uygulanan gruplar anlamlıdır aynı zamanda

1uM ve 20 uM GSK126 grupları anlamlıdır. Bununla beraber 10 uM ve 20 uM GSK126 grupları da anlamlı olduğu saptanmıştır. ($p \leq 0.05$)

Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında kontrol ve DMSO gruplarında hücresel aktivitenin 99% oranlarında seyrettiği ve GSK12 ile muamele edilen hücre gruplarında ise bu oranların 1 μM 'de 90% (± 3), 2,5 μM 'da % 90 (± 4), 5 μM 'da % 80 (± 5), 10 μM 'da % 75 (± 5), 20 μM 'da % 70 (± 5) şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Bu veriler doğrultusunda Jurkat hücrelerinde, GSK126'nın 24 saatlik inkübasyon sonrasında metabolik aktivite üzerine etkisinin az olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle EZH2'nin inhibisyonunu tespit etme amacıyla GSK126 72 ve 120 saatte ayrı ayrı deney setleri kurulması kararlaştırılmıştır.



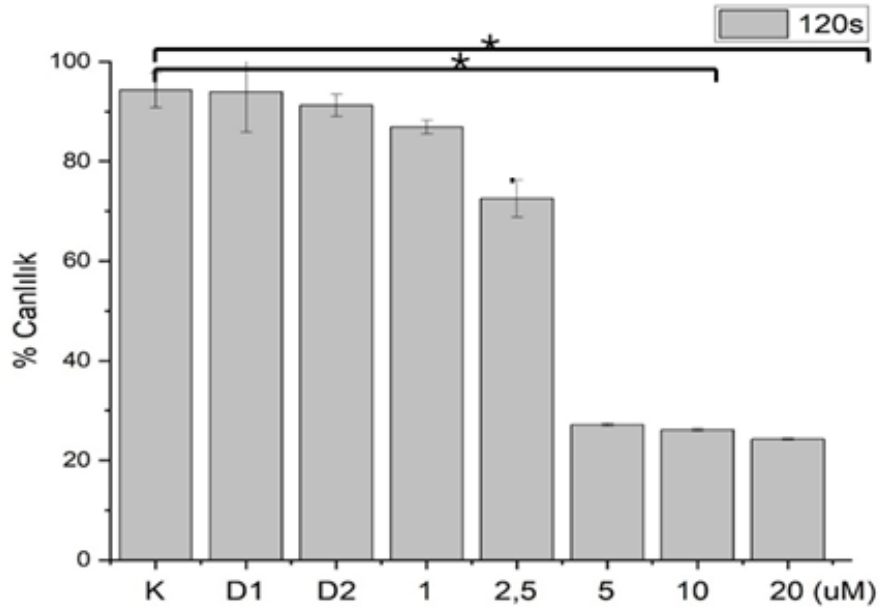
Şekil 8. Jurkat hücrelerinde 72 saat GSK126 uygulaması, WST-1 analizi sonuçları

(*: Kontrole kıyasla $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(Kontrol grubuna göre 10 uM ve 20 uM GSK126 uygulanan gruplar anlamlıdır aynı zamanda 1uM GSK126 grubu 2,5 uM ve 20 uM GSK126 grubuna göre anlamlıdır. 2,5 uM GSK126 grubu 5 uM GSK26 grubu da birbiri ile anlamlıdır. Bununla beraber 10 uM ve 20 uM GSK126 grupları da anlamlı olduğu saptanmıştır. ($p \leq 0.05$))

Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında kontrol ve DMSO gruplarında hücresel aktivitenin 95% oranlarında seyrettiği ve çalışma kimyasalı ile muamele edilen hücre gruplarında ise bu oranların 1 μM 'de %75 (± 2), 2,5 μM 'da %55 (± 4), 5 μM 'da %50 (± 5), 10 μM 'da %50 (± 5), 20 μM 'da %40 (± 5) şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Bu veriler doğrultusunda Jurkat hücrelerinde, GSK126'nın 72 saatlik inkübasyon sonrasında hücresel aktivite üzerine etkisinin hücre canlılığının % 45 seviyelerini düştüğü 10 μM çalışma kimyasalı uygulanmasıyla elde edildiği gözlemlenmiştir.



Şekil 9. Jurkat hücrelerinde 120 saat GSK126 uygulaması, WST-1 analizi sonuçları

(* : Kontrole kıyasla $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olan istatistiksel farkı temsil eder.)

(Kontrol grubuna göre 10 uM ve 20 uM GSK126 uygulanan gruplar anlamlıdır. 2,5 uM GSK126 grubuna göre 5 uM, 10 uM ve 20 uM GSK126 grupları anlamlı olduğu saptanmıştır. ($p \leq 0.05$))

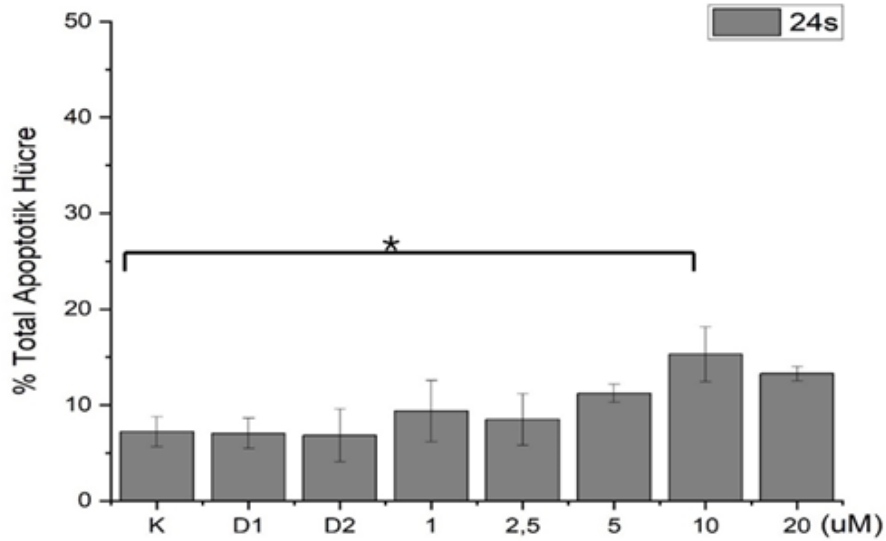
Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında kontrol ve DMSO gruplarında hücresel aktivitenin 95% oranlarında seyrettiği ve çalışma kimyasalı ile muamele edilen hücre gruplarında ise bu oranların 1 μM 'de % 95 (± 2), 2,5 μM 'de % 75 (± 4), 5 μM 'de % 30 (± 5), 10

μM 'da % 35 (± 5), 20 μM 'da % 20 (± 5) şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Bu veriler doğrultusunda Jurkat hücrelerinde, GSK126'nın 120 saatlik inkübasyon sonrasında metabolik aktivite üzerine etkisinin çalışma kimyasalının ortalama 60% oranında bir letalite etkisinin olduğu ve bu etkiyle beraber apoptozu indüklemesiyle karşı karşıya kalınmıştır.

4.2. Annexin-V Testi

Çalışmada kullanılan hücre gruplarına 1, 2.5, 5, 10 ve 20 μM GSK126 uygulaması yapılmış ve bu uygulama 24, 72 ve 120 saat sürelerle inkübasyona maruz bırakılarak uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu muamelenin ardından yukarıda belirtilen testin protokolleri uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 10'da 24 saat inkübasyon sonucunu, Şekil 11.'de 72 saat inkübasyon sonucunu ve Şekil 12'de 120 saat inkübasyon sonucunu göstermektedir.



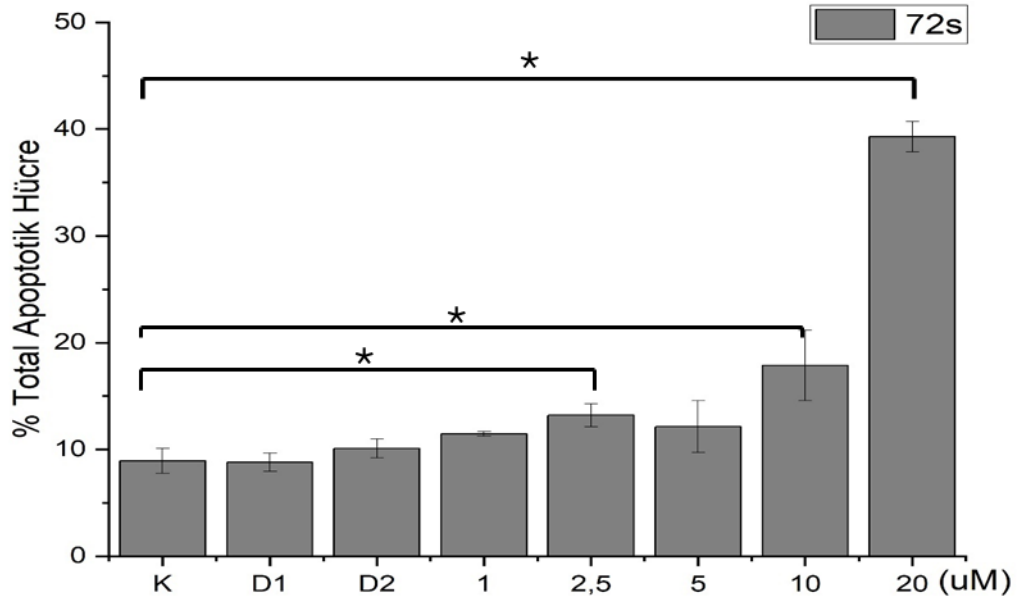
Şekil 10. 24 saat muamele edilen hücrelerin apoptotik değişimi

(*: Kontrol grubuna göre $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

(Kontrol grubuna göre 10 uM ve 20 uM GSK126 grupları anlamlıdır bununla beraber

D2(DMSO20uM) grubuna göre 20uM grubu anlamlı olup 5 uM grubu ile de 10 uM GSK126 grupları anlamlıdır. ($p \leq 0.05$))

Uygulanan inkübasyon sürelerine bağlı olarak farklı grafikler oluşturulmuş ve 24 saatlik inkübasyon süresine sahip hücrelere uygulanan testin sonucunda, kontrol grubunda 5%, çalışma kimyasalının uygulandığı gruplarda ise 1 μM 'de 9% (± 1), 2,5 μM 'da 8% (± 6), 5 μM 'da 10% (± 5), 10 μM 'da 15% (± 5), 20 μM 'da %15 (± 5) oranında apoptozis meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında herhangi bir anlamlı fark meydana gelmediği düşünülmektedir.



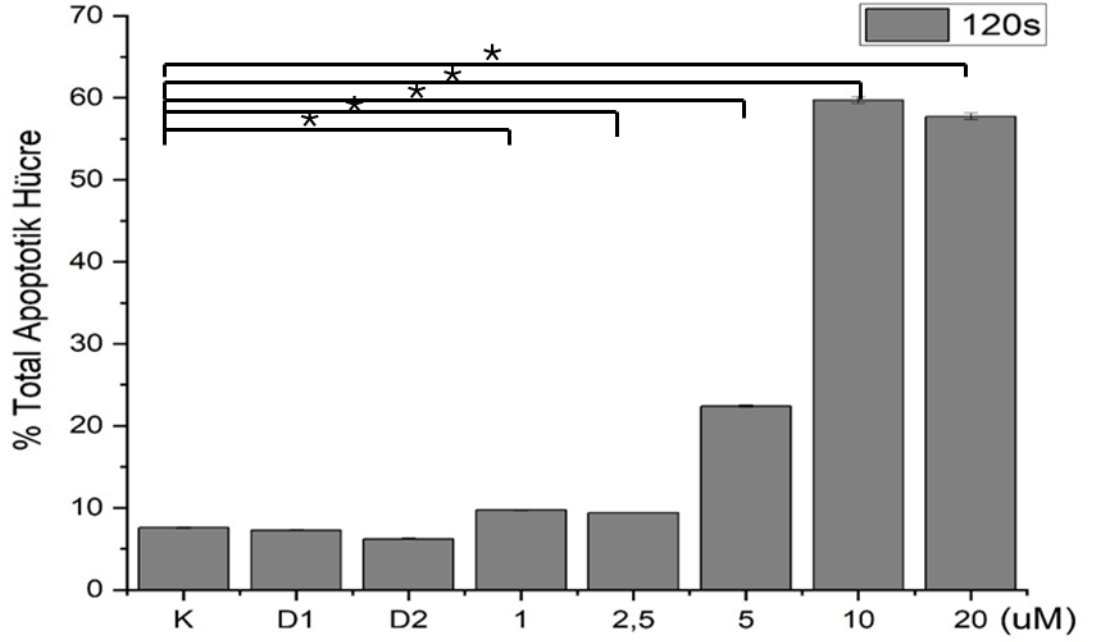
Şekil 11. 72 saatlik muamele edilen hücrelerin apoptotik değişimi

(* : Kontrol grubuna göre $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir)

(Kontrol grubuna göre 2.5 uM,10 uM ve 20 uM GSK126 grupları anlamlıdır $p \leq 0.05$))

Uygulanan inkübasyon sürelerine bağlı olarak farklı grafikler oluşturulmuş ve 24 saatlik

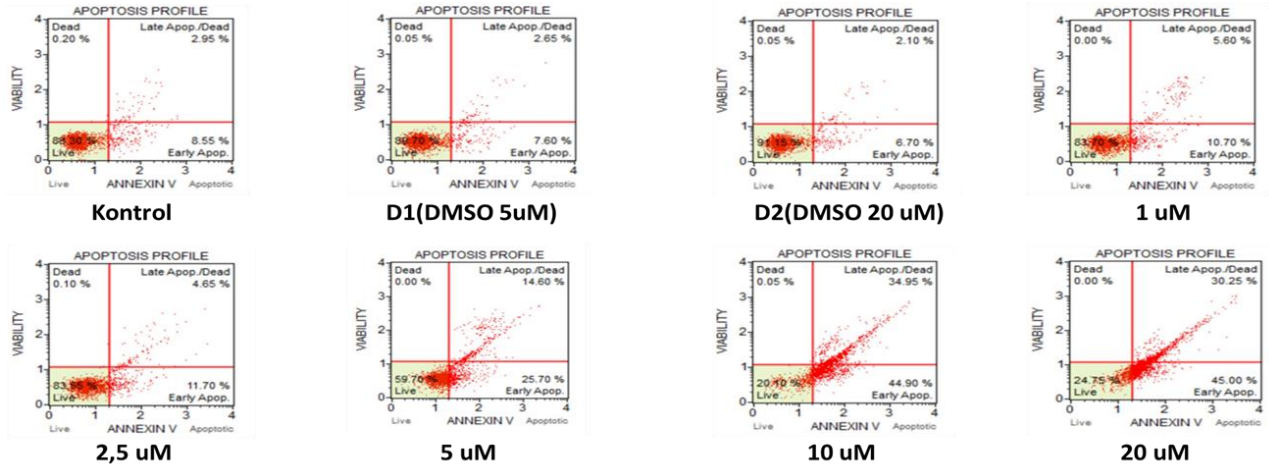
inkübasyon süresine sahip hücelere uygulanan testin sonucunda, kontrol grubunda 10%, çalışma kimyasalının uygulandığı gruplarda ise 1 uM’de % 10 (± 1), 2,5 uM’de % 15 (± 6), 5 uM’de %20 (± 5), 10 uM’de %25 (± 5), 20 uM’de %40 (± 5) oranında apoptozis meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında sadece 20 uM dozunda anlamlı bir sonuç elde edildiği düşünülmektedir.



Şekil 12. 120 saatlik muamele edilen hücrelerin apoptotik değişimi

(*: Kontrol grubuna göre $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir)

(Kontrol grubuna göre 1uM, 2.5 uM, 5 uM, 10 uM ve 20 uM GSK126 grupları anlamlıdır. ($p \leq 0.05$))

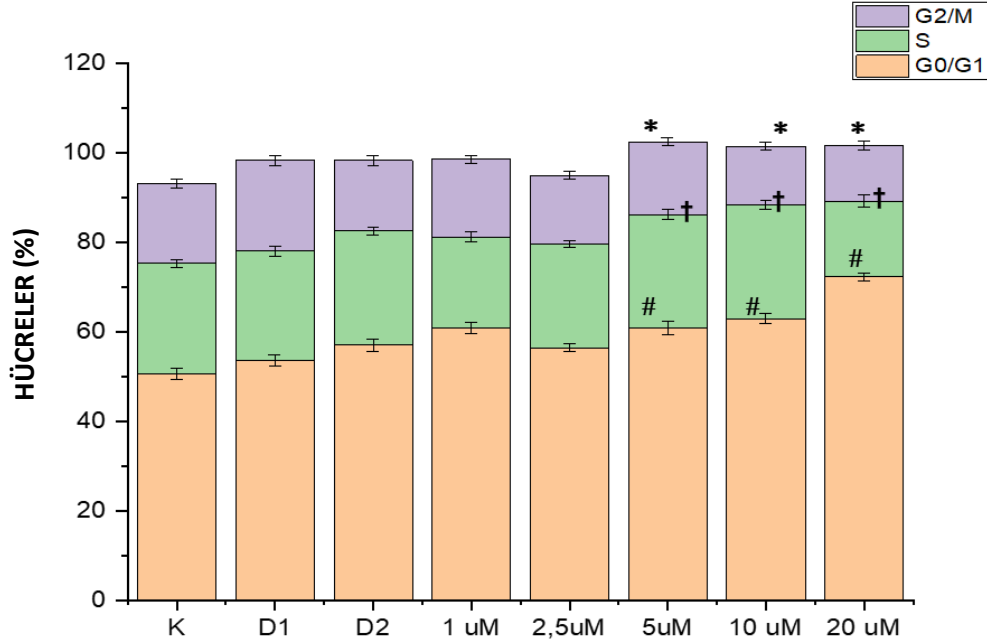


Şekil 13. Şekil 13’de grafiği gösterilen Jurkat Hücrelerinin Annexin V/7AAD verilerinin apoptoz profilleri.

Uygulanan inkübasyon sürelerine bağlı olarak farklı grafikler oluşturulmuş ve 24 saatlik inkübasyon süresine sahip hücrelere uygulanan testin sonucunda, kontrol grubunda 10%, çalışma kimyasalının uygulandığı gruplarda ise 1 uM’de % 10 (± 1), 2,5 uM’de % 15 (± 6), 5 uM’de %25 (± 5), 10 uM’de %60 (± 5), 20 uM’de %55 (± 5) oranında apoptozis meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında 10 uM dozunda kontrol grubuna karşın 60% oranında hücresel aktiviteyi azalttığı gözlemlenmiş ve bu sonuca bağlı olarak apoptozis aktivitesini indüklediği düşünülmektedir.

4.3. Jurkat Hücrelerinde Arrestin Hücre Döngüsü Testi İle Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan hücre hattının EZH2’nin inhibisyonu için çalışma kimyasalı ile muamele edilmesi ve bu sürelerin 24 ve 72 saat aralıklarında yapılması sonrasında, hücre döngüsü testi uygulanmış ve sonuçlar Şekil 14.’de 24 saat inkübasyon sonuçlarını ve Şekil 15.’de 72 saat inkübasyon sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 14. 24 saat muamele edilen hücreler

(#: Kontrol grubuna göre $p \leq 0,05$ 'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

*: Kontrol grubuna göre $p \leq 0,05$ 'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

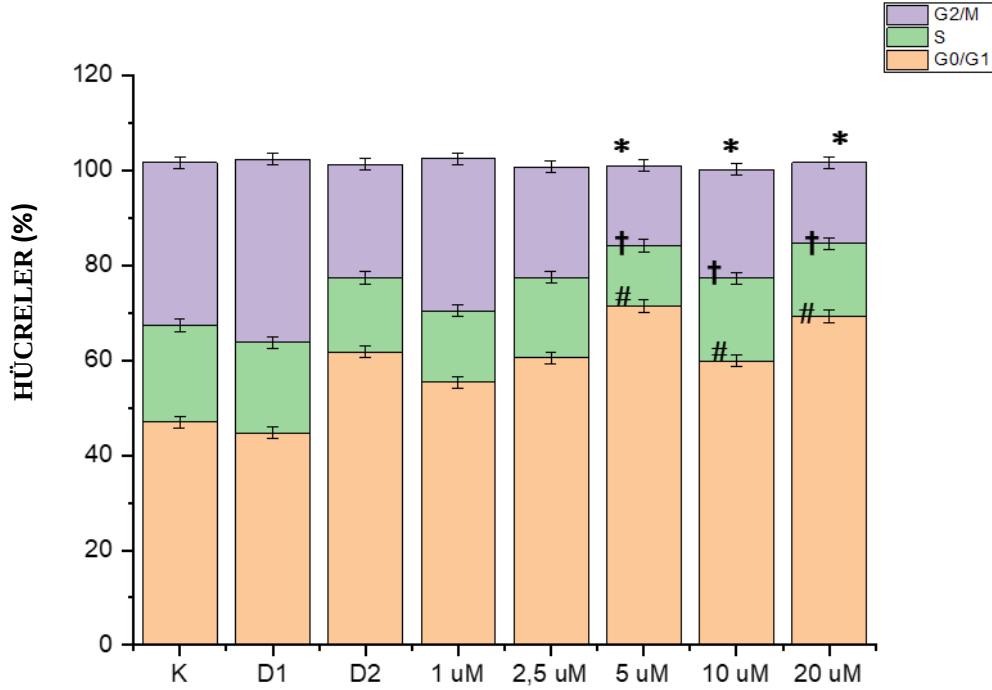
†: Kontrol grubuna göre $p \leq 0,05$ 'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.)

(#: Kontrol grubuna göre 5uM,10 uM ve 20 uM GSK126 grupları anlamlıdır, *: Kontrol grubuna göre 5 uM,10 uM ve 20 uM GSK126 grupları anlamlıdır, †: kontrol grubuna göre 5 uM,10 uM ve 20 uM GSK126 gruplarına göre anlamlıdır).

Şekil 14.'de G0/G1 fazı kontrol grubunda %50 (± 4) oranındadır ve bu oran GSK126 ile 24 saat muamele edilmiş olan Jurkat hücrelerinde artan doz miktarlarında sırası ile %60 (± 3), %55 (± 4), %60 (± 4), %65 (± 4), %70 (± 4) olduğu tespit edilmiş ve kontrole kıyasla ancak en yüksek doz olan 20uM'de önemli bir artış olduğu tesit edilmiştir. S fazında ise kontrol grubu ile GSK126 ile muamele edilmiş olan gruplar kıyaslandığında, kontrol grubu %20 (± 5) oranında olduğu ve bu oranın GSK126 ile muamele edil en hücrelerde önemli bir artış veya azalışa neden olmadığı ancak kontrol grubuna kıyasla anlamlı olduğu tespit edilmiştir. G2/M fazında ise kontrol grubu %25 (± 5) orandayken GSK126 ile muamele edilmiş olan Jurkat hücrelerinde artan dozlarda sırası ile %25 (± 2), %20 (± 3), %20 (± 2), %15 (± 3), %15 (± 4) oranlarında olduğu tesit

edilmiştir.

Sonuçlar göz önüne alındığında GSK 126 ile 24 saat inkübe edilen Jurkat hücrelerinde kontrol grubuna kıyas ile G0/G1 fazında arrestin gerçekleştiği şekilde tespit edilmiştir. Ancak bu arrestin süreye bağlı artıp artmayacağını belirlemek adına deney seti 72 saat inkübasyon ile tekrar gerçekleştirilmesi değerlendirilmiştir



Şekil 15. 72 saat muamele edilen hücreler

(#: Kontrol grubuna göre $p \leq 0,05$ 'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

*: Kontrol grubuna göre $p \leq 0,05$ 'de istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir.

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

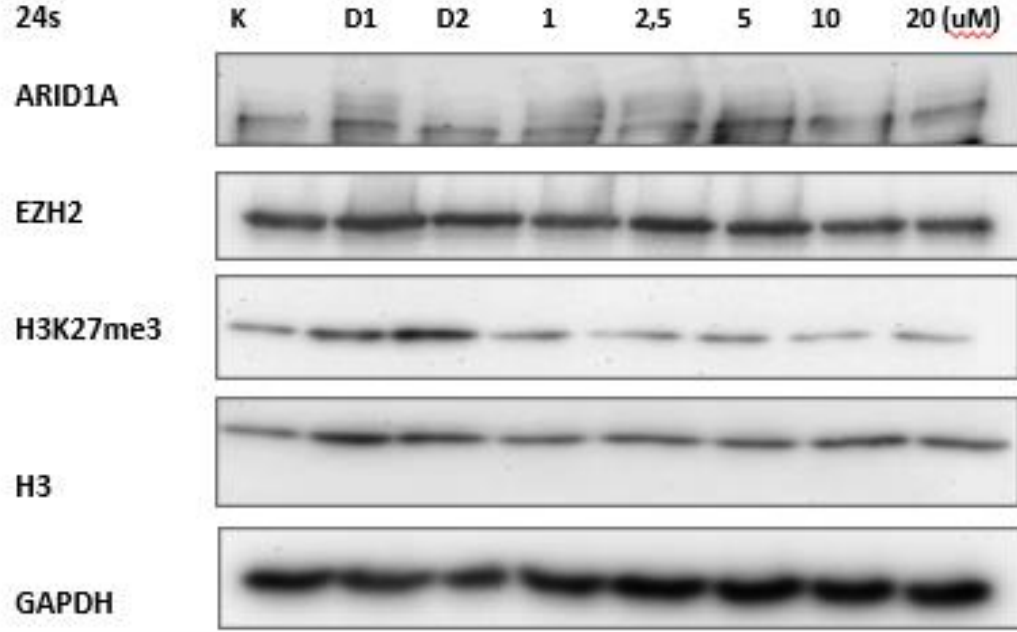
(#: Kontrol grubuna göre 5uM,10 uM ve 20 uM GSK126 grupları anlamlıdır, *: Kontrol grubuna göre 5 uM,10 uM ve 20 uM GSK126 grupları anlamlıdır, †: kontrol grubuna göre 5 uM,10 uM ve 20 uM GSK126 gruplarına göre anlamlıdır).

Şekil 15.'da G0/G1 fazı kontrol grubunda %50 (± 4) oranındadır ve bu oran GSK126 ile 72 saat muamele edilmiş olan Jurkat hücrelerinde artan doz miktarlarında sırası ile %55 (± 3), %

60 (± 4), %70 (± 4), %60 (± 4), %70 (± 4) olduğu tespit edilmiş. S fazında ise kontrol grubu ile GSK126 ile muamele edilmiş olan gruplar kıyaslandığında, kontrol grubu %20 (± 5) oranında olduğu ve bu oranın GSK126 ile muamele edilen hücrelerde önemli bir artış veya azalışa neden olmadığı ancak kontrol grubuna kıyasla anlamlı olduğu tespit edilmiştir. G2/M fazında ise kontrol grubu %30 (± 5) orandayken GSK126 ile muamele edilmiş olan Jurkat hücrelerinde artan dozlarda sırası ile %25 (± 2), %20 (± 3), %15 (± 2), %20 (± 3), %15 (± 4) oranlarında olduğu tesit edilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında GSK 126 ile 72 saat inkübe edilen Jurkat hücrelerinde kontrol grubuna kıyas ile G0/G1 fazında arrest gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ancak 24 saat inkübe edilen deney seti arasında anlamlı bir fark olmadığı ve ilk 24 saatte G0/G1 fazında arrest olduğu artan sürenin arreste etkinde önemli bir fayda sağlamadığı tespit edilmiştir.

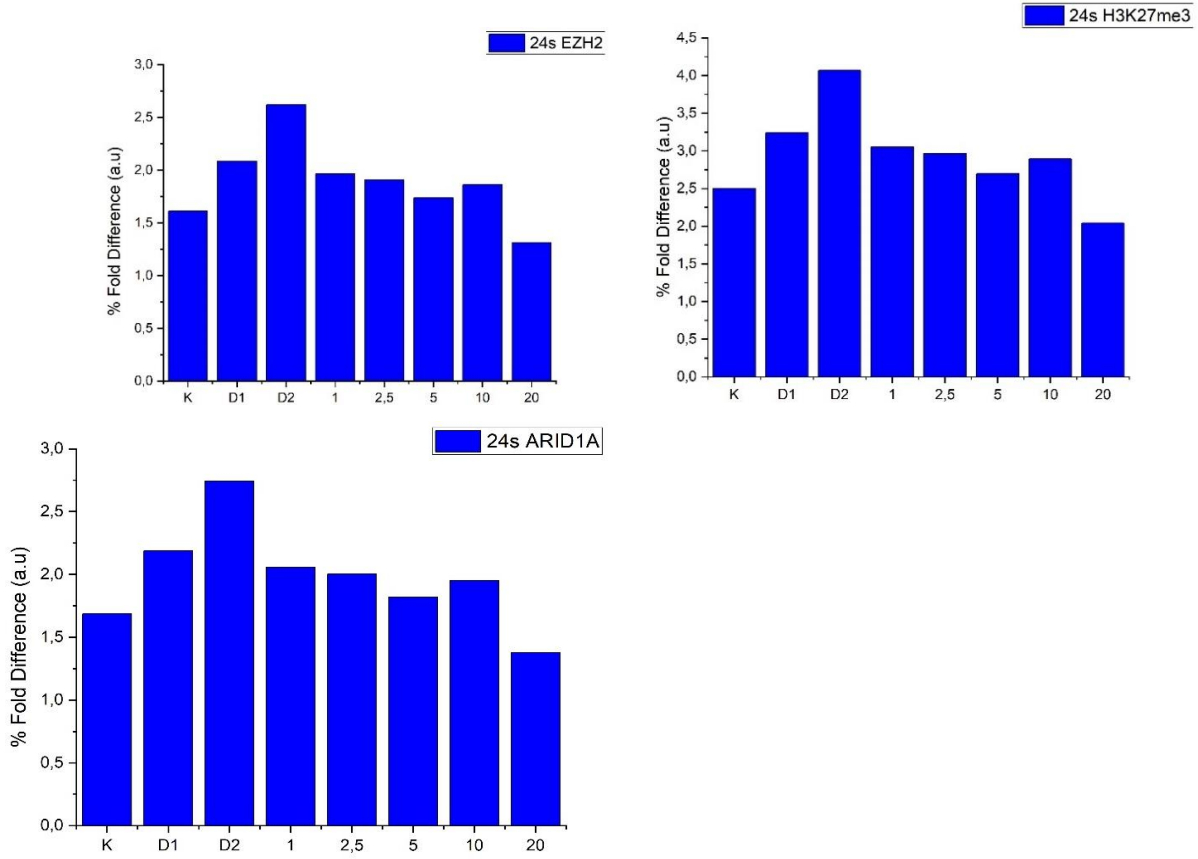
4.4. Western Blot Analizi ile Jurkat Hücrelerinde GSK126 Kullanılarak EZH2 ve H3K27me3 Etkilerinin Belirlenmesi

Jurkat hücrelerinde GSK126 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M grupları ile yapılan deney seti 24, 72 ve 120 saat inkübasyon sonrası sentetik letal etkiyi değerlendirebilmek adına EZH2 protein ifade düzeylerinin testi için Western Blot (WB) analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir analizde protein miktarlarının eşit olduğunu göstermek için house-keepin bir gen olan GAPDH ve H3'ün ifade düzeyi analiz edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında EZH2'nin protein seviyelerine tek başına bakıldığında anlam ifade etmediği, EZH2'nin inhibisyonunu tespit etmek amacı ile H3K27me3'ün (H3K27me3; DNA paketleme proteini olan H3'ün epigenetik modifikasyonu Lizin 27'nin H3 proteini üzerindeki trimetilasyonunu gösteren proteindir. EZH2 histon metilasyonunun transkripsiyonun baskılanmasıyla ilişkili epigenetik işareti olan Lizin27 üzerindeki H3 trimetilasyonunu katalizler. Bu bağlamda eğer EZH2 inhibe edilmişse kataliz gerçekleşmeyeceği için H3K27me3 protein seviye ifadesi de tespit edilemeyecektir.) protein seviyelerindeki ifadeleri analiz edilmiştir. Yapılan işlem sonrasında elde edilen veriler aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 16. Jurkat hücre grubunda GSK126'nın 24 saatte WB sonuçları

(Şekilde gösterilen K: kontrol grubunu, D1: DMSO 1 μ M grubunu, D2: DMSO 20 μ M grubunu ve GSK'nın farklı dozlarla muamele edilen gruplarını ifade etmektedir).

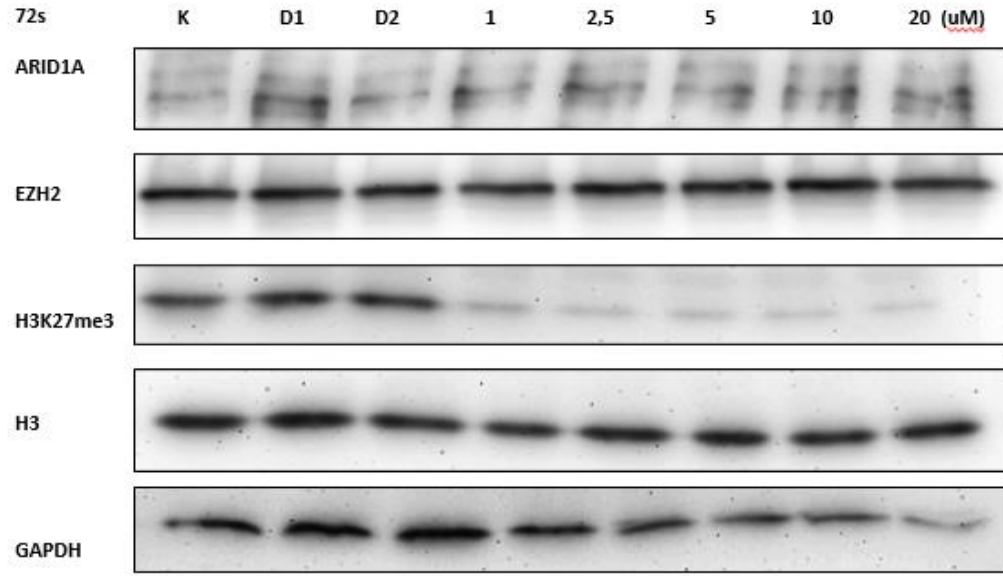


Şekil 17. 24 Saatte WB istatistik sonuçlarının densitometrik analizi.

Yukarıdaki şekilde de gösterildiği üzere Western Blot analizi ile 24 saat sonrasında; ARID1A, EZH2 ve H3K27me3 protein seviyeleri GAPDH ile karşılaştırılarak kontrol grubu ve GSK126'ya maruz bırakılan gruplarda EZH2 seviyelerinde bir farklılık olmadığı ancak kontrole kıyasla H3K27me3 seviyelerinde GSK126 ile muamele edilen grupların seviyelerinin azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda 72 ve 120 saatte GSK126 ile deney seti kurulmaya karar verilmiştir.

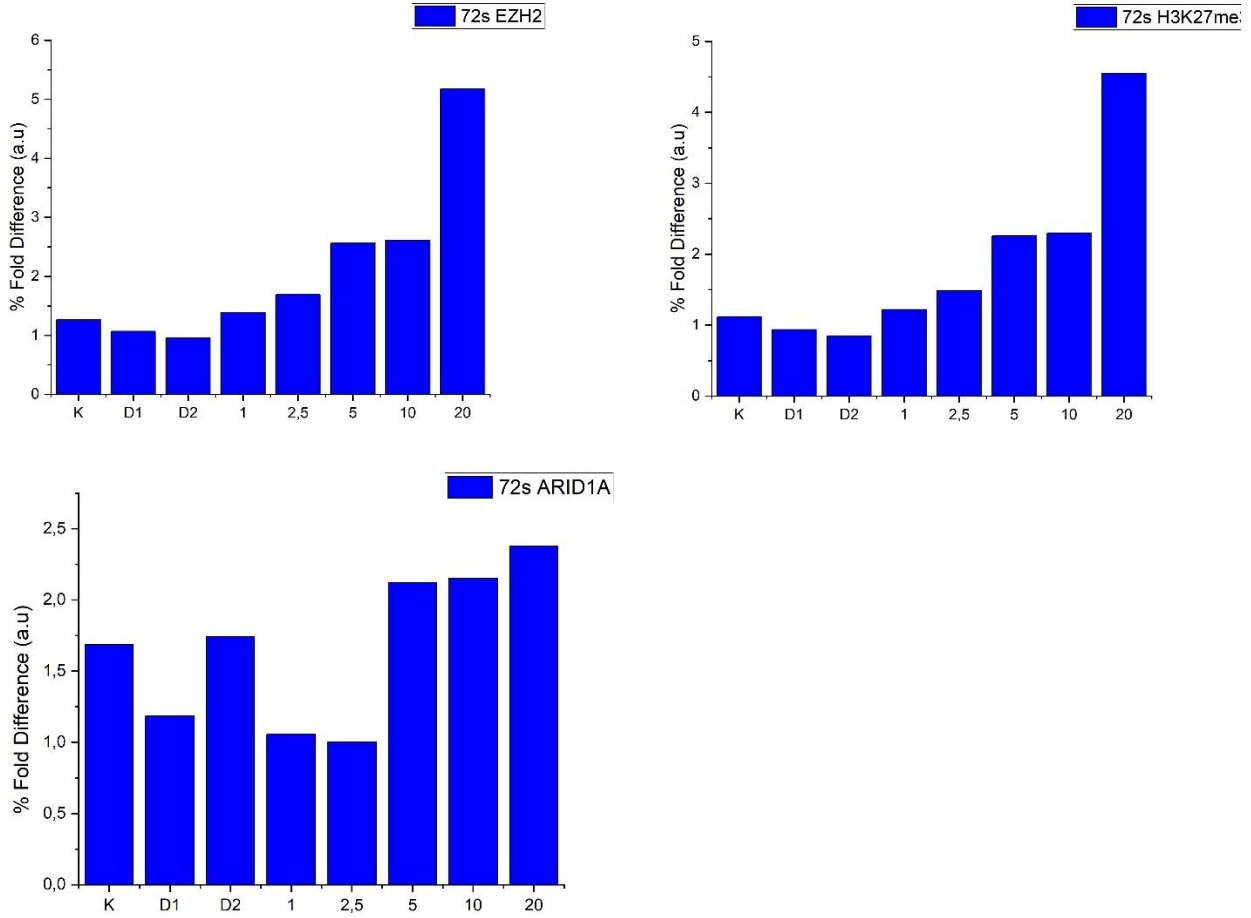
Jurkat hücrelerinde GSK126 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M grupları ile yapılan deney seti 72 saat inkübasyon sonrası sentetik letal etkiyi değerlendirebilmek adına EZH2 protein ifade düzeylerinin testi için Western Blot (WB) analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir analizde protein miktarlarının eşit olduğunu göstermek için house-keepin bir gen olan GAPDH ve H3'ün ifade düzeyi analiz edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında EZH2'nin protein seviyelerine tek

başına bakıldığında anlam ifade etmediği, EZH2'nin inhibisyonunu tespit etmek amacı ile H3K27me3'ün (H3K27me3; DNA paketleme proteini olan H3'ün epigenetik modifikasyonu Lizin 27'nin H3 proteini üzerindeki trimetilasyonunu gösteren proteindir. EZH2 histon metilasyonunun transkripsiyonun baskılanmasıyla ilişkili epigenetik işareti olan Lizin27 üzerindeki H3 trimetilasyonunu katalizler. Bu bağlamda eğer EZH2 inhibe edilmişse kataliz gerçekleşmeyeceği için H3K27me3 protein seviye ifadesi de tespit edilemeyecektir.) protein seviyelerindeki ifadeleri analiz edilmiştir. WB sonrası analizi yapılan proteinlere ait bant görüntüleri Şekil 16'de gösterilmiştir.



Şekil 18. Jurkat hücre grubunda GSK126'nın 72 saatte WB sonuçları

(Şekilde gösterilen K: kontrol grubunu, D1: DMSO 1 μ M grubunu, D2: DMSO 20 μ M grubunu ve GSK'nın farklı dozlarla muamele edilen gruplarını ifade etmektedir).

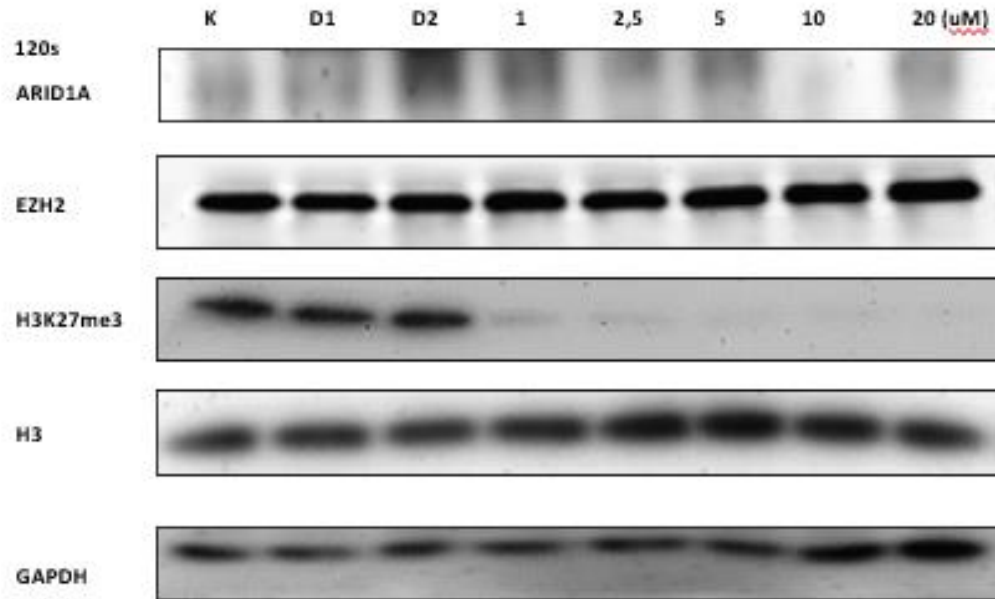


Şekil 19. 72 Saatte WB istatistik sonuçlarının densitometrik analizi.

Yukarıdaki şekilde de gösterildiği üzere WesternBlot analizi ile 72 saatte; ARID1A, EZH2 ve H3K27me3 protein seviyeleri GAPDH ile karşılaştırılarak kontrol grubu ve GSK126'ya maruz bırakılan gruplarda EZH2 seviyelerinde bir farklılık olmadığı ancak kontrole kıyasla H3K27me3 seviyelerinde GSK126 ile muamele edilen grupların GSK126 1 μ M grubundan itibaren önemli ölçüde seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda H3K27me3 ifadesinin net bir biçimde silindiğini görmek ve EZH2'nin inhibe edildiğini kanıtlamak için 120 saatte GSK126 ile deney seti kurulmaya karar verilmiştir.

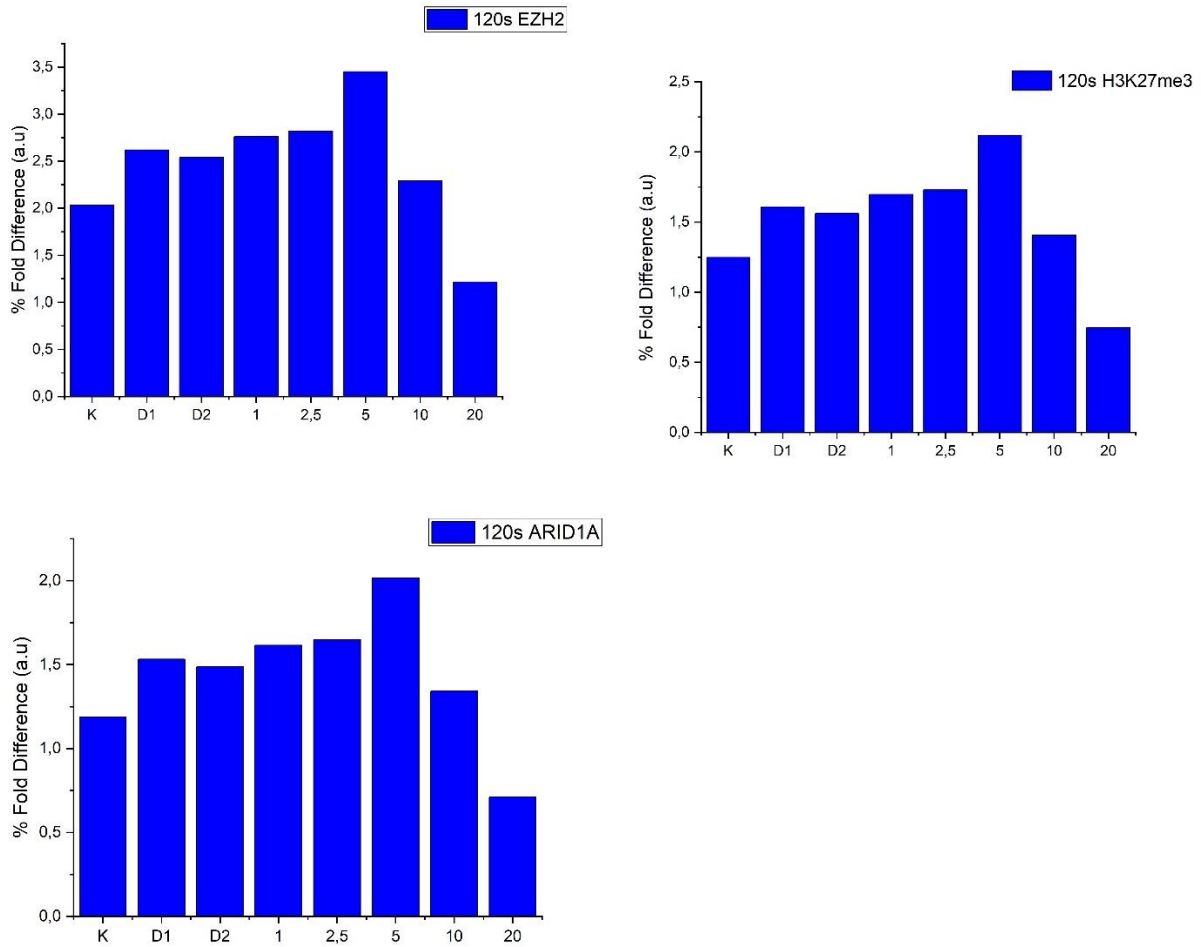
Jurkat hücrelerinde GSK126 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M grupları ile yapılan deney seti 120 saat inkübasyon sonrası sentetik letal etkiyi değerlendirebilmek adına EZH2 protein ifade düzeylerinin testi için Western Blot (WB) analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir

analizde protein miktarlarının eşit olduğunu göstermek için house-keeping bir gen olan GAPDH ve H3'ün ifade düzeyi analiz edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında EZH2'nin protein seviyelerine tek başına bakıldığında anlam ifade etmediği, EZH2'nin inhibisyonunu tespit etmek amacı ile H3K27me3'ün (H3K27me3; DNA paketleme proteini olan H3'ün epigenetik modifikasyonu Lizin 27'nin H3 proteini üzerindeki trimetilasyonunu gösteren proteindir. EZH2 histon metilasyonunun transkripsiyonun baskılanmasıyla ilişkili epigenetik işareti olan Lizin27 üzerindeki H3 trimetilasyonunu katalizler. Bu bağlamda eğer EZH2 inhibe edilmişse kataliz gerçekleşmeyeceği için H3K27me3 protein seviye ifadesi de tespit edilemeyecektir.) protein seviyelerindeki ifadeleri analiz edilmiştir. WB sonrası analizi yapılan proteinlere ait bant görüntüleri Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 20. Jurkat hücre grubunda GSK126'nın 120 saatte WB sonuçları

(Şekilde gösterilen K: kontrol grubunu, D1: DMSO 1 μM grubunu, D2: DMSO 20 μM grubunu ve GSK'nın farklı dozlarla muamele edilen gruplarını ifade etmektedir).



Şekil 21. 120 Saatte WB istatistik sonuçlarının densitometrik analizi.

Şekil 20’de gösterildiği üzere Western Blot analizi ile 120 saatte; ARID1A, EZH2 ve H3K27me3 protein seviyeleri GAPDH ile karşılaştırılarak kontrol grubu ve GSK126’y maruz bırakılan gruplarda EZH2 seviyelerinde bir farklılık olmadığı ancak kontrole kıyasla H3K27me3 seviyelerinde GSK126 ile muamele edilen grupların seviyelerinde önemli ölçüde azaldığı ve 5 μ M’den itibaren silindiği tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Gündelik yaşamda milyonlarca kez yaşanan ve anlık olarak herhangi bir şekilde hissetmediğimiz hücre bölünmeleri hücresel yaşamın en doğal aktivitelerinden birisidir. Bu aktivite sürekli ve düzenli olarak gerçekleşmekle beraber hücresel bir kontrol mekanizması ile de denetimi sağlanmaktadır. Bu denetimin sebebi gerekli olan hücrelerin gerekli olan bölgeler için üretilmesi, gereksiz olarak çoğalma gerçekleşmemesi, olası bir mutasyon durumu var ise bu mutasyonlu hücrelerin bölünmeye devam etmemesi, hücresel bir anomali veya bozukluk durumlarında hücrelerin çoğalmamaları gibi durumları kapsamaktadır. Yine bu bölünme safhasında önemli bir yapı elemanı olarak görev alan kromatin yeniden modellenmesi görevine etki eden bir gen grubu bulunmaktadır. Bu gen grubuna SWI/SNF gen grubu denmektedir. Bu kompleks yapı kromatin ipliklerinin oluşumunda yer alan proteinlerin salgılanmasıyla ilişkilidir. Bu gen grubunun içerisinde ARID1A özellikle göze çarpan ve üzerine çalışmalar yapılmış bir gen grubu olarak göze çarpmaktadır. Kanser hücrelerinin genetik olarak incelendiği çalışmalarda ARID1A mutasyonu göze çarpmaktadır. Bu yüzden bu gen kompleksi ve özellikle ARID1A geni ile ilgili yapılan çalışmalara ek olarak bu çalışmada da ARID1A geninin sentetik letalitesiyle alakalı olarak çalışmalar ortaya koyulmuştur. Bu gen ailesine ek olarak polycomb baskılayıcı kompleks adı verilen ve EZH2 geni tarafından salgılanan EZH2 enzimi de hücre bölünmesinde oldukça etkili bir araçtır. Bu komponentin salgılanmasıyla beraber hücrenin bölünme mekanizmaları olan metilasyon ve histonlaşma durumlarında baskı meydana gelmektedir. Oluşan bu baskıyla beraber hücreler bölünememekte ve bir letalite durumu meydana gelebilmektedir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmanın da genel amacı Jurkat hücrelerinde ARID1A mutasyonlarına sahip olduğunu gözlemlemek ve bu mutasyona sahip olduğu görülen hücrelerin EZH2 inhibe edilerek ortaya çıkan sentetik letalite durumunun incelenmesidir.

Sentetik letalite durumu incelendiğinde iki genden birinin inaktif diğerinin ise bir inhibitör ile inaktif duruma getirilmesi sonucu ortaya çıkan letal etki “sentetik letal etki” olarak bilinmektedir. Yapılan tez çalışmasında akut lenfoblastik lösemide ARID1Amt Jurkat hücrelerinde EZH2’nin GSK2816126 ile inhibe edilmesiyle ARID1A ve EZH2 arasında

sentetik letal etki araştırılmıştır.

Çalışmada öncelikle Jurkat hücrelerinde 24, 72 ve 120 saatte ve artan dozlarda (1, 2.5, 5, 10 ve 20 μ M) GSK126 ile muamele edilerek metabolik değişimleri WST-1 testi ile analiz edilmiştir. Yapılan testlerin ortaya koyduğu sonuçlar doğrultusunda süre ve doza bağlı olarak hücre canlılığında bir azalma meydana gelmiştir. Jurkat hücrelerinin metabolik aktivasyonlarında meydana gelen bu azalma hücre çoğalmasının gerçekleşmediğinin ayrıca hücrelerde hücre ölümü olduğunu göstermektedir. Yaptığımız Annexin V deney planlamasında Jurkat hücrelerinin 24, 72 ve 120 saatte ve artan dozlarda GSK126'ya maruz bırakılması sonucunda yapılan 'Annexin V' analizlerinde gösterildiği şekilde hücre ölüm oranlarının da arttığı görülmektedir. 'Annexin V' analizleriyle elde edilen apoptozis verileri 'WST-1' verilerine göre zaman artışına bağlı olarak meydana gelen metabolik aktivitedeki azalmayı destekler nitelikte olup benzer sonuçlar elde edilmiştir. Woo ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış oldukları bir çalışmada çalışmamıza benzer olarak B lenfosit kanser hücre hattında EZH2 inhibe edilmeye çalışılmış ve etkileyecek kimyasal olarak çalışmamızdan farklı olarak tansindiol adı verilen bir bileşik kullanılmıştır. Sonuç olarak EZH2 inhibesi gerçekleştirilmiş ve bu inhibeye bağlı olarak kanser hücresindeki proliferasyonun azaltılabildiği ortaya koyulmuştur. Çalışmada B lenfosit hücre hattına ek olarak birkaç kanser hücre hattı da çalışılmış ve değişkenlik göstermekle birlikte yine inhibe olan EZH2 sonuç olarak hücre hatlarının proliferasyonunda azalmasıyla sonuçlanmıştır. Bu da çalışmamızın sonuçlarına benzer bir sonuç ortaya koyarak kimyasallar değişse bile EZH2 aktivasyonunun değişkenliğinin hücrelerin büyümesi ve gelişmesini etkilediğini ve buna bağlı olarak bu birimi inhibe ederek kansere karşı mücadele edilebileceğini ortaya koymuştur (Jimin Woo 2014). EZH2 inhibisyonuna neden olabilecek daha farklı kimyasallar bulunması veya kullanılacak kimyasalların diğer komponentlerle ortaklaşa çalışılabilecek bir duruma sokulması kanser ilaçlarının gelişimi açısından büyük bir önem arz etmektedir. Yamada ve arkadaşlarının 2020 yılında gerçekleştirilmiş olduğu başka bir çalışmada ise mide kanseri üzerinde çalışmalarını yapmışlardır. Yapılan çalışmada özellikle mide kanseri vakalarında suprese edildiği görülen ARID1A geninin aktivasyonu ve EZH2 aktivasyonunun hücrenin proliferasyonunun nasıl etkilediği incelenmiştir. EZH2 aktivasyonunun azalmasına bağlı olarak özellikle ARID1A geninin aktivitesinin artması amaçlanarak yapılan çalışmada hem kompleksin etkisinin baskılanarak azaltılması sonucu kanser hücrelerinin büyümesinin yavaşlatıldığı ayrıca genin

ekspresyonunun artmasına bağlı olarak da tümör hücrelerinin baskılanması sağlanmıştır. EZH2 inhibitörleri kullanarak enzimin aktivitesinin azaltılmasını hedefleyen çalışma grubu sonuçlarını WST ve hücre assay çalışmalarıyla kontrol etmişlerdir. Sonuç olarak bakıldığında EZH2 inhibisyonu kanser hücrelerinin proliferasyonunu olumsuz yönde etkilediğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada yine kullanılacak EZH2 inhibitörlerinin anti kanser tedavilerinde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (Yamada ve diğerleri 2021).

Knutson ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada EPZ005687 adlı bir kimyasal madde EZH2 inhibitörü olarak kullanılmış ve özellikle kimyasalın kullanımını sonucunda EZH2'nin histon metillenmesi açısından etkilerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada lenfoma hücreleri çalışılmış ve EZH2 aktivasyonunun hem hücrenin canlılığı hem de histon metillenmesi açısından etkileri incelenmiştir. Kullanılan EPZ005687 kimyasalının etkileri incelendiğinde EZH2'nin inhibisyonu görülmüştür. Bu duruma bağlı olarak özellikle non-Hodgkin tipi lenfoma hücrelerinde nokta mutasyonlarının çoğalmasında etkisi olduğu düşünülen H3K27 histonunun aktivasyonunda azalma meydana getirmiştir. Bu azalma sayesinde hem hücre canlılığı hem de hücresel mutasyon açısından incelendiğinde EZH2 inhibisyonu lenfoma hücrelerinin çoğalmasında bir azalma meydana getirebilmiştir. Toplamda 11 günlük bir etkinlik süresi ölçülmüş olup en etkili sürenin 6. gün olduğu görülmüştür. Uygulanacak dozunda çalışmada oldukça önemli olduğu görülmektedir. Bu  alışma özelinde bakıldığında uygulanacak dozun 6 uM geçmesi sonrasında hücresel aktivasyonda herhangi bir olumsuz değişiklik gözlemlenmemektedir. Çalışmamızla bağlantılı olarak bu çalışmada göstermektedir ki kullanılan inhibitör farklı olsa da EZH2'nin inhibe edilmesi birçok farklı kanser türünde kanser hücrelerinin proliferasyonu ve canlılıkları açısından olumsuz bir etki yaratmaktadır. EZH2 inhibisyonunun kanser hücreleri üzerinde ki olumsuz etkilerinin daha detaylı ve daha farklı incelendiği bu çalışmada çalışmamıza benzer sonuçlar ortaya koyarak, yapılan çalışmanın güvenilirliği ve tekrar edilebilirliği açısından güvenli bir yerde olduğunu ortaya koymaktadır (Knutson ve diğerleri 2012).

Devarajan ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise akciğer kanseri üzerinde EZH2 inhibisyonun etkileri araştırılmıştır. Kemik kanserlerinde en çok ölüm nedeninin akciğer metastazına bağlı olarak geliştiğini ve buna bağlı olarak kemik kanseri hücrelerinden metastatik olarak büyüyen akciğer kanseri hücrelerinin reseptörlerini inceleyen ekip, bu

reseptörlere karşı herhangi bir antibody olmadığını görmüşlerdir. Bu reseptörlerin aktivasyonları incelendiğinde EZH2 aktivasyonunun artmasıyla beraber bu reseptörlerin de aktivasyonunda bir yükselme olduğu dikkatlerini çekmiştir. Bu aktivasyon ortaklığı incelendiğinde GSK126 kimyasalı kullanılarak EZH2 aktivasyonunun inhibe edilmesi amaçlanmış ve olası inhibisyonun reseptörlerin aktivasyonunun etkileyip etkilemeyeceği incelenmek istenmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında kullanılan GSK126 doz ve uygulama süresine bağlı olarak değişiklik göstermekle beraber EZH2 inhibisyonunda aktif bir rol oynamaktadır. EZH2'nin inhibisyonuna bağlı olarak akciğer metastazında etkili olduğu düşünülen reseptörlerinde aktivasyonunda bir azalma meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Bu azalmanın histon metilasyonunun baskılanmasıyla alakası olduğunu düşünmüşlerdir. EZH2 inhibisyonuna bağlı olarak histon metilasyonu de inhibe edilmiş ve buna bağlı olarak reseptörlerinde inhibisyonu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bulguların sonucunda kanser hücrelerinde EZH2'nin inhibisyonunun sağlanması kanser tedavisi açısından bakıldığında oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Devarajan ve diğerleri 2024).

Jurkat hücrelerinde 24 ve 72 saatte yapılan hücre döngüsü analizinde ilk 24 saatte G0/G1 evresinde arrest olduğu ancak artan sürede önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. SWI/SNF kompleksi içerisinde yer alan ARID1A hücre döngüsüne özgü genlerin ekspresyonunda önemli bir rolü olduğu ve hücre döngüsünü G0/G1 fazında durduğu bilinmektedir. ARID1A'nın CDK2/CDK4 kompleksine bağlanarak özellikle G1 fazında hücre döngüsünü durdurduğu yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir (Radhika M 2020). ARID1A inaktive olan Jurkat hücrelerinde EZH2'nin inhibisyonu ile yaratılan sentetik letal ilişkisinde yapılan hücre döngüsü analizinde de hücrelerin G0/G1 fazında durduğu ve bu durumun nedeni olarak özellikle G0/G1 geçişlerini düzenleyen CDK3'ün rolünün araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Jurkat hücrelerinde artan dozlarda uygulanan GSK126 ile 24, 72 ve 120 saat inkübe edilerek yapılan WB testi sonucunda kontrol grubuna kıyasla EZH2'nin inhibe edildiği H3K27me3 protein seviyelerindeki azalma ile tespit edilmiştir. Theresa E. León (2020) tarafından yapılan çalışmalarda 2 µmol/L GSK126 ile 7 gün inkübasyon sonrası EZH2'nin inhibe olduğunu H3K27me3 seviyelerindeki azalma ile saptamışlardır. Burada EZH2'nin inaktivasyonunu H3K27me3 protein seviyelerindeki azalma ile belirleyebilmemizin sebebi H3K27me3

proteininin; DNA paketleme proteini olan H3'ün epigenetik modifikasyonu Lizin 27'nin H3 proteini üzerindeki trimetilasyonunu gösteren protein olmasıdır. EZH2 histon metilasyonunun transkripsiyonun baskılanmasıyla ilişkili epigenetik işareti olan Lizin27 üzerindeki H3 trimetilasyonunu katalizler. Bu nedenle eğer EZH2 inhibe edilmişse kataliz gerçekleşmeyeceği için H3K27me3 protein seviye ifadesi de tespit edilemeyecektir. Başka bir çalışmada ise Delong Zeng kök hücre benzeri miyelom hücrelerinde EZH2'nin inhibisyonu için gene GSK126 kullanmışlar ve EZH2'nin inhibisyon kanıtı olarak H3K27me3'ü göstermişlerdir. Dolayısı ile çalışmamızda kullandığımız verilerimiz literatür ile örtüşmektedir. Özetle; GSK 126'nın 24,72 ve 120 saat inkübasyonu sonrasında Jurkat hücreleri üzerinde meydana getirdiği metabolik aktivite değişimleri 'WST-1' testi ve 'Annexin V' testi ile analiz edilmiştir. Yapılan testlerden ortaya çıkan sonuçların ışığında GSK126 ile ayrı ayrı muamele edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla zaman artışına bağlı olarak metabolik aktivitede azalma olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber "WST-1 testi, Annexin V ve Hücre Döngüsü testi" ile analiziyle elde edilen sonuçlar 'Western Blot' ile yöntemi ile ARID1A, EZH2, H3K27me3 ve H3'ün protein seviyeleri analiz edilerek desteklenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; Akut lenfoblastik lösemide ARID1A ve EZH2 arasında sentetik letal interaksiyon ilişkisi araştırılmıştır.

Sonuç olarak;

- 1) GSK2816126 muamelesi ile EZH2 inhibisyonu sağlanan Jurkat hücrelerinde H3K27me3'ün protein seviyelerindeki görülen azalma ile tespit edilmiştir.
- 2) Jurkat hücre hattında EZH2'nin inhibe edilmesi zaman ve doza bağlı bir şekilde hücrelerin canlılığını azaltmakta ve apoptozisi indüklemektedir.
- 3) 10 μ M GSK2816126 ile 120 saat boyunca muamele edilen Jurkat hücrelerinin hücre canlılığı %60 oranında azalttığı ve apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir.
- 4) Hücre döngüsü analizi ile yapılan deneylerin sonucunda 24 saatte GSK281626 ile muamelesi ile G0/G1 evresinde arresti tespit edilmiştir.
- 5) mtARID1A Jurkat hücre hattında GSK2816126 ile EZH2'nin inhibe edilmesi ile apoptoz aracılı sentetik letal etkiye yol açmış olup bu sonuçların ışığında ARID1A defektif Akut Lenfoblastik Lösemide EZH2'nin inhibisyonu terapötik bir hedef olabileceğine işaret etmektedir.

7. KAYNAKÇA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. (2006). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia, PA: W.B Saunders Co, Updated edition
- Alberts, B.L., Roberts, K., Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell, 4th Edition. New York: Garland Science.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M.T. (1976). Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol.* 33:451-458.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Fladrin, G., Galton, D.A.G., Gralnick, H.R., Sultan, C. (1981). French-American - British (F A B) Cooperative Group: The Morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol.* 47:533-561.
- Bitler BG, Aird KM, Garipov A, Li H, Amatangelo M, Kossenkov AV, et al. Synthetic Lethality by Targeting EZH2 Methyltransferase Activity in ARID1A-Mutated Cancers. *NatMed* (2015) 21(3):231–8. doi: 10.1038/ nm.3799
- By Alberto M. Marmont, Mary M. Horowitz, Robert Peter Gale, Kathleen Sobocinski, Robert C. Ash, Dirk W. van Békum, Richard E. Champlin, Karel A. Dicke, John M. Goldman, Robert A. Good, Roger H. Herzig, Richard Hong, Tohru Masaoka, Alfred A. Rimm, Olle Ringdén, Bruno Speck, Roy S. Weiner, and Mortimer M. Bortin. 0 (1991) by The American Society of Hematology. 0006-4971 191 17808-0024\$3.00/0
- Champlin, R., Golde, D.W. (1991). The leukemias. In: Harrison's Principles of Internal Medicine II Philadelphia: Saunders. 1552-1561.
- Chang MT, Asthana S, Gao SP, Lee BH, Chapman JS, Kandoth C, et al. Identifying Recurrent Mutations in Cancer Reveals Widespread Lineage Diversity and Mutational Specificity. *Nat Biotechnol* (2016) 34(2):155–63. doi: 10.1038/nbt.3391
- Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* Jan 31;358(5):502-11.
- Devarajan, E., Davis, R.E., Beird, H.C. *et al.* Targeting IL-11R/EZH2 signaling axis as a therapeutic strategy for osteosarcoma lung metastases. *Discov Onc* 15, 232 (2024). <https://doi.org/10.1007/s12672-024-01056-3>

- Hinds, P., Gattuso, J., Fletcher, A. *et al.* Quality of life as conveyed by pediatric patients with cancer. *Qual Life Res* **13**, 761–772 (2004).
<https://doi.org/10.1023/B:QURE.0000021697.43165.87>
- Huang J, Gou H, Yao J, et al. The noncanonical role of EZH2 in cancer. *Cancer Sci.* 2021;112: 1376–1382. <https://doi.org/10.1111/cas.14840>
- Huang, A., Garraway, L. A., Ashworth, A., Weber, B. 2020. "Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery". *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(1), 23–38.
- Jimin Woo, Hyun-Young Kim, Byung Jin Byun, Chong-Hak Chae, Ji Young Lee, Shi Yong Ryu, Woo-Kyu Park, Heeyeong Cho, Gildon Choi, Biological evaluation of tanshindiols as EZH2 histone methyltransferase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 24, Issue 11, 2014, Pages 2486-2492, ISSN 0960-894X, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.010>.
- Knutson SK, Wigle TJ, Warholik NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, et al. A Selective Inhibitor of EZH2 Blocks H3K27 Methylation and Kills Mutant Lymphoma Cells. *Nat Chem Biol* (2012) 8(11):890–6. doi: 10.1038/nchembio.1084
- Knutson, S., Wigle, T., Warholik, N. *et al.* A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* **8**, 890–896 (2012).
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1084>
- Liang H, Cheung LW, Li J, Ju Z, Yu S, Stemke-Hale K, et al. Whole-Exome Sequencing Combined With Functional Genomics Reveals Novel Candidate Driver Cancer Genes in Endometrial Cancer. *Genome Res* (2012) 22 (11):2120–9. doi: 10.1101/gr.137596.112.
- Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Ashworth, A. 2015. "Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors". *Annual Review of Medicine*, 66(1), 455–470.
- Niemeyer, C.M., Sallan, S.E. (1993). Acute Iymphoblastik leukemia In:Oski FA, Nayhan DG editors. *Hematology of Infancy and Childhood II*. Philedelphia; Saunders. 1249-1353.
- Poplack, D.G., Morgolin. (1997). Management of common cancers of childhood. Poplack DG, editors. *Principles and Practice of Pediatric Oncology I*. Philedelphia: Saunders. 409-504.
- Pui, C.H., Relling, M.V., Downing, J.R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* Apr 8;350(15):1535-48.

- Radhika M. ARID1A Loss in Cancer: Towards a Mechanistic Understanding. *Pharmacol Ther* (2018) 190:15–23. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.001
- Shiffman, F. (1998). *Hematologic Pathophysiology*. Rhode Island: Lippincott-Raven.
- Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The Role of Mutations in Epigenetic Regulators in Myeloid Malignancies. *Nat Rev Cancer* (2012) 12 (9):599–612. doi: 10.1038/nrc3343
- Sklar, J., Weiss, L, M. (1988). Applications of antigen receptor gene rearrangements to the diagnosis and characterization of lymphoid neoplasms. *Ann Rev Med*. 39:315-334
- Takahashi, K. ve Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by
- Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Cao, J., Hu, J., Lee, J., Suliyanto, K., Ma, D., Zhang, B., Chen, M. and Cai, X. (2020). Advances in synthetic lethality for cancer therapy: cellular mechanism and clinical translation. *Journal of hematology & oncology*, 13(1): 118.
- Toy Y, Sever A, Erdoğan M K, Gündoğdu R, 2022. Defektif Homolog Rekombinasyon DNA Tamiri ve PARP İnhibisyonu Arasındaki Sentetik Letal Etkileşim. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(4): 2459 – 2475
- Wiegand, K.C. et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N. Engl. J. Med*. 363, 1532–1543 (2010)
- Wilsker D, Patsialou A, Zumbun SD, Kim S, Chen Y, Dallas PB and Moran E: The DNA binding properties of the ARID-containing subunits of yeast and mammalian SWI/SNF
- Wu RC, Wang TL, Shih IEM. The Emerging Roles of ARID1A in Tumor Suppression. *Cancer Biol Ther* (2014) 15(6):655–64. doi: 10.4161/cbt.28411
- Xu S and Tang C (2021) The Role of ARID1A in Tumors: Tumor Initiation or Tumor Suppression? *Front. Oncol*. 11:745187. doi: 10.3389/fonc.2021.745187
- Yamada, L., Saito, M., Thar Min, A.K. *et al*. Selective sensitivity of EZH2 inhibitors based on synthetic lethality in ARID1A-deficient gastric cancer. *Gastric Cancer* **24**, 60–71 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10120-020-01094-0>

BİLİMSEL ETİK BEYANI

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Akut Lenfoblastik Lösemide ARID1A ve EZH2 Arasında Sentetik Letal İnteraksiyon İlişkisinin Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Akıncan KOLUMAN

.../.../....

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Akıncan KOLUMAN
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Ankara/ 07.01.1998
E-posta : akıncankoluman@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi	
Yüksek Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	Devam ediyor	
Lisans	Uşak Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2020	

EK-1

		MeanDiff	SEM	tValue	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
2,5	1	0,00733	98,56892	7,4398E-5	1	0,05	0	-368,62303	368,6377
5	1	-0,074	98,56892	-7,50744E-4	1	0,05	0	-368,70437	368,55637
5	2,5	-0,08133	98,56892	-8,25142E-4	1	0,05	0	-368,7117	368,54903
10	1	-0,12067	98,56892	-0,00122	1	0,05	0	-368,75103	368,5097
10	2,5	-0,128	98,56892	-0,0013	1	0,05	0	-368,75837	368,50237
10	5	-0,04667	98,56892	-4,73442E-4	1	0,05	0	-368,67703	368,5837
20	1	-0,14033	98,56892	-0,00142	1	0,05	0	-368,7707	368,49003
20	2,5	-0,14767	98,56892	-0,0015	1	0,05	0	-368,77803	368,4827
20	5	-0,06633	98,56892	-6,72964E-4	1	0,05	0	-368,6967	368,56403
20	10	-0,01967	98,56892	-1,99522E-4	1	0,05	0	-368,65003	368,6107
K	1	0,03133	98,56892	3,17882E-4	1	0,05	0	-368,59903	368,6617
K	2,5	0,024	98,56892	2,43484E-4	1	0,05	0	-368,60637	368,65437
K	5	0,10533	98,56892	0,00107	1	0,05	0	-368,52503	368,7357
K	10	0,152	98,56892	0,00154	1	0,05	0	-368,47837	368,78237
K	20	0,17167	98,56892	0,00174	1	0,05	0	-368,4587	368,80203
D1	1	-0,03967	98,56892	-4,02426E-4	1	0,05	0	-368,67003	368,5907
D1	2,5	-0,047	98,56892	-4,76824E-4	1	0,05	0	-368,67737	368,58337
D1	5	0,03433	98,56892	3,48318E-4	1	0,05	0	-368,59603	368,6647
D1	10	0,081	98,56892	8,2176E-4	1	0,05	0	-368,54937	368,71137
D1	20	0,10067	98,56892	0,00102	1	0,05	0	-368,5297	368,73103
D1	K	-0,071	98,56892	-7,20308E-4	1	0,05	0	-368,70137	368,55937
D2	1	197,16833	98,56892	2,00031	1	0,05	0	-171,46203	565,7987
D2	2,5	197,161	98,56892	2,00024	1	0,05	0	-171,46937	565,79137
D2	5	197,24233	98,56892	2,00106	1	0,05	0	-171,38803	565,8727
D2	10	197,289	98,56892	2,00153	1	0,05	0	-171,34137	565,91937
D2	20	197,30867	98,56892	2,00173	1	0,05	0	-171,3217	565,93903
D2	K	197,137	98,56892	1,99999	1	0,05	0	-171,49337	565,76737
D2	D1	197,208	98,56892	2,00071	1	0,05	0	-171,42237	565,83837

→ 24 Saat WST-1 testi istatistiği.

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
2,5 1	-0,265	0,02488	-10,64958	3,18193E-7	0,05	1	-0,35806	-0,17194
5 1	-0,35333	0,02488	-14,19944	4,85566E-9	0,05	1	-0,44639	-0,26027
5 2,5	-0,08833	0,02488	-3,54986	0,07468	0,05	0	-0,18139	0,00473
10 1	-0,36533	0,02488	-14,68168	2,94989E-9	0,05	1	-0,45839	-0,27227
10 2,5	-0,10033	0,02488	-4,0321	0,02701	0,05	1	-0,19339	-0,00727
10 5	-0,012	0,02488	-0,48224	1	0,05	0	-0,10506	0,08106
20 1	-0,53533	0,02488	-21,51348	8,67591E-12	0,05	1	-0,62839	-0,44227
20 2,5	-0,27033	0,02488	-10,86391	2,39956E-7	0,05	1	-0,36339	-0,17727
20 5	-0,182	0,02488	-7,31405	4,86882E-5	0,05	1	-0,27506	-0,08894
20 10	-0,17	0,02488	-6,8318	1,12876E-4	0,05	1	-0,26306	-0,07694
K 1	0,251	0,02488	10,08696	6,81737E-7	0,05	1	0,15794	0,34406
K 2,5	0,516	0,02488	20,73653	1,53302E-11	0,05	1	0,42294	0,60906
K 5	0,60433	0,02488	24,28639	1,31697E-12	0,05	1	0,51127	0,69739
K 10	0,61633	0,02488	24,76864	9,68935E-13	0,05	1	0,52327	0,70939
K 20	0,78633	0,02488	31,60044	2,11819E-14	0,05	1	0,69327	0,87939
D1 1	0,22633	0,02488	9,09568	2,82754E-6	0,05	1	0,13327	0,31939
D1 2,5	0,49133	0,02488	19,74525	3,26457E-11	0,05	1	0,39827	0,58439
D1 5	0,57967	0,02488	23,29511	2,52129E-12	0,05	1	0,48661	0,67273
D1 10	0,59167	0,02488	23,77736	1,83239E-12	0,05	1	0,49861	0,68473
D1 20	0,76167	0,02488	30,60916	3,49968E-14	0,05	1	0,66861	0,85473
D1 K	-0,02467	0,02488	-0,99128	1	0,05	0	-0,11773	0,06839
D2 1	0,24267	0,02488	9,75207	1,08944E-6	0,05	1	0,14961	0,33573
D2 2,5	0,50767	0,02488	20,40164	1,97146E-11	0,05	1	0,41461	0,60073
D2 5	0,596	0,02488	23,9515	1,63539E-12	0,05	1	0,50294	0,68906
D2 10	0,608	0,02488	24,43375	1,19836E-12	0,05	1	0,51494	0,70106
D2 20	0,778	0,02488	31,26555	2,50544E-14	0,05	1	0,68494	0,87106
D2 K	-0,00833	0,02488	-0,33489	1	0,05	0	-0,10139	0,08473
D2 D1	0,01633	0,02488	0,65639	1	0,05	0	-0,07673	0,10939

→ 72 Saat WST-1 testinin istatistiği.

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
2,5 1	-0,36733	0,06875	-5,34299	0,00185	0,05	1	-0,62445	-0,11022
5 1	-1,49467	0,06875	-21,74043	7,37353E-12	0,05	1	-1,75178	-1,23755
5 2,5	-1,12733	0,06875	-16,39744	5,58591E-10	0,05	1	-1,38445	-0,87022
10 1	-1,51733	0,06875	-22,07012	5,83817E-12	0,05	1	-1,77445	-1,26022
10 2,5	-1,15	0,06875	-16,72714	4,13019E-10	0,05	1	-1,40711	-0,89289
10 5	-0,02267	0,06875	-0,32969	1	0,05	0	-0,27978	0,23445
20 1	-1,567	0,06875	-22,79254	3,53987E-12	0,05	1	-1,82411	-1,30989
20 2,5	-1,19967	0,06875	-17,44956	2,17067E-10	0,05	1	-1,45678	-0,94255
20 5	-0,07233	0,06875	-1,05211	1	0,05	0	-0,32945	0,18478
20 10	-0,04967	0,06875	-0,72242	1	0,05	0	-0,30678	0,20745
K 1	0,18367	0,06875	2,67149	0,46814	0,05	0	-0,07345	0,44078
K 2,5	0,551	0,06875	8,01448	1,51671E-5	0,05	1	0,29389	0,80811
K 5	1,67833	0,06875	24,41192	1,21518E-12	0,05	1	1,42122	1,93545
K 10	1,701	0,06875	24,74162	9,85591E-13	0,05	1	1,44389	1,95811
K 20	1,75067	0,06875	25,46404	6,28622E-13	0,05	1	1,49355	2,00778
D1 1	0,17567	0,06875	2,55513	0,59311	0,05	0	-0,08145	0,43278
D1 2,5	0,543	0,06875	7,89812	1,8329E-5	0,05	1	0,28589	0,80011
D1 5	1,67033	0,06875	24,29556	1,30924E-12	0,05	1	1,41322	1,92745
D1 10	1,693	0,06875	24,62526	1,06087E-12	0,05	1	1,43589	1,95011
D1 20	1,74267	0,06875	25,34767	6,75287E-13	0,05	1	1,48555	1,99978
D1 K	-0,008	0,06875	-0,11636	1	0,05	0	-0,26511	0,24911
D2 1	0,107	0,06875	1,55635	1	0,05	0	-0,15011	0,36411
D2 2,5	0,47433	0,06875	6,89934	1,00147E-4	0,05	1	0,21722	0,73145
D2 5	1,60167	0,06875	23,29678	2,51848E-12	0,05	1	1,34455	1,85878
D2 10	1,62433	0,06875	23,62648	2,02347E-12	0,05	1	1,36722	1,88145
D2 20	1,674	0,06875	24,34889	1,26521E-12	0,05	1	1,41689	1,93111
D2 K	-0,07667	0,06875	-1,11514	1	0,05	0	-0,33378	0,18045
D2 D1	-0,06867	0,06875	-0,99878	1	0,05	0	-0,32578	0,18845

→ 120 Saat WST-1 testinin istatistiği

EK-2

	MeanDiff	SEM	tValue	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
D1 K	-0,92	1,48428	-0,61983	1	0,05	0	-6,47096	4,63096
D2 K	-1,39	1,48428	-0,93648	1	0,05	0	-6,94096	4,16096
D2 D1	-0,47	1,48428	-0,31665	1	0,05	0	-6,02096	5,08096
1 K	1,03333	1,48428	0,69618	1	0,05	0	-4,51763	6,58429
1 D1	1,95333	1,48428	1,31601	1	0,05	0	-3,59763	7,50429
1 D2	2,42333	1,48428	1,63266	1	0,05	0	-3,12763	7,97429
2,5 K	1,54667	1,48428	1,04203	1	0,05	0	-4,00429	7,09763
2,5 D1	2,46667	1,48428	1,66186	1	0,05	0	-3,08429	8,01763
2,5 D2	2,93667	1,48428	1,97851	1	0,05	0	-2,61429	8,48763
2,5 1	0,51333	1,48428	0,34585	1	0,05	0	-5,03763	6,06429
5 K	3,86333	1,48428	2,60283	0,53844	0,05	0	-1,68763	9,41429
5 D1	4,78333	1,48428	3,22265	0,14891	0,05	0	-0,76763	10,33429
5 D2	5,25333	1,48428	3,5393	0,07637	0,05	0	-0,29763	10,80429
5 1	2,83	1,48428	1,90664	1	0,05	0	-2,72096	8,38096
5 2,5	2,31667	1,48428	1,5608	1	0,05	0	-3,23429	7,86763
10 K	7,02	1,48428	4,72955	0,00635	0,05	1	1,46904	12,57096
10 D1	7,94	1,48428	5,34938	0,00182	0,05	1	2,38904	13,49096
10 D2	8,41	1,48428	5,66603	9,82253E-4	0,05	1	2,85904	13,96096
10 1	5,98667	1,48428	4,03337	0,02694	0,05	1	0,43571	11,53763
10 2,5	5,47333	1,48428	3,68752	0,05584	0,05	0	-0,07763	11,02429
10 5	3,15667	1,48428	2,12673	1	0,05	0	-2,39429	8,70763
20 K	5,51667	1,48428	3,71672	0,0525	0,05	0	-0,03429	11,06763
20 D1	6,43667	1,48428	4,33655	0,01429	0,05	1	0,88571	11,98763
20 D2	6,90667	1,48428	4,6532	0,00742	0,05	1	1,35571	12,45763
20 1	4,48333	1,48428	3,02054	0,22747	0,05	0	-1,06763	10,03429
20 2,5	3,97	1,48428	2,67469	0,46509	0,05	0	-1,58096	9,52096
20 5	1,65333	1,48428	1,11389	1	0,05	0	-3,89763	7,20429
20 10	-1,50333	1,48428	-1,01283	1	0,05	0	-7,05429	4,04763

→ 24 Saat Annexin V/7AAD testinin istatistigi.

	MeanDiff	SEM	tValue	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
D1 K	-0,07667	1,12895	-0,06791	1	0,05	0	-4,29876	4,14543
D2 K	1,62667	1,12895	1,44086	1	0,05	0	-2,59543	5,84876
D2 D1	1,70333	1,12895	1,50877	1	0,05	0	-2,51876	5,92543
1 K	2,74333	1,12895	2,42998	0,76277	0,05	0	-1,47876	6,96543
1 D1	2,82	1,12895	2,49789	0,6657	0,05	0	-1,40209	7,04209
1 D2	1,11667	1,12895	0,98912	1	0,05	0	-3,10543	5,33876
2,5 K	4,78667	1,12895	4,23991	0,01748	0,05	1	0,56457	9,00876
2,5 D1	4,86333	1,12895	4,30782	0,01517	0,05	1	0,64124	9,08543
2,5 D2	3,16	1,12895	2,79905	0,36026	0,05	0	-1,06209	7,38209
2,5 1	2,04333	1,12895	1,80993	1	0,05	0	-2,17876	6,26543
5 K	2,89333	1,12895	2,56284	0,58392	0,05	0	-1,32876	7,11543
5 D1	2,97	1,12895	2,63075	0,50871	0,05	0	-1,25209	7,19209
5 D2	1,26667	1,12895	1,12198	1	0,05	0	-2,95543	5,48876
5 1	0,15	1,12895	0,13287	1	0,05	0	-4,07209	4,37209
5 2,5	-1,89333	1,12895	-1,67707	1	0,05	0	-6,11543	2,32876
10 K	8,41667	1,12895	7,45527	3,82868E-5	0,05	1	4,19457	12,63876
10 D1	8,49333	1,12895	7,52318	3,41404E-5	0,05	1	4,27124	12,71543
10 D2	6,79	1,12895	6,01441	5,0469E-4	0,05	1	2,56791	11,01209
10 1	5,67333	1,12895	5,0253	0,00348	0,05	1	1,45124	9,89543
10 2,5	3,63	1,12895	3,21536	0,15121	0,05	0	-0,59209	7,85209
10 5	5,52333	1,12895	4,89243	0,00456	0,05	1	1,30124	9,74543
20 K	30,29	1,12895	26,83013	2,77405E-13	0,05	1	26,06791	34,51209
20 D1	30,36667	1,12895	26,89804	2,6663E-13	0,05	1	26,14457	34,58876
20 D2	28,66333	1,12895	25,38927	6,58198E-13	0,05	1	24,44124	32,88543
20 1	27,54667	1,12895	24,40015	1,22436E-12	0,05	1	23,32457	31,76876
20 2,5	25,50333	1,12895	22,59022	4,06613E-12	0,05	1	21,28124	29,72543
20 5	27,39667	1,12895	24,26728	1,33324E-12	0,05	1	23,17457	31,61876
20 10	21,87333	1,12895	19,37485	4,36942E-11	0,05	1	17,65124	26,09543

→ 72 Saat Annexın V/7AAD testinin istatistiği.

	MeanDiff	SEM	tValue	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
D1 K	-0,27	0,14009	-1,92734	1	0,05	0	-0,79391	0,25391
D2 K	-1,37667	0,14009	-9,82707	9,79866E-7	0,05	1	-1,90058	-0,85276
D2 D1	-1,10667	0,14009	-7,89973	1,82809E-5	0,05	1	-1,63058	-0,58276
1 K	2,13667	0,14009	15,25218	1,66571E-9	0,05	1	1,61276	2,66058
1 D1	2,40667	0,14009	17,17952	2,75283E-10	0,05	1	1,88276	2,93058
1 D2	3,51333	0,14009	25,07925	7,97536E-13	0,05	1	2,98942	4,03724
2,5 K	1,85667	0,14009	13,25345	1,34843E-8	0,05	1	1,33276	2,38058
2,5 D1	2,12667	0,14009	15,1808	1,78734E-9	0,05	1	1,60276	2,65058
2,5 D2	3,23333	0,14009	23,08052	2,91188E-12	0,05	1	2,70942	3,75724
2,5 1	-0,28	0,14009	-1,99873	1	0,05	0	-0,80391	0,24391
5 K	14,77667	0,14009	105,48037	9,94844E-23	0,05	1	14,25276	15,30058
5 D1	15,04667	0,14009	107,40771	7,44906E-23	0,05	1	14,52276	15,57058
5 D2	16,15333	0,14009	115,30744	2,39637E-23	0,05	1	15,62942	16,67724
5 1	12,64	0,14009	90,22819	1,20586E-21	0,05	1	12,11609	13,16391
5 2,5	12,92	0,14009	92,22691	8,4982E-22	0,05	1	12,39609	13,44391
10 K	52,05667	0,14009	371,59642	1,78522E-31	0,05	1	51,53276	52,58058
10 D1	52,32667	0,14009	373,52376	1,64342E-31	0,05	1	51,80276	52,85058
10 D2	53,43333	0,14009	381,42349	1,17581E-31	0,05	1	52,90942	53,95724
10 1	49,92	0,14009	356,34424	3,4905E-31	0,05	1	49,39609	50,44391
10 2,5	50,2	0,14009	358,34297	3,19173E-31	0,05	1	49,67609	50,72391
10 5	37,28	0,14009	266,11605	3,72682E-29	0,05	1	36,75609	37,80391
20 K	50,06333	0,14009	357,3674	3,33401E-31	0,05	1	49,53942	50,58724
20 D1	50,33333	0,14009	359,29474	3,05912E-31	0,05	1	49,80942	50,85724
20 D2	51,44	0,14009	367,19447	2,16018E-31	0,05	1	50,91609	51,96391
20 1	47,92667	0,14009	342,11522	6,699E-31	0,05	1	47,40276	48,45058
20 2,5	48,20667	0,14009	344,11394	6,10291E-31	0,05	1	47,68276	48,73058
20 5	35,28667	0,14009	251,88703	8,97628E-29	0,05	1	34,76276	35,81058
20 10	-1,99333	0,14009	-14,22902	4,70747E-9	0,05	1	-2,51724	-1,46942

→ 120 Saat Annexın V/7AAD testinin istatistiği

EK-3

	MeanDiff	SEM	tValue	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
D1 K	2,9	0,81343	3,56515	0,07231	0,05	0	-0,14208	5,94208
D2 K	6,26667	0,81343	7,70401	2,52345E-5	0,05	1	3,22459	9,30875
D2 D1	3,36667	0,81343	4,13886	0,02159	0,05	1	0,32459	6,40875
1 K	10,1	0,81343	12,41657	3,50828E-8	0,05	1	7,05792	13,14208
1 D1	7,2	0,81343	8,85142	4,08237E-6	0,05	1	4,15792	10,24208
1 D2	3,83333	0,81343	4,71256	0,00657	0,05	1	0,79125	6,87541
2,5 K	5,8	0,81343	7,13031	6,68269E-5	0,05	1	2,75792	8,84208
2,5 D1	2,9	0,81343	3,56515	0,07231	0,05	0	-0,14208	5,94208
2,5 D2	-0,46667	0,81343	-0,5737	1	0,05	0	-3,50875	2,57541
2,5 1	-4,3	0,81343	-5,28626	0,00207	0,05	1	-7,34208	-1,25792
5 K	10,2	0,81343	12,53951	3,03852E-8	0,05	1	7,15792	13,24208
5 D1	7,3	0,81343	8,97435	3,39046E-6	0,05	1	4,25792	10,34208
5 D2	3,93333	0,81343	4,8355	0,00511	0,05	1	0,89125	6,97541
5 1	0,1	0,81343	0,12294	1	0,05	0	-2,94208	3,14208
5 2,5	4,4	0,81343	5,4092	0,00162	0,05	1	1,35792	7,44208
10 K	12,33333	0,81343	15,16215	1,82063E-9	0,05	1	9,29125	15,37541
10 D1	9,43333	0,81343	11,597	9,43467E-8	0,05	1	6,39125	12,47541
10 D2	6,06667	0,81343	7,45814	3,81016E-5	0,05	1	3,02459	9,10875
10 1	2,23333	0,81343	2,74558	0,00219	0,05	0	-0,80875	5,27541
10 2,5	6,53333	0,81343	8,03184	1,47467E-5	0,05	1	3,49125	9,57541
10 5	2,13333	0,81343	2,62264	0,01718	0,05	0	-0,90875	5,17541
20 K	21,63333	0,81343	26,59523	3,18384E-13	0,05	1	18,59125	24,67541
20 D1	18,73333	0,81343	23,03008	3,01271E-12	0,05	1	15,69125	21,77541
20 D2	15,36667	0,81343	18,89122	6,44359E-11	0,05	1	12,32459	18,40875
20 1	11,53333	0,81343	14,17866	4,96266E-9	0,05	1	8,49125	14,57541
20 2,5	15,83333	0,81343	19,46492	4,0685E-11	0,05	1	12,79125	18,87541
20 5	11,43333	0,81343	14,05572	5,64907E-9	0,05	1	8,39125	14,47541
20 10	9,3	0,81343	11,43308	1,15765E-7	0,05	1	6,25792	12,34208

→ 24 Saat Hücre Döngüsü testinin istatistiği

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
D1 K	-2,4	2,16737	-1,10733	1	0,05	0	-10,50559	5,70559
D2 K	14,7	2,16737	6,78241	1,23248E-4	0,05	1	6,59441	22,80559
D2 D1	17,1	2,16737	7,88974	1,85818E-5	0,05	1	8,99441	25,20559
1 K	8,33333	2,16737	3,8449	0,04006	0,05	1	0,22775	16,43892
1 D1	10,73333	2,16737	4,95223	0,00404	0,05	1	2,62775	18,83892
1 D2	-6,36667	2,16737	-2,93751	0,27043	0,05	0	-14,47225	1,73892
2,5 K	13,4	2,16737	6,1826	3,68085E-4	0,05	1	5,29441	21,50559
2,5 D1	15,8	2,16737	7,28994	5,07412E-5	0,05	1	7,69441	23,90559
2,5 D2	-1,3	2,16737	-0,5998	1	0,05	0	-9,40559	6,80559
2,5 1	5,06667	2,16737	2,3377	0,91621	0,05	0	-3,03892	13,17225
5 K	20,56667	2,16737	9,48922	1,58709E-6	0,05	1	12,46108	28,67225
5 D1	22,96667	2,16737	10,59655	3,41432E-7	0,05	1	14,86108	31,07225
5 D2	5,86667	2,16737	2,70681	0,4355	0,05	0	-2,23892	13,97225
5 1	12,23333	2,16737	5,64432	0,00102	0,05	1	4,12775	20,33892
5 2,5	7,16667	2,16737	3,30662	0,12479	0,05	0	-0,93892	15,27225
10 K	13,2	2,16737	6,09033	4,3747E-4	0,05	1	5,09441	21,30559
10 D1	15,6	2,16737	7,19766	5,94721E-5	0,05	1	7,49441	23,70559
10 D2	-1,5	2,16737	-0,69208	1	0,05	0	-9,60559	6,60559
10 1	4,86667	2,16737	2,24542	1	0,05	0	-3,23892	12,97225
10 2,5	-0,2	2,16737	-0,09228	1	0,05	0	-8,30559	7,90559
10 5	-7,36667	2,16737	-3,39889	0,10272	0,05	0	-15,47225	0,73892
20 K	22,16667	2,16737	10,22744	5,61961E-7	0,05	1	14,06108	30,27225
20 D1	24,56667	2,16737	11,33477	1,31024E-7	0,05	1	16,46108	32,67225
20 D2	7,46667	2,16737	3,44503	0,09319	0,05	0	-0,63892	15,57225
20 1	13,83333	2,16737	6,38254	2,54203E-4	0,05	1	5,72775	21,93892
20 2,5	8,76667	2,16737	4,04484	0,0263	0,05	1	0,66108	16,87225
20 5	1,6	2,16737	0,73822	1	0,05	0	-6,50559	9,70559
20 10	8,96667	2,16737	4,13712	0,02167	0,05	1	0,86108	17,07225

→ 72 Saat Hücre Döngüsü testinin istatistiği