

**MESANE KANSER HÜCRELERİNDE HSP90
İNHİBİTÖRLERİNİN HİSTON METİLASYONU ÜZERİNE
ETKİSİ**

NURAN ÇOBAN

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ.DR. NURAY VAROL
Tez No:2018-002**

2018 - Afyonkarahisar

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MESANE KANSER HÜCRELERİNDE HSP90
İNHİBİTÖRLERİNİN HİSTON METİLASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

NURAN ÇOBAN

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

YRD.DOÇ.DR. NURAY VAROL

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından BAP 16.SAĞ.20 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No: 2018 – 002

2018 - AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 02/02/2018



Doç.Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Jüri Başkanı



Yrd.Doç.Dr. Gamze TURNA

Ahi Evran Üniversitesi

Jüri Üyesi



Yrd.Doç.Dr. Nuray VAROL

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Jüri Üyesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Nuran ÇOBAN'ın "MESANE KANSER HÜCRELERİNDE HSP90 İNHİBİTÖRLERİNİN HİSTON METİLASYONU ÜZERİNE ETKİSİ" başlıklı tezigünü saat Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Özal ÖZCAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez hazırlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden her zaman desteğini gördüğüm saygı değer danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Nuray VAROL ‘a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden büyük fayda gördüğüm Anabilim Dalı hocalarıma çok teşekkür ederim.

Tez döneminde manevi desteğini her zaman hissettiğim ve güler yüzünü hiç eksik etmeyen Betül CİVAN ‘a ve tüm dostlarıma teşekkür ederim.

Ve en önemlisi benim bugünlere gelmemde en büyük emek sahibi olan, benim için değerini kelimelerle ifade edemeyeceğim ailem; annem, babam ve kardeşlerime hayatımda oldukları için, desteklerini, fedakarlıklarını ve sonsuz sevgilerini esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Isı Şok Proteini	2
1.1.1. Isı Şok Protein 90 (HSP90).....	4
1.1.2. HSP90 Fonksiyonunun Düzenlenmesi	7
1.1.3. HSP90 Ko-şaperonlar	8
1.1.4. HSP90 Ko-şaperon Döngüsü	10
1.1.5. HSP90 Client Proteinler	10
1.1.6. HSP90 ve Kanser	14
1.1.7. HSP90 İnhibitörleri.....	16
1.1.8. HSP90 ve Epigenetik Düzenlenme.....	19
1.2. Epigenetik Mekanizmalar.....	22
1.2.1. DNA Metilasyonu.....	23
1.2.2. Epigenetik Sinyal Olarak DNA metilasyonu.....	24
1.2.3. Epigenetik Sinyal Olarak Histon Modifikasyonlar.....	25
1.2.4. DNA Metilasyonunun Histon Modifikasyonlarına.....	27
1.2.5. Kanserde Histon Onko-Modifikasyonlar ve Histon Modifiye Edici Enzimler.....	28
1.2.6. Histon 4 Lizin 20 (H4K20) Trimetilasyonu	31
1.2.7. Histon 3 Lizin 27 (H3K27) Trimetilasyonu	32
1.3.AMAÇ	33
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	35
2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	36

2.3. Kullanılan Kitler	37
2.4. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı	37
2.4.1. %10'luk McCoy's 5A besiyerinin hazırlanışı	37
2.4.2. PMSF solüsyonu	37
2.4.3. 1,5 M Tris buffer (ph:8,8) (150 ml)	38
2.4.4. 0,5 M Tris buffer (ph:6,8) (100 ml)	38
2.4.5. 10x Tris glisin stok solüsyonu	38
2.4.6. Transfer buffer	38
2.4.7. Amonyum persülfat (APS) solüsyonu	38
2.4.8. 10X TBS solüsyonu	38
2.4.9. Primer antikor dilüsyon solüsyonu	39
2.4.10. Sekonder antikor dilüsyon solüsyonu	39
2.4.11. Membran bloklama solüsyonu	39
2.5. T24 Hücre Hattı	39
2.6. Yöntemler	39
2.6.1. Hücre kültürü	39
2.6.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	40
2.6.3. Hücrelerden total RNA izolasyonu	40
2.6.4. Komplementer DNA (cDNA) sentezi	41
2.6.5. Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü	41
2.6.6. Total Protein izolasyonu	43
2.6.7. Histon Protein İzolasyonu	43
2.6.8. BCA kiti ile protein miktar tayini	44
2.6.9. Western blot yöntemi ile protein düzeylerinin belirlenmesi	45
3.7. İstatistiksel analiz	46
3. BULGULAR	47
3.1. Geldanamisin'in Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi	47
3.2. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	47
3.2.1. Kantitatif <i>DNMT1</i> , <i>HDAC1</i> ve <i>WIF1</i> Genlerinin İfade Düzeyinin ve <i>DNMT1</i> Protein İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi	49
3.3. AKT1 Protein İfade Düzeyleri	52
3.3. H3K27me ³ Protein İfade Düzeyleri	52

3.4. Histon H4, H4K20me ¹ ve SET8 Protein İfade Düzeyleri	53
3.5. Histon H4, H4K20me ³ ve KMT5C (SUV4-20H2) Protein İfade Düzeyleri...	54
3.6. Geldanamisin'in Apoptoz Üzerine Etkisi	54
4. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ	79

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

17-AAG	: 17-allilamino-17-demetoksi geldanamisin
17-AG	: 17-demetoksigeldanamisine
AdoMet	: S-adenozil-L-metiyonin
ADP	:Adenin difosfat
AGO	:Argonauto
AHA1	:ATPaz homolog 1 aktivatör
Akt	:PKB, Protein kinaz B
ATP	:Adenin trifosfat
Bax	:Bcl2 ilişkili X proteini
Bcl2	: B hücre lenfoma 2
CA	:Ko aktivatör
CDK	:Siklin bağımlı kinaz
-CH₃	:Metil grubu
CK1	:Kazein kinaz 1
CpG	:Sitozin-Guanin dinükleotidi
CR	:Ko represör
CS	:Chord ve Sgt1 domain
CDC37	:Hücre bölünme döngüsü 37
CTD	:C terminal domain
17-DMAG	: 17-N,N-dimetilaminoetilamino-17-demetoksi geldanamisin
DNA	:Deoksiribo nükleik asit
DNA MTaz	:DNA metiltransferaz
DNMT1	:DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 1
DNMT2	:DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 2

DNMT3A	:DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 3A
DNMT3B	:DNA-Sitozin 5-metiltransferaz 3B
eNOS	:Nitrik oksit sentaz
EZH2	:Enhancer of zeste homolog
FKBP51	:FK506 bağlanma proteini 51
GA	:Geldanamisin
GR	:Glukokortikoid reseptör
GRP94	:Glikoz ilişkili protein 94
dH₂O	:Distile su
H1	:Histon 1
H2A	:Histon 2A
H2B	:Histon 2B
H3	:Histon 3
H3K4	:Histon 3 lizin 4
H3K9	:Histon 3 lizin 9
H3K27	:Histon 3 lizin 27
H3K27me3	:Histon 3 lizin 27 trimetile
H4	:Histon 4
H4K16acme1	:Histon 4 lizin 16 asetilasyon
H4K20me1	:Histon 4 lizin 20 monometile
H4K20me3	:Histon 4 lizin 20 trimetile
HAT	:Histon asetilaz
HDAC	:Histon deasetilaz
HDM	:Histon demetilaz
HMT	:Histon metilaz transferaz
HOP	HSP90 düzenleyici protein
HSF1	:Isı şoku transkripsiyon faktörü 1

HSP	:Isı şoku proteini
JMJD3	:KDM7A, Lizin Demetilaz 7 A
kb	:Kilobaz
kDa	:Kilo dalton
LBD	:Lateral organ sınırlı domain
Lys	:Lizin
^mC	Metil-Sitozin
5-mC	:5-metilsitozin
µl	:Mikro litre
µM	:Mikro Molar
ml	:Mililitre
me	:Metilasyon
MeCP	:Metile CpG bağlanma protein
MBP	:Metile bağlanma protein
MD	Orta domain
MJD	:Machado Josephin domain
MLL	:Karışık soy lösemi
MMP	:Matriks metaloproteinaz
NTD	: N terminal domain
p-	:Fosfo
PcG	:Polikomb grup
PPC2	:Polikomb baskılayıcı kompleks 2
PPIaz	: Peptidil-prolil <i>cis-trans</i> izomeraz
PR-SET7	:KDM7a, Lizin metiltransferaz 7A
RVB	:RuvB benzeri protein
Ser	:Serin
SHR	:Steroid hormon reseptör

SYMYD3	: SET- ve MYND- domain içeren 3
TRAP1	: TNF reseptör ilişki protein 1
Thr	:Treonin
TPR	:Tetratrikopeptid tekrar
Trx	:Tritoraks
UHRF1	:PHD ve RING Parmak İçeren Ubiquitin Benzeri Domain
WST1	:2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. HSP90 şaperon döngüsü (Leach ve ark., 2012).....	6
Şekil 1.2. Client proteinlerinin Ko-şaperonlar aracılı regülasyonu a. Glukokortikoid reseptör maturasyonu b. Kinazların maturasyonu (Schopf ve ark., 2017).....	11
Şekil 1.3. HSP90 inhibitörleri (Workman ve Powers, 2007'den modifiye edilmiştir). 18	
Şekil 1.4. HSP90 ve epigenetik düzenleyiciler (Isaacs, 2016).....	19
Şekil 1.5. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-mC'in mutagenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi.....	24
Şekil 1.6. DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel baskılanma mekanizması. HDAC; Histon deasetilaz, TF; Transkripsiyon faktörü, CR; Ko-aktivatör, HAT; Histon asetilaz, MBP; Metil sitozin bağlanma proteini, DNMT; DNA MTaz enzimi, CR; Korepresör (Baylin, 2005).	25
Şekil 1.7. Nüklozom yapısındaki histon posttranslasyonel modifikasyonlar. A: asetilasyon, M:metilasyon, P: fosforilasyon, U: Ubiquitinasyon (Portela ve Esteller, 2010).	29
Şekil 3.1..T24 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Geldanamisin ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.*; IC50 değeri.....	47
Şekil 3.2. DNMT1, HDAC1, WIF-1 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. DNMT1, HDAC1, WIF-1 ve GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Ct değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir	48
Şekil 3.3. T24 mesane kanser hücrelerinin <i>DNMT1</i> , <i>HDAC1</i> , <i>WIF1</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait erime eğrileri. <i>DNMT1</i> , <i>HDAC1</i> , <i>WIF1</i> ve <i>GAPDH</i> geninin Melting Curve analizine ait sıcaklık dereceleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.	49
Şekil 3.4. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ve TSA ile inkübasyonu sonrasında <i>DNMT1</i> mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri <i>GAPDH</i> mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi,*; $p<0,01$	50

- Şekil 3.5. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı 1µM ve 10 µM GA ve 1µM GA + 300 nM TSA kombinasyonunun süre bağımlı inkübasyonu sonrasında DNMT1 protein düzeyindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. s; saat.....50
- Şekil 3.6. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ve TSA ile inkübasyonu sonrasında *HDAC1* mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi,*; p<0,01..... 51
- Şekil 3.7. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ile inkübasyonu sonrasında pAkt(S473) ve Akt proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. S:saat..... 52
- Şekil 3.8.. T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1µM GA ile inkübasyonu sonrasında H3K27me³ protein düzeyindeki değişimler. S:saat. 53
- Şekil 3.9. T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1 µM ve 10 µM GA ile inkübasyonu sonrasında H4, H4K20me¹ ve SET8 protein düzeyindeki değişimler 53
- Şekil 3.10. T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1 µM ve 10 µM GA ile inkübasyonu sonrasında H4, H4K20me³ ve KMT5C protein düzeyindeki değişimler..... 54
- Şekil 3.11. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ile inkübasyonu sonrasında Bax proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. s:saat..... 55
- Şekil 3.12 T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ile inkübasyonu sonrasında Bcl2 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β-aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. S:saat.. 55

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Hedef genlere ait RefSeq ve RT2 qPCR primer assay katalog numaraları	42
Tablo 2.2. DNMT1 ve GAPDH Real-Time PCR tepkime karışımı:	42
Tablo 2.3. DNMT1 ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.	43

1. GİRİŞ

Mesane (idrar kesesi) kanseri, dünyada görülme sıklığı açısından beşinci sırada yer almakta ve tüm dünyada kanser türlerinin %4'ünden fazlasını oluşturmaktadır. Erkeklerde prostat kanserinden sonra en sık rastlanan genitoüriner kanser türüdür. (Karkoulis ve ark., 2013; Chehab ve ark., 2015). Ülkemizde 2014 yılı verilerine göre mesane kanseri erkekler arasında dördüncü sırada yer almakta olup kanser vakalarının yaklaşık %7'sini oluşturmakta, kadınlarda ise yedinci sırada olup tüm kanser vakaların yaklaşık %2,5'ni oluşturmaktadır. (Şencan ve Keskinlik, 2017). Yapılan çeşitli çalışmalarda mesane kanseri için, mesanenin kronik parazitik infeksiyonları, ileri yaş (≥ 65), erkek cinsiyeti, kimyasal maddelerin yapıldığı ve kullanıldığı ortamlarda çalışmak, sigara, analjezikler, diğer kanserler nedeniyle tedavi olma ve aile öyküsü gibi çok çeşitli risk faktörleri belirlenmiştir (Karkoulis ve ark., 2013; Chehab ve ark., 2015).

Üriner mesane kanserleri transizyonel hücreli karsinom (TCC) (%90), yassı hücreli karsinom ve adenokarsinom şeklinde üç sınıfa ayrılmaktadır. TCC'lerin yaklaşık %80'i yüzeysel tümörlerdir. Bu tümörlerin %70-80'i tekrarlayabilmekte (rekürrens) ve bunların %20-30'u invaziv hale gelmektedir (Mitra ve Cote, 2009). Mesane kanser hastalarının büyük bir kısmı (%70-80) başlangıçta yüksek diferansiye, kasa invaze olmayan papiller tümörler olarak ortaya çıkarken, hastaların geri kalan kısmında ise (%20-30) az diferansiye agresif kas invaze tümör görülür. Hastaların büyük çoğunluğuna yüzeysel tümör teşhisi konmasına rağmen, ilk vakaların yaklaşık % 30'u iki yıllık bir süre içinde invaziv formlara dönüşmektedir. Birincil invaziv tümör hastaların yaklaşık % 50'sinden fazlası, iki yıllık bir zaman aralığında metastaz yaparken, metastatik hastaların beş yıllık sağ kalım oranı yaklaşık % 5 olarak hesaplanmaktadır (Karkoulis ve ark., 2013). Çeşitli cerrahi ve kemoterapötiklerin kullanımına rağmen rekürans ve metastaz yapmasından dolayı kanserinde 5 yıllık sağ kalım oranının oldukça düşüktür (De la Rose ve ark., 2015).

Mesane kanser patogenezinin bakıldığında tek bir tümör hücresinde çok sayıda özellikle nokta mutasyonunun bulunması, kopya sayısı değişiklikleri, gen füzyon transkriptleri ve sitogenetik değişimlerin neden olduğu genetik alterasyonlar çoklu sinyal yollarının deregülasyonuna yol açmaktadır (Chehab ve ark., 2015; De la Rose ve ark., 2015). Hücre proliferasyonundan sorumlu sinyal yollarındaki aberasyonlara ilaveten mesane, kanserinin de içerisinde yer aldığı çok çeşitli kanser türünde ısı şok proteinleri (Heat Shock Protein, HSP) aşırı ifadenlenmektedir. Hücresel homeostazinin sürdürülmesinde önemli rol oynayan ısı şok proteinleri primer olarak protein katlanmasından sorumludur. Bu proteinler normal fizyolojik şartlar altında düşük düzeyde ifadenlenirken, hipertermi, ağır metal iyonlarına maruziyet, hipoksi gibi hücresel stres şartlarında hızlı bir şekilde ifadenmeleri artar. Böylece bu proteinler, mesane kanser hücrelerinin çeşitli hücresel stres şartları altında yaşamasına ve çoğalmasına önemli katkı sağlar. Isı şok proteinlerinin aşırı ifadenlenmesi genomik mutasyonun varlığına rağmen kanser hücrelerini apoptoza karşı korur. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi normal ürotelyum ile karşılaştırıldığında mesane kanser hücrelerinde ısı şok proteinlerinin ifadenme düzeyi oldukça artmıştır. Bu nedenle araştırmacılar ısı şok proteinlerinin mesane kanserinin tanı ve prognozu için bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliğine odaklanmışlardır. HSP'ler immun sistemin önemli modulatorleri olmasından dolayı yeni mesane kanser tedavi stratejilerinde HSP'ler hedeflenmektedir. Özellikle HSP'lerin modern kemoterapötikler ve radyoterapötikler ile birlikteki sinerjistik etkilerine odaklanılmıştır (Ischia ve So, 2013; Chehab ve ark., 2015).

1.1. Isı Şok Proteini

Organizmaların değişen çevre şartlarında hücresel dengeyi devam ettirebilmesi için moleküler şaperonlar proteostaziye garantileyen "tamponlar" olarak fonksiyon görürler (Schopf ve ark., 2017). Bazal düzeyde protein katlanmasına ve hasarlı proteinlerin parçalanmasını sağlayarak hücresel proteomu yanlış katlanma ve agregasyon sonucunda oluşacak olan tehlikeden korur (Rutherford, 2003; Schopf ve

ark., 2017; Whitesell ve Lindquist, 2005). Bu durum özellikle stres koşullarında örneğin ısıнын ani artışı ("ısı şoku" olarak da adlandırılır), steroid hormon reseptörü aracılı sinyalizasyon gibi durumlarda oldukça önemlidir (Schopf ve ark., 2017). Ferruccio Ritossa tarafından 1962 yılında ilk kez tanımlanan ısı şok proteinleri (Heat shock protein, HSP), birçok hücrel strese yanıtta rol oynayan yüksek derecede korunmuş efektör proteinlerdir (Soo ve ark., 2008; Njemini ve ark., 2011). Stres proteinleri olarak da adlandırılan HSP'ler, normal şartlar altında düşük düzeyde ifadenirken, sıcaklık, hipoksi, oksidatif stres, toksin maruziyeti, besin yetersizliği ve enfeksiyon gibi proteotoksik stres şartlarında sitoprotektif olarak hızlıca ifadenmeleri indüklenir (Evans ve ark., 2015). Bununla birlikte, moleküler şaperonlar mutant polipeptitlerin örneğin nötral mutasyon taşıyan polipeptitlerin doğru bir şekilde katlanmasına aracılık ederek bu mutantların fenotipik etkilerini baskılayabilmektedirler. Böylelikle çevresel değişimlere karşı hücrelerin adaptasyonuna yardımcı olurlar (Rutherford, 2003). Birçoğu moleküler şaperon olarak fonksiyon gören HSP'lerin iki büyük sınıfı bulunmaktadır ve bunlar protein katlanma mekanizmalarına göre birbirinden ayrılırlar. İlk sınıfta HSP27, HSP70 ve HSP90 yer alır ve bunlar direkt olarak katlanmamış proteinlerin yüzeyi ile etkileşime girerken, ikinci sınıfta yer alan şaperon HSP60 ise katlanma odacığına benzer bir yapı oluşturarak yanlış katlanmış veya yeni sentezlenen proteini bu oda içerisinde aktif protein yapısını almasını sağlar (Njemini ve ark., 2011; Calderwood ve Gong, 2016). Ayrıca moleküler boyutlarına göre de sınıflandırılabilirler; Büyük HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 ve HSP40 ve küçük HSP'ler (moleküler ağırlıkları 15-30 kDa). Büyük moleküler ağırlıklı HSP'ler ATP bağımlı şaperonlar iken küçük HSP'ler (HSP27, HSP25, HSP20) ise genellikle nükleotit bağımsızdır (Klikova ve ark., 2015; Njemini ve ark., 2011). HSP'lerin transkripsiyonel düzenlenmesi sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Stresin indüklediği HSP'lerin transkripsiyonu, ısı şoku faktör protein 1 (Heat Shock Factor Protein 1, HSF1)'in post translasyonel modifikasyonları (sumolasyon ve fosforilasyon) ile gerçekleştirilir. HSF1, sekans spesifik transkripsiyon faktörüdür. Bu modifikasyonlar HSF1'in HSP70 ve HSP90 ile oluşturduğu kompleksten ayrılmasını ve homotrimer olarak nükleusa transloke olmasını sağlar. Nükleusa transloke HSF1, ısı şoku element sekansını içeren HSP

genlerinin transkripsiyonunu aktive eder (Njemini ve ark.,2011; Evans ve ark., 2015).

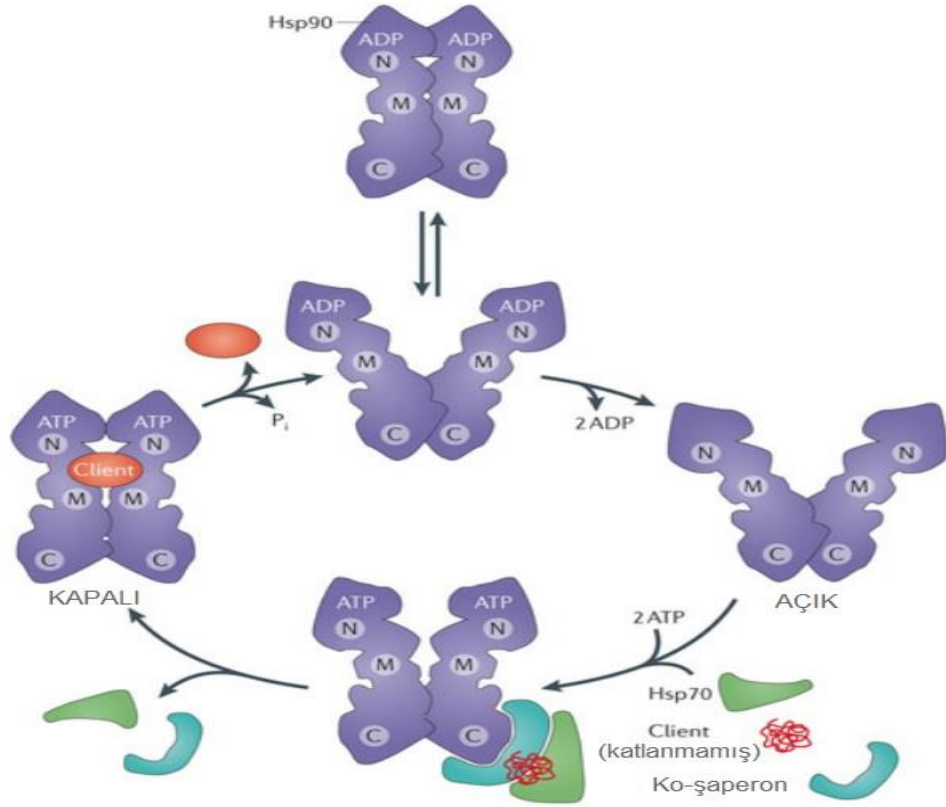
HSP'lerin, solid tümörleri ve hematolojik malignansileri içeren çok çeşitli insan kanserlerinde yüksek derecede ifadelendiği bulunmuştur. Bu durum belki de kanser hücrelerinin uygun olmayan çevre koşullarında protein homeostazisini devam ettirmek, hücre proliferasyonunu arttırmak ve hücre ölümünü inhibe etmek için adaptif bir cevaptır (Soo ve ark., 2008). Önemli sinyal moleküllerindeki mutasyonlar yalnızca tolere edilmez aynı zamanda onkogenezin sürdürülmesine yardım eder, bu bağlamda fenotipik düzeyde şaperonlar, birçok insan kanserleri için karakteristik olan çok sayıdaki genetik lezyonlar için biyokimyasal tamponlardır (Whitesell ve Lindquist, 2015).

1.1.1. Isı Şok Protein 90 (HSP90)

Moleküler şaperon ısı şoku protein 90 (Heat Shock Protein, HSP90), ökaryotik hücrelerde fizyolojik ve stres şartları altında proteostazinin düzenlenmesinde anahtar role sahiptir (Schopf ve ark., 2017). HSP90 proteini, regülatör kinazları, steroid hormon reseptörleri ve transkripsiyon faktörlerinin içerisinde yer aldığı anahtar sinyal proteinlerinin olgunlaşmasından sorumludur (Prodromou,2016). HSP90'ın, protein katlanmasının yanı sıra DNA onarımı, gelişim ve immün yanıtta rol oynayan yüzlerce protein substratı ("clients" olarak isimlendirilmekte) bulunmaktadır (Schopf ve ark., 2017). HSP90, hücresel protein yaklaşık olarak %1-2'sini oluştururken stres şartları altında bu oran % 4-6'a kadar yükselmektedir. Hücrelerde HSP90 düzeyinden asıl sorumlu olan HSF1'dir. Buna ilaveten farklı mekanizmalar aracılığıyla da düzenlenebilirler, örneğin ko-şaperonlar vasıtasıyla post-translasyonel modifikasyonlar. İnsan hücrelerinde sürekli ifadelenen HSP90β (*HSP90AB1*) ve sıcakla indüklenen HSP90α (*HSP90AA1*)'nın amino asit benzerliği yaklaşık %85'dir. Yüksek korunmuşluktaki bu iki protein farklı fonksiyonlara sahiptir. İlginç olan HSP90α, memeliler için gerekli olmasa da hücrelerde adaptif role sahip iken HSP90β ise hücre yaşamının devamlılığını sağlayan prosesler de görevlidir. HSP90α ve

HSP90 β , ökaryotik proteomun yaklaşık %10 ile etkileşime girmektedir ki bu da yaklaşık 200 protein anlamına gelmektedir. (Prodromou, 2016).

HSP90, homodimer olarak fonksiyon görür ve *in vivo* fonksiyonu için dimerizasyonu gereklidir. Monomer HSP90, üç domain içerir: amino-uç dimerizasyon domain (NTD) 25 kDa ve ATP/ADP'nin bağlanma bölgesidir. NTD, 35 kDa'luk orta domaine (MD) yapısal olmayan yüklü bir bağlayıcı ile bağlanır. MD, ATP'nin hidrolize olmasında önemli role sahiptir ve ayrıca nükleer lokalizasyon ve HSP90 substrat proteinleri için bağlanma bölgesi içerir. Karboksil-uç domain (CTD) ise 10 kDa'dır ve HSP90'nın dimerizasyonundan sorumludur (Yong ve ark., 2012; Prodromou, 2016; Schopf ve ark., 2017). Ayrıca, C-terminal Met-Glu-Glu-Val-Asp (MEEVD) motif ise tetratrikopeptid tekrar (TPR) domaini içeren ko-şaperonlar ile etkileşim için önemlidir. NTD, uzun esnek bağlantı bölgesi aracılığıyla MD domainine bağlanır ve NTD-MD etkileşimi HSP90'nın fonksiyonunu etkiler. ATP'nin yokluğunda HSP90, "V" formunda açık konformasyonel şeklini alır. ATP bağlanmasından sonra yapısal yeniden düzenlenme meydana gelir, her bir monomerdeki NTD domainleri arasındaki etkileşim (kapalı evre 1) ve HSP90 monomerlerinin bükülmesi (kapalı evre 2) aracılığıyla kapalı konformasyonel şekli alır (Şekil 1.1). Ko-şaperonlar, HSP90'nın spesifik konformasyonel evreleri için önemlidir. Örneğin, HSC70/HSP90-organize protein HSP90'a bağlanarak açık konformasyonel formu kararlı hale getirir ve böylece HSP90'nın ATPaz aktivitesini inhibe eder. Peptidil-prolil *cis-trans* izomeraz (PPIaz) HSP90'nın bütün konformasyonel formlarına bağlanır. CDC37 ise döngünün erken aşamasında HSP90'a bağlanır ve client kinazların toplanması için önemlidir. HSP90 ATPaz homolog 1 aktivatör (AHA1), kapalı evre 1'in oluşumunu teşvik eder ve şaperon döngüsünü hızlandırır. p23, kapalı evre 2'yi stabilize eder ve HSP90'nın ATPaz aktivitesini azaltarak reaksiyon döngüsünün progresyonunu düzenler (Schopf ve ark., 2017).



Şekil 1.1. HSP90 şaperon döngüsü (Leach ve ark., 2012).

HSP90, girazların bir üyesidir. NTD domainindeki ATP-bağlanma bölgesi, ATP'nin hidrolizini sağlamak için MD domaini ile etkileşime girmesi gerekir. HSP90 düşük enzimatik aktiviteye sahiptir: ATP için afinitesi düşüktür. İki monomerdeki NTD domainleri arasındaki etkileşimi aracılığıyla gerçekleşen büyük ve dinamik konformasyonel yeniden düzenlenme bütün domainleri etkiler. NTD'nin dimerizasyonu ve ATPaz aktivitesi için CTD'nin dimerizasyonu önemlidir. NTD dimerizasyonu ve kapalı evre oluşumu, ATP'nin hidrolizi için kritiktir ve MD'deki katalitik loop'un yer değişimine yol açar. ATP'nin hidrolizi sonrasında NTD'ler birbirinden ayrılır ve serbest hal geçerler. Böylece HSP90 açık konformasyonuna geri döner (Schopf ve ark., 2017).

1.1.2. HSP90 Fonksiyonunun Düzenlenmesi

HSP90'nın fonksiyonu, transkripsiyonel, post-translasyonel modifikasyonlar, ko-şaperonlar ve substratları gibi birçok yolla düzenlenir.

Transkripsiyonel düzenlenme

HSP90'nın ifadenmesini stres-aracılı transkripsiyon faktör ısı şoku faktör 1 (Heat Shock Factor 1, HSF1) ve HSP90 substratları ile indüklenir. HSP90, HSP70 ile birlikte HSF1'e bağlanır ve onu inaktif formda kalmasını sağlar (Voellmy ve Boellmann, 2007;Prodromou, 2016). Ne zamanki şaperon proteinler, farklı fonksiyonları için gerekli olduklarında HSF1'i uzun süre inaktive edemezler ve ısı şok proteinlerinin ifadenmesi transkripsiyonel olarak artar. Böylece stres şartları altında HSP90 hücrenin direkt olarak ısı şok proteinlerinin ifadenmesini etkiler (Schopf ve ark.,2017).

Post-transkripsiyonel modifikasyonlar

HSP90 fonksiyonu, asetilasyon, fosforilasyon, SUMOlasyon, metilasyon, ubiquitinasyon, S-nitrosilasyon gibi çok sayıda post translasyonel modifikasyonlar (PTM) aracılığıyla düzenlenir (Prodromou, 2016 ; Schopf ve ark., 2017). Post-translasyonel modifikasyonlar, HSP90'nın farklı çevre koşullarında ısı şokuna cevabını farklı şekilde düzenler. Fosforilasyon, HSP90'nın direkt olarak aktivitesini etkilemesinin yanı sıra onun ko-şaperon, nükleotid ve client proteinlerle etkileşimini de düzenler. Örneğin, HSP90'nın Thr³¹'den fosforilasyonu ko-şaperon AHA1 ile etkileşimini önemli derecede azaltmaktadır (Prodromou, 2016). HSP90'nın fosforilasyonu genellikle Ser rezidüsünde meydana gelir ve HSP90'nın konformasyonel döngüsünü yavaşlatır, client maturasyonunu ve ko-şaperonlar ile etkileşimini etkiler. Fosfotaz Ser/Thr protein fosfotaz T (Ppt1, ayrıca Ppt olarak da bilinir ve insandaki formu PP5), bir HSP90 ko-şaperonudur ve HSP90'nın fosforilasyonunu düzenler, PP5/Ppt1'in yokluğunda HSP90 hiperfosforile durumdadır. Hiperfosforile HSP90, ko-şaperonu p23'e bağlanmaz ve şaperon aktivitesini kaybeder (Schopf ve ark., 2017). Ayrıca asetilasyonda da ko-şaperonlara bağlanmasını etkiler. HSP90, p300 tarafından asetillenirken histon deasetilazlar

(HDAC; HDAC1, HDAC6 ve HDAC10) tarafından deasetile edilir. Örneğin, Lys¹⁰⁰, Lys²⁹², Lys³²⁷, Lys⁴⁷⁸, Lys⁵⁴⁶ ve Lys⁵⁵⁸'in asetilasyon kopya mutantları ko-şaperonlara bağlanma afinitesini azaltmaktadır (Prodromou, 2016). S-nitrosilasyon, Cys rezidüsünde meydana gelir ve CTD domaininde ATPaz reaksiyonunu inhibe ederek HSP90'nin endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) üzerindeki aktive edici etkisini azaltmaktadır (Prodromou, 2016; Schopf ve ark., 2017). HSP90'nın asimetric N-terminal domain (Lys¹⁷⁸ ve Lys¹⁹¹) sumolasyonu ise HSP90'nın AHA1 ile etkileşime girmesine aracılık etmektedir (Prodromou, 2016). HSP90'nın ubiquitinasyonu ise hem HSP90'nın hem de Akt, Cdk4, siklin D1 ve Raf1 gibi client proteinlerinin parçalanmasına yol açmaktadır. Son olarak, ko-şaperonların post-translasyonel modifikasyonları aracılığıyla da HSP90 aktivitesi düzenlenir. Örneğin CDC37, CK2 aracılığıyla fosforile edilir. Bu fosforilasyon sayesinde CDC37, HSP90 ile kompleks oluşturabilir. CDC37-HSP90 kompleksi ise PP5/Ppt1 tarafından defosforile edilir. Bu defosforilasyon bu ilişkiyi zayıflatır. Bu durum belki döngünün ilerleyişi için bir sinyal olarak algılanıyor olabilir ve böylece aktive client protein kompleksten salınır (Prodromou, 2016).

1.1.3. HSP90 Ko-şaperonlar

Ko-şaperonlar, HSP90'nın çok önemli düzenleyicileridir. Ko-şaperonlar, HSP90'nın bütün domainlerine bağlanabilmektedir. HSP90'a bağlanmada bazıları birbiri ile rekabet ederken, bazıları eş zamanlı olarak veya sinerjistik olarak bağlanabilmektedir. Bu durum göstermektedir ki, aynı kompleks içerisinde farklı ko-şaperonları fonksiyon görmektedir (Schopf ve ark., 2017).

Tetratrikopeptid tekrar domain içeren ko-şaperonlar

Bazı ko-şaperonlar TPR domaini içerir ve CTD domainindeki MEEVD peptidine bağlanır. En iyi karakterize edilmiş TRP domain içeren ko-şaperon HSP70/HSP90 düzenleyici protein (HSP90-Organizing Protein, HOP) hem HSP70'e hem de HSP90'a bağlanır. Son zamanlarda client proteinlerin HSP70'den HSP90'a HOP aracılığıyla transfer edildiği gösterilmiştir. Böylece, HOP iki şaperon için adaptör

olarak fonksiyon görür. Ayrıca HOP, HSP90'ın ATPaz aktivitesini inhibe ederek HSP90'ın açık konfirmasyonda kalmasını sağlar (Li ve ark., 2011; Schopf ve ark., 2017). TPR içeren bir diğer ko-şaperon PP5'dir ve HSP90'ı defosforile ederek HSP90'nın konformasyonel döngüsünü düzenler. PP5'in HSP90'a bağlanması, PP5'in otofosforilasyon aktivitesinin serbest kalmasına ve böylece HSP90 ve ko-şaperonu olan CDC37'nin defosforilasyonuna yola açar (Wandinger ve ark., 2006; Vaughan ve ark., 2008; Soroka ve ark., 2012).

Tetratrikopeptid tekrar domain içermeyen ko-şaperonlar

Diğer ko-şaperonların aksine CDC37, kinazların maturasyonunda rol oynar. Ayrıca HSP90'nın NTD domainine bağlanarak HSP90'nın ATPaz aktivasyonunu kısmi olarak inhibe eder, böylece NTD dimerasyonunu inhibe ederek kapağın kapanmasını engeller.

HOP ve CDC37'nin aksine AHA1, HSP90 ATPaz aktivitesinin güçlü bir aktivatörüdür. AHA1, HSP90'nın NTD ve MD domainine asimetrik biçimde bağlanır. Her bir HSP90 dimerine bağlanan bir AHA1 molekülü HSP90'nin ATPaz aktivitesini indüklemek için yeterlidir. Ayrıca AHA1, HOP1'i uzaklaştırmak ve client bağlanmasını bloke ederek HSP90 konformasyonel döngüsünü devam ettirmektedir.

P23, şaperon döngüsünün geç evresinde fonksiyon gören bir ko-şaperondur. HSP90'nın kapalı evre 2 konformasyonunu kararlı hale getirir (Ali ve ark., 2006). P23, HSP90'nın ATPaz aktivitesini azaltır ve böylece reaksiyon döngüsünün progresyonunu düzenler (Richter ve ark., 2004). P23, Chord ve Sgt1 (CS) domain ve yapısal olan bir kuyruk içerir. CS domaini aracılığıyla HSP90'a bağlanırken yapısal kuyruk ise onun şaperon aktivitesinden sorumludur (Schopf ve ark., 2017). p23 içeren HSP90 kromatin mimarisini düzenler (Echtenkamp ve ark., 2016).

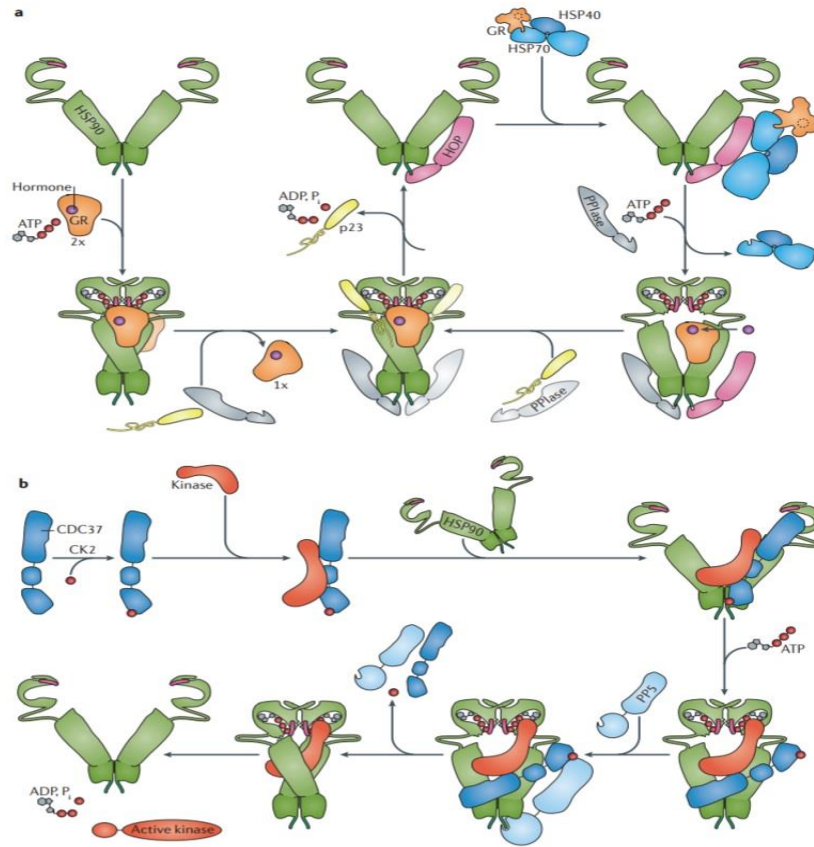
1.1.4. HSP90 Ko-şaperon Döngüsü

Ko-şaperonlar, HSP90'nın spesifik konformasyonel evresinde bağlanır (Şekil 1.2). HOP/Sti1, HSP90 ve HSP70 arasında client proteinlerin transferine aracılık etmek için adaptör olarak fonksiyon görür. Bir HOP/Sti1 molekülü, muhtemelen HSP70 içeren kompleksteki HSP90'nın açık konformasyonunda bağlanır ve onun ATPaz aktivitesini inhibe eder. HSP90 ilişkili PPIaz bu asimetrik komplekse bağlanır ve bu aşamada client protein HSP90'a bağlanır. AHA1 veya ikinci bir PPIaz ve p23/Sba1'in birlikte hareket etmesi aracılığıyla HOP/Sti1 ve HSP70 yer değiştirir. ATP'nin bağlanmasından sonra, HSP90 kapalı evre 1'den kapalı evre 2 konformasyonuna geçişi gerçekleşir. p23/Sba1, HSP90'a bağlanmak için AHA1 ile rekabet içerisinde ve kapalı evre 2 konformasyonunu stabilize eder. Sonuçta ATP, ADP ve P_i 'ye hidrolize olur ve HSP90 açık konformasyona geçerek aktive olan client salınmasına yol açar. Bir sonraki döngüye kadar HSP90 açık konformasyonda kalır. Bu basit bir şekilde anlatılan döngüde ilave ko-şaperonlarda döngüyü modüle eder (Schopf ve ark., 2017). CDC37, en çok çalışılmış client-spesifik ko-şaperonlardan birisidir ve özellikle protein kinazlar ile ilişkilidirler. Memelilerde büyük PPIaz'ın bir üyesi olan FKBP51 ayrıca kinazların alt üniteleri ile ilişkilidir. CDC37 hem HSP90'a kinazların bağlanabilmesi için toplayıcı olarak hem de client ve client olmayan kinazların ayrılması için bir sensör olarak davranır. Ayrıca, FKBP51, Argonaute proteinler, AGO1 ve AGO2, DNA replikasyonunda görevli olan MCM kompleksinin komponentleri MCM4, MCMBP ve steroid hormon reseptör (SHR)'nin alt üniteleri ile etkileşime girmektedir (Taipale ve ark., 2014; Schopf ve ark., 2017). Bazı ko-şaperonlar tercihen proteinde bulunan belirli yapısal motiflere bağlanır. Örneğin, Sgt1 immun yanıt cevabında rol oynayan proteinlerin nükleotid-bağlanma domain LRR ailesinde bulunan LRR domainine bağlanmayı seçer (Schopf ve ark., 2017).

1.1.5. HSP90 Client Proteinler

Stresin düzenlenmesi ve protein katlanmasından, DNA onarımı, gelişim, immun yanıt, nöral sinyalizasyon gibi birçok hücrel süreçte görev alan proteinler HSP90'ın

substratı olmasından dolayı HSP90 önemli hücresel proseslerinin merkez modülatörü olarak fonksiyon görmektedir (Echeverria ve ark., 2011). Picard laboratuvarı tarafından HSP90'ın etkileştiği proteinler listelenmektedir. Protein kinazlar ve SHR'ler en çok çalışılmış HSP90 client proteinleridir (Schopf ve ark., 2017). Son zamanlardaki HSP90 clientlarının kantitatif analizleri ortaya koymuştur ki insan



Şekil 1.2. Client proteinlerinin Ko-şaperonlar aracılı regülasyonu **a.** Glukokortikoid reseptör maturasyonu **b.** Kinazların maturasyonu (Schopf ve ark., 2017).

kinazlarının %60'ı ve transkripsiyon faktörlerinin yaklaşık %7'si HSP90 ile ilişkilidir. Ayrıca süpriz bir şekilde insan E3 ubiquitin ligazlarının %30'u HSP90'a bağlı olarak bulunmaktadır (Taipale ve ark., 2012). Son zamanlarda, DNA metilasyonunun devam ettirilebilmesi için gerekli ubiquitin benzeri PHD ve RING parmak domain içeren protein 1 (UHRF1), E3 ubiquitin ligazlardan biridir ve HSP90 client proteindir. HSP90'ın inhibe edilmesi UHRF1'in parçalanmasına yol açmaktadır

(Ding ve ark., 2016). CHIP (HSP70-etkileşen protein karboksil uç)'da bir E3 ubiquitin ligaz olup HSP90 ve HSP70'e bağlanan client proteinlerin parçalanmasına yol açan bir ko-şaperondur (Kundrat ve Regan, 2010; Schopf ve ark., 2017). CHIP'e ilaveten cullin 5 (CUL5)'de HSP90 ve HSP70 ile birlikte bulunan client proteinlerin parçalanmasına aracılık eder (Ehrlich ve ark., 2009). Bu durum göstermektedir ki, E3 ligazlar HSP90'ın parçalanmasından sorumlu olabilir. HSP70 veya HSP60 ile karşılaştırıldığında HSP90'ların client proteinlerinin sayısı sınırlıdır. HSP90 ile etkileşime giren client proteinler üç sınıfa ayrılmaktadır; (i) HSP90, client proteinlerin spesifik veya aktif konformasyonunu oluşturmaya aracılık eder, örneğin kinazlarda olduğu gibi, (ii) HSP90, multiproteinli komplekslerin oluşumuna yardım eder, örneğin kinetokor veya Rvb1-Rvb2-Tah1-Pih1 (R2TP) kompleksi, (iii) HSP90, uygun açık bağlanma konformasyonunu stabilize ederek proteinlere ligandların bağlanmasını teşvik eder, örneğin SHR'ye steroid hormonunun bağlanması, siRNA'ların AGO2 kompleksine yüklenmesi, DNA ile telomerazın etkileşime girmesini sağlar. Yukarıda bahsi geçen HSP90-client etkileşimi yalnızca bir özettir, ayrıca bu etkileşimler protein dinamiğinin düzenlenmesi gibi farklı fonksiyonlara da sahiptir. Sonuç olarak, hücrel bilgi ağında ve sinyalizasyonda HSP90 merkezi bir role sahiptir. Kısaca HSP90, proteomun alt ünitelerinin konformasyonel düzenleyicisidir. HSP90 client proteinlerinin büyük bir kısmı halen tanımlanabilmiş değildir. HSP90 client ve client olmayan proteinler sınıflandırılmış olmalarına rağmen ikili sınıflandırmalarda son zamanlarda bu konuda itilaflar bulunmaktadır (Schopf ve ark., 2017).

Tümör baskılayıcı p53 bir HSP90 client proteinidir ve insan tümörlerinin yaklaşık %50'sinde mutanttır. HSP90, hem yabanıl tip hem de mutant p53 proteinlerine bağlanır. Yapısal çalışmalar göstermiştir ki, p53 DNA bağlanma domaini, maya Hsp82'nin MD ve CTD domainlerine bağlanırken insan HSP90α'nın bütün domainlerine bağlanmaktadır (Schopf ve ark., 2017). Alzheimer ilişkili protein tau ise HSP90'nın substratlarından biri olup NTD ve MD domainlerine bağlanır (Karagoz ve ark., 2014). HSP90 client proteinler, farklı farklı domainlerine bağlanabilmektedir ancak öncelikli client protein bağlanma bölgeleri, HSP90'nın MD domainleridir. Geçen birkaç yılda yapılan çalışmalar ile client proteinler ve ko-

şaperonların, HSP90 konformasyonel döngüsüne nasıl katıldıkları kısmen açıklanabilmiştir (Schopf ve ark., 2017).

Glukokortikoid reseptör maturasyonu

Glukokortikoid reseptörü (GR), HSP90'a bağlanmadan önce HSP70 ile etkileşime girmektedir. HSP70, GR'ye bağlandıktan sonra adaptör ko-şaperon HOP/Sti1 aracılığıyla GR LBD, HSP90'a transfer edilir. GR LBD direk olarak HSP90 ile etkileşim içerisindedir. Kompleks formasyonu oluşturulduktan sonra PPIaz ve p23/Sba1, GR LBD-HSP90'a bağlanır ve kapalı HSP90 yapısı oluşur. Bu kapalı HSP90 yapısının oluşması ATP'nin hidrolizine yol açar ve bu durum aktif GR'nin salınmasına neden olur. GR, HSP90'dan ayrılmadan önce bu reseptöre hormon bağlıdır (Şekil 1.2a) *In vitro* çalışmalarda, HSP90'ın ayrıca hormon bağlı GR LBD ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Bu durum HSP90'ın GR'nin nükleusa taşınması ve transkripsiyonel kontrolünde ilave düzenleyici role sahip olduğunu göstermektedir (Schopf ve ark., 2017).

Kinazların maturasyonu

CDC37, hem kinazların HSP90'a bağlanmasında bir toplayıcı olarak hem de client ve client olmayan proteinlerin ayırımında sensör olarak fonksiyon görmektedir (Keramisanou ve ark., 2016). CDC37 bir kinaz ile karşılaştığında N-terminal domaini aracılığıyla bu proteinin uygun bir substrat olup olmadığı kontrol eder (Şekil 1.2.b). Eğer uygun bir substrat ise C-terminal domaini ile stabil bir etkileşime girer. CDC37-kinaz kompleksi ilk olarak açık konformasyondaki HSP90'ın NTD bölgesine bağlanır ve böylece ATPaz aktivitesi inhibe olur. ATPaz aktivitesi inhibe HSP90-CDC37-kinaz kompleksi yapısal yeniden düzenlenmeyle kapalı konformasyon şeklini alır (Verba ve ark., 2016). ATP'nin hidroliziyle tekrardan açık konformasyona geçilir. CDC37'nin kazein kinaz 2 (CK2) ile Ser¹³'den fosforillenmesi ve PP5 aracılığıyla defosforilasyonu kinaz maturasyonunda oldukça önemlidir (Schopf ve ark., 2017).

1.1.6. HSP90 ve Kanser

Tümör hücreleri, sahip oldukları mutant proteinler ve proliferasyon artmış hızından dolayı stres altındaki hücreler gibi görünür. Bu nedenle tümör hücreleri proteozisi kontrol altında tutabilmek için ilave baskı altındadır (Pick ve ark., 2007; Whitesell ve Lindquist, 2005; Schopf ve ark., 2017). Bu nedenle bir veya daha çok HSP'lerin artmış ifadenmesi insan kanserleri için genel özelliklerden biridir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar göstermektedir ki, artmış şaperon ifadenmesi fizyolojik ve moleküler düzeyde onkogeneze katkı sağlamaktadır. Fizyolojik düzeyde, ileri evre kanserlerinde hücrenin besin yetersizliği, asitoit, hipoksi gibi tümörlerin karakteristik özelliği olan mikro çevreye karşı sitoprotektif stress cevabını oluşturmak için HSP'lerin ifadenme düzeyi artar. Moleküler düzeyde ise artmış HSP ifade düzeyi neoplastik transformasyon ile ilişkili kontrolsüz sinyalizasyona aracılık ederek hücrelerin apoptozdan kaçmasına yol açar. HSP90 diğer HSP'ler gibi bütün polipeptidlerin biyogenezinden sorumlu değildir. Ancak hücre büyümesi, yaşamı ve gelişim süreçlerinde kritik role sahip olan stabil olmayan sinyal molekülleri HSP90'nın hücrel substratları veya client proteinleridir (Whitesell ve Lindquist, 2005). Bu yüzden HSP90, kanser hücrelerinin sağ kalımında için önemli rol sahiptir. Tümör baskılayıcı p53'den onkogen SRC'ye, çok sayıda kinaz, telomeraz, hipoksi-indüklenebilir faktör 1 α (HIF1 α) ve UHRF1 gibi hücre büyümesinde rol oynayan birçok protein HSP90 client proteindir. Buna ilaveten destabilize onkogenik mutasyonlar, tümör hücrelerinin HSP90'a bağımlılığını arttırabilmektedir. Tümör hücrelerinde HSP90 düzeyi önemli derecede artmıştır. Örneğin, meme kanserlerinde HSP90 ifadenmesi negatif prognozla ilişkilidir (Whitesell ve Lindquist, 2005; Pick ve ark., 2007; Schopf ve ark., 2017). Başka bir dramatik örnek ise SRC tirozin kinazdır. Birçok onkogenik SRC mutantlarında kritik düzenleyici domain yani C-terminal domaini delesyona uğramıştır. Bu dominin fonksiyonu, intramoleküler SH2 dominlerinin etkileşimini sağlamaktır. Bu sayede molekül yapısı kararlı hale gelir ve kinaz aktivitesi baskılanır. Kesimlenme SRC'nin konformasyonel olarak kararlı olmayan ama sürekli aktif bir kinaz haline dönüşmesini sağlar. Normal c-SRC olgunlaşması ve hücre içerisindeki fonksiyonu için HSP90 ile sınırlı bir etkileşim içerisindeydir. Buna karşın v-SRC mutantları ise HSP90 ile alışılmadık biçimde

kararlı bir etkileşim içerisinde. HSP90 ile bu anormal etkileşim sayesinde artmış kinaz aktivitesinin başarılması ve sürdürülmesi v-SRC onkogenine transforme özelliği kazandırır (Whitesell ve Lindquist, 2005). Bir diğer örnek ise tümör baskılayıcı p53 proteinidir. Bu proteinde normal şartlar altında sentezlendikten sonra aktif formu alabilmesi ve proteozom yolağı ile parçalanmasının düzenlenmesi için HSP90 ile etkileşime girmektedir. Birçok insan kanserlerinde p53'ün çeşitli mutant formlarına sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bu mutant p53 proteinleri şaperonlarla etkileşime girmek suretiyle ubiquitinasyondan dolayısıyla degradasyondan kurtulmaktadırlar. Bu sayede tümör hücrelerinde mutant p53 düzeyi artmaktadır. Şaperona bağlı mutant p53 proteinleri tümör baskılayıcı bir fonksiyona sahip değildir. Bu mutant formlar heterodimer formları oluşturarak yabani tip p53'ün fonksiyonunu ayrıca inhibe edebilir veya normalde ifadenmemesi gereken genlerin ifadenmesini indükleyebilirler. HSP90 homologları, endoplazmik retikulum (glikoz ilişkili protein 94, GRP94) ve mitokondri (TNF reseptör ilişki protein 1, TRAP1)'de bulunur (Whitesell ve Lindquist, 2005).

HSP90α'nın tümör hücrelerini çevreleyen ekstraselüler matrikse segresyonu, matriks metalloproteaz-2 (MMP2)'nin aktivasyonuna yardımcı olmaktadır. Bu durum tümör hücrelerinin invazyonuna katkı sağlamaktadır (Eustace ve Jay, 2004).

HSP90'nın kanser gelişimdeki rolü sadece hücre homeostazisinde rol oynayan kritik proteinlerin HSP90 client protein olmasından kaynaklanmamaktadır. Ayrıca, HSP90 proteini, gen ifadenmesindeki epigenetik değişimleri ve kromatin yapısındaki kalıtlabilir değişimleri de etkileyebilmektedir. Mayalarda, HSP90 ko-faktörleri, DNA helikaz RVB1 ve RVB2 ile etkileşime girmektedir. Bu helikazlar, kromatin yeniden modelleme kompleksinin anahtar bileşenidir. Bu durum HSP90 ve genlerin epigenetik düzenlenmesi ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (Whitesell ve Lindquist, 2005). Kanser hücreleri, normal somatik hücrelere nazaran HSP90 inhibitörlerine daha duyarlıdır. Bu durum, tümör hücrelerinde multimoleküler komplekslerde HSP90 varlığını ile ilişkilidir (Kamal ve ark., 2003; Schopf ve ark., 2017). Bu sayede kimyasal HSP90 inhibitörleri için afinite artıyor olabilir. Ancak

son zamanlarda tümörlerin %50'sinden fazlasında tanımlanmış ve şaperonları, ko-şaperonları, adaptörleri ve client proteinleri içeren epişaperomlar nedeniyle tümör hücrelerinin HSP90 inhibitörlerine karşı duyarlılığı azalmaktadır (Rodina, 2016; Schopf ve ark., 2017).

Mesane kanserinde HSP90'ın aşırı ifadelenme düzeyi, patolojik sınıf ve evrelemede pozitif korelasyon göstermektedir. Yüksek grade tümörlerinde, HSP90, bazı hücrelerin yüzeylerinde ifadelenmektedir, bu durum göstermektedir ki HSP90'ın immün yanıtta olası bir katkısı bulunmaktadır (Cardillo ve ark., 2000; Ischia ve So, 2013; Soukup ve ark., 2015).

1.1.7. HSP90 İnhibitörleri

HSP90 üzerinde ATP bağlanma bölgesi özeldir. ATP'nin baz ve şekeri NTD domainine bağlanırken γ -fosfat grubu ise NTD ile ilişkili MD domainine bağlanmaktadır. Ayrıca ATP, "dirsek" konformasyonunda bağlanır. Bu özellik sayesinde kimyasal komponentler, HSP90'nın şaperon aktivitesini inhibe etmektedir. HSP90'a ATP'nin bağlanmasını inhibe eden örneğin ansamisin, geldanamisin ve radisicolün bilinen doğal komponentlerin yanı sıra sentetik inhibitörlerde dizayn edilmiştir (Schopf ve ark., 2017).

HSP90'nın C-terminaline bağlanan inhibitörler ise farklı şekilde hareket etmektedir. Bunlar TRP içeren ko-şaperonların büyük grupları ile HSP90'nın etkileşimi bozarak HSP90 aktivitesini inhibe ederler. Bu inhibitörlerden biri HSP90'nın CTD domainine bağlanan novobiosindir (Marcu ve ark., 2000). Bazı inhibitörler ise HSP90'nın N-terminalini hedefler (Whitesell ve Lindquist, 2005). HSP90 inhibitörlerinin büyük bir kısmı HSP90'a direkt olarak bağlanır, örneğin silibin, taxol, sisplatin, epigallokatekin-3 gallate ve sansalvamid A-amid ve oldukça etkilidirler (Garg ve ark., 2016). Son zamanlarda geliştiren derrubone, withaferin A ve celastrol gibi inhibitörler ise HSP90-ko-şaperon bağlanmasını bozarak HSP90 aktivitesini engeller (Garg ve ark., 2016; Schopf ve ark., 2017).

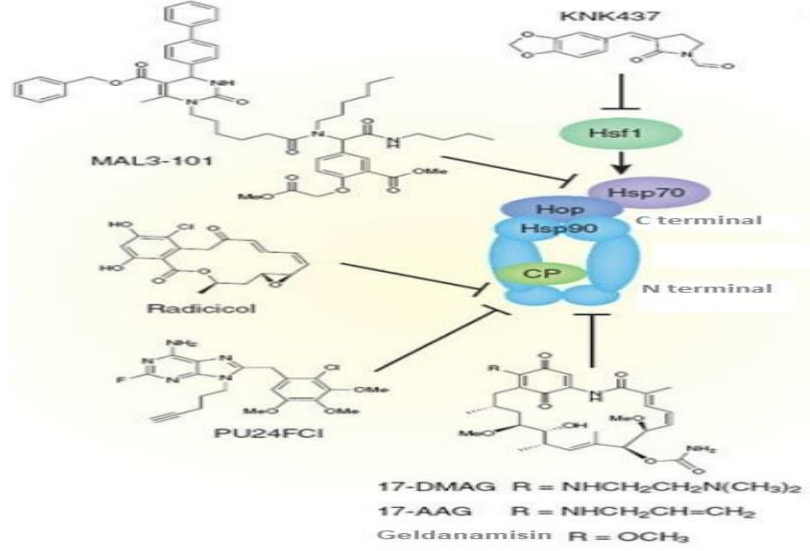
Bugüne kadar yaklaşık olarak 50 klinik denemede yapılmıştır. Bu klinik denemelerde kullanılan en az 15 farklı HSP90 inhibitörü vardır ve bunların çoğu geldanamisin analogudur (Schopf ve ark., 2017). Bununla birlikte son zamanlarda klinik denemelerde sentetik HSP90 inhibitörleri de kullanılmaktadır, örneğin; ganetespib ve PU-H71 (Caldas-Lopes ve ark., 2009).

Bu güne kadar, HSP90 inhibitörleri terapötik olarak beklenen ilgiyi görememiştir. Bunun nedeni, terapötik etkisinin halen tam olarak bilinmemesidir. Bu yüzden klinik uygulamalar şimdilik rafa kaldırılmıştır (Schopf ve ark., 2017).

1.1.7.1. Geldanamisin

Geldanamisin (GA), *Streptomyces hygroscopicus*'dan izole edilmiştir ve protozoa, bakteri ve fungusların büyümesini engellemektedir (Şekil 1.3) (Li ve ark., 2012). Benzokinon ansamisin antibiyotik olan GA, başlangıçta tirozin kinaz inhibitörü olarak geliştirilmiştir. Tirozin ve Serin/Threonin kinazların proteozom yolağıyla parçalanmalarını indükler (Khandelwal ve ark., 2015). GA'nın kanser tedavisindeki rolü ilk olarak Src tirozin kinazı inhibe ederek kanser hücrelerinin proliferasyonunu durdurmasıyla gösterilmiştir. Ancak bu etkisini direkt olarak kinaz aktivitesini inhibe ederek gösterememektedir (Whitesell ve ark., 1992). Yapılan çalışmalarda GA'nın anti-proliferatif etkisini HSP90'a bağlanmak suretiyle gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bunu, HSP90'nın N-terminal bölgesinde yer alan ATP/ADP bağlanma bölgesine bağlanıp client proteinlerin HSP90'a bağlanmasını inhibe ederek yapmaktadır. Diğer nükleotid bağlanma proteinleri ile karşılaştırıldığında HSP90 için GA'nın spesifik olmasının nedeni HSP90'nın özel ATP bağlanma bölgesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Li ve ark., 2012; Khandelwal ve ark., 2015). Yapısal-aktivite analizleri, GA'nın 2,3 çift bağı, kararlı HSP90 konformasyonu için gereklidir; 17-hidroksi ve 17-metoksi kısmı, hidrojen bağının oluşmasına katkı sağlar ve GA veya türevlerinin HSP90'a bağlanma afinitesini artırır, böylece GA'nın anti kanser aktivitesinin artmasına yol açar (Roe ve ark., 1999). Bu durum, HSP90

inhibitörlerinin etkinliğinin, HSP90'a bağlanma afinitesi ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir.



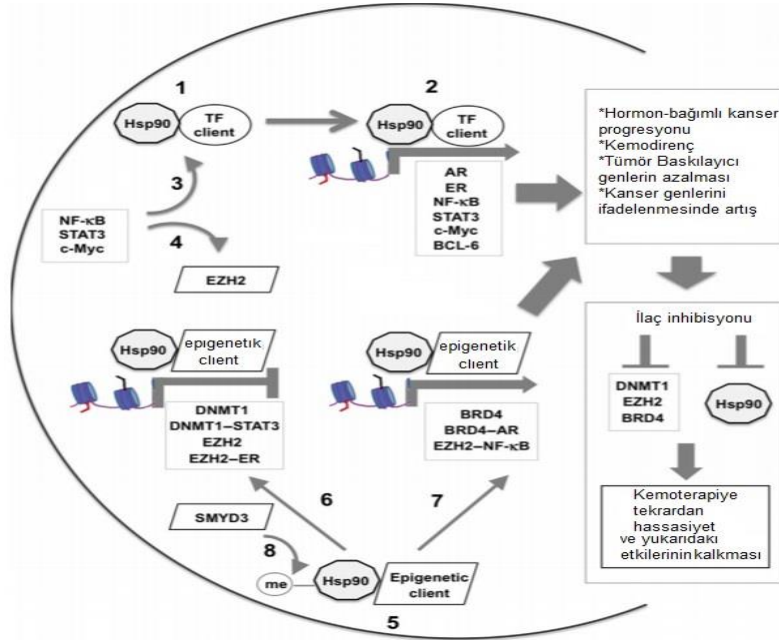
Şekil 1.3. HSP90 inhibitörleri (Workman ve Powers, 2007'den modifiye edilmiştir).

GA'nın yapısındaki modifikasyonlar onun hepatotoksitesini azaltırken suda çözünürlüğünü arttırmaktadır (Şekil 1.3). GA'nın yapısındaki benzokinon grubunun 17. pozisyonu ile etkin türevler oluşturulmaktadır; 17-allilamino-17-demetoksi geldanamisin (17-AAG) ve 17-*N,N*-dimetilaminoetilamino-17-demetoksi geldanamisin (17-DMAG) (Li ve ark., 2012).

17-AAG, GA'nın metoksi kısmının, amino grubu ile yer değiştirilmesiyle oluşan bu türev klinikte kullanılan ilk HSP90 inhibitörüdür. 17-AAG, sitokrom P450 CYP3A4 aracılığıyla 17-demetoksigeldanamisine (17-AG) metabolize edildiğinde GA'ya nazaran hepatotoksitesi düşüktür (Sausville ve ark., 2003). 17-AAG, GA'ya nazaran HSP90'a bağlanma afinitesi nispeten fazla olmasına karşın anti kanser aktiviteleri benzerdir (Khandelwal ve ark., 2015). Ancak 17-AAG'nin çözünürlüğünün düşük olması klinik araştırma ve uygulamalarını sınırlamaktadır.

1.1.8. HSP90 ve Epigenetik Düzenlenme

HSP90, hücrel proteostaziye sağlayan önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle, epigenetik düzenlenmelerde de önemli bir role sahip olması şaşırtıcı değildir. HSP90 proteini, hücre proliferasyonundan sorumlu, apoptozun düzenlenmesinde, regülatör kinazları, steroid hormon reseptörleri, ve transkripsiyon faktörlerinin içerisinde yer aldığı anahtar sinyal proteinlerinin olgunlaşmasından sorumludur (Prodromou , 2016). Bu sinyal moleküllerinin yanı sıra epigenetik düzenlenmede rol oynayan anahtar proteinlerin regülasyonundan sorumludur. HSP90 sitoplazmik lokalizasyonunun yanı sıra nükleus içerisinde DNA bağlama proteinlerine bağlı olarak da bulunmaktadır (Şekil 1.4). Bu durum göstermektedir ki, HSP90 protein katlanmasının yanı sıra epigenetik düzenleyiciler dahil birçok genin transkripsiyonunda da önemli rol oynamaktadır (Isaacs, 2016).



Şekil 1.4. HSP90 ve epigenetik düzenleyiciler (Isaacs, 2016).

Gen aktivasyonu için kromatin yapısında geniş ölçüde değişiklikler meydana gelmektedir. HSP90, kromatin yeniden modellenmesinde bir regülatör olmasından dolayı gen düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Doksanlı yıllarda bile HSP90'nın histon proteinleri ile etkileşime girdiği bilinmekteydi ve özellikle histonların DNA bağlanmasında kolaylaştırıcı bir rolü bulunmaktadır. HSP90'nın kromatin bağlı epigenetik fonksiyonundan dolayı genlerin transkripsiyonunu önemli ölçüde etkilemektedir (Isaacs, 2016).

CARM1 (koaktivatör-ilişkili arjinin metiltransferaz 1) enzimi, histon H3'in arjinin-17'den metillenmesinden sorumludur olup östrojen reseptörü (ER) ile ilişkilidir ve transkripsiyon regülasyonunda önemli role sahiptir. ER, HSP90 aracılığıyla regüle edilir. Örneğin, östrojenin varlığında ER, HSP90'dan salınır ve ligand bağlı ER, spesifik genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Carascossa ve ark., 2010). Bir diğer örnek ise SYMYD3 (SET- ve MYND- domain içeren 3), insan histon H3 lizin-4 metiltransferaz'dır ve optimal aktivitesi için HSP90'a ihtiyaç duyar. SMYD3, normal organ gelişiminde ve tümörlerde hücre davranışı ve morfogenezde önemli olan WNT genlerinin aktivasyonu için gereklidir (Calderwood ve Neckers, 2016).

Hücresinin normal gelişim sürecinde, hücre soylarının spesifikasyonunda epigenetik mekanizmalardan biri olan Polykomb (PcG)-Trithoraks(Trx) ailesi üyeleri önemli rol oynamaktadır. Gen düzenlenmesinde PcG ve Trx birbirinin zıttı etki gösterir. Bilindiği üzere kromatin yapısı ve transkripsiyonun düzenlenmesinde histonların post-translasyonel modifikasyonları önemli rol oynamaktadır. Trx, aktif kromatin yapısının belirteci olan histon H3 lizin 4 trimetilasyonundan sorumlu iken PcG ise gen ifadenin baskılanma belirteci olan histon H3 lizin 27'nin trimetilasyonundan sorumludur. Trx, HSP90 client proteinlerinden biridir ve Trx hedef genlerinin promotor bölgelerinde HSP90 ve Trx birlikte lokalize olmaktadır. Trx grup proteinler SET domaini içerir. Benzer şekilde MLL1 (Karışık soy lösemi protein-1)'de SET domain içerir. Bu proteine erken gelişim ve hematopoez süresince önemli rol oynar ve HSP90 substratlarından biridir. MLL1 ayrıca, HSP90

inhibisyonu aracılığıyla ısı şok cevabının indüksiyonu kolaylaştırır (Tariq ve ark., 2009; Chen ve ark., 2014).

HSP90'ın SET domaini içeren epigenetik düzenleyici client proteinleri içerisinde SMYD2 ve SMYD3 histon metiltransferazlar da yer almaktadır. SMYD proteinler gen ifadenmesini ve DNA hasar cevabını kontrol eder. Bu nedenle, kanser tedavisinde terapötikler olarak ilgi çekmektedir (Spellmon ve ark., 2015). Bu enzimler histonları ve histon olmayan hedefleri metile ederler. İlginç olan ise SYMD güdümlü metilasyon için HSP90 substrattır (Hamamoto ve ark., 2004; Abu-Farha ve ark., 2011). HSP90, SMYD2'nin katalitik aktivitesini artırırken SMYD3 eşgüdümlü HSP90 metilasyonu ise HSP90-koşaperon etkileşimini artırır (Abu-Farha ve ark., 2008; Abu-Farha ve ark., 2011). Çeşitli kanserlerde Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)'nin düzeyi önemli ölçüde artmaktadır. EZH2'nin inhibisyonu kanser hücrelerini kemoterapötiklere karşı hassas hale getirir. Benzer şekilde HSP90'ı hedefleyen inhibitörler kullanıldığında da gözlemlenmektedir (Mitsiades ve ark., 2006; Sang ve ark., 2013; Miyajima ve ark., 2013; Acquaviva ve ark., 2014; Ku ve ark., 2014; Yamaguchi ve Hung, 2014). EZH2'nin katalitik aktivitesini arttırıcı nokta mutasyonu sonucu oluşan mutant formları da normal EZH2'ler gibi HSP90'la etkileşime girer (Isaacs, 2016).

EZH2'nin metiltransferaz aktivitesi yanında direkt olarak hedef genlerde DNMT'ların toplanmasını sağlar (Reynolds ve ark., 2006). EZH2, özellikle DNMT1 ile etkileşime girer ve hedef genlerde DNMT1'in toplanmasını sağlar, böylece *de novo* DNA-bağımlı metilasyon indüklenir (Schlesinger ve ark., 2007). Ayrıca, HSP90'nın inhibisyonu DNMT1'in proteolitik parçalanmasına neden olur (Fiskus ve ark., 2009).

Hipoksinin düzenlediği histon demetilaz KDM3A'da HSP90 client proteindir (Kasioulis ve ark., 2014). KDM3A tümörögenizde önemli role sahiptir ve aktif transkripsiyon işareti olan H3 lizin 9'dan metil gruplarının uzaklaştırılmasından sorumludur (Wilson ve ark., 2017). Bir diğer histon post-translasyonel

modifikasyonundan sorumlu olan HSP90 client proteini, PRMT5'dir. PRMT5 bir arjinin metiltransferazdır ve MYC aracılığıyla regüle edilir (Koh ve ark., 2015). PRMT5 ayrıca malign sinyalizasyonda sitosolik hedefleri metiller (Wei ve ark., 2013),

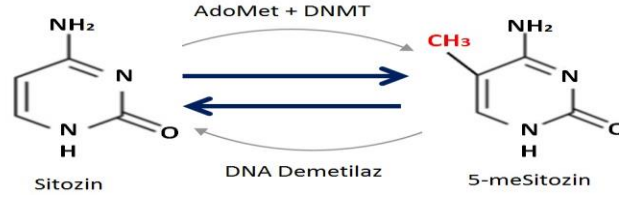
Ipenberg ve ark. çalışmasında (2013), HSP90'ın client hedeflerinden birinin histon demetilaz KDM4B olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmalarında HSP90'ı GA ile inhibe edilmesini takiben KDM4B'nin ubiquitin bağımlı yolak aracılığıyla parçalandığını ve bunun sonucu olarak H3 lizin 9 trimetilasyon düzeyinde artış olduğunu göstermişlerdir.

1.2. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik, DNA sekansında herhangi bir değişim olmaksızın gendeki stabil kalıtılabilen değişimler olarak ifade edilmektedir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA'lar ve nükleozom pozisyonlama gibi epigenetik değişiklikler, kanser vakalarında sık karşılaşılmaktadır ve neoplastik fenotipin oluşumuna önemli katkı sağlamaktadır. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları en çok çalışılan epigenetik mekanizmalardandır. Genlerin kontrol bölgelerinde yer alan CpG adacıkları adı verilen bölgelerde meydana gelen metillenme söz konusu genlerin transkripsiyonunu tamamen veya kısmen durdurur. Bununla birlikte, gen ifadenmesinin baskılanmasına neden olan ikinci bir epigenetik mekanizma ise histon modifikasyonlarıdır ve genellikle DNA metilasyonunun bir sonucu olarak meydana gelir (Llinàs-Arias ve Esteller, 2017). Histon modifikasyonları içerisinde, Histon 3 (H3) deasetilasyonu, H3 lizin 4 (H3K4)'ün demetilasyonu ve H3 lizin 9 (H3K9)'un metilasyonu gibi histon modifikasyonları heterokromatin bölgeler için bir belirteçtir (Zhang,2007).

1.2.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda adenin ve sitozin bazlarında meydana gelmekte ve ilk kez Hotchkiss tarafından 1948 yılında gösterilmiştir (Turek-Plewa ve Jagodziński, 2005). DNA metilasyonu genellikle 5'-CpG-3' sekansında meydana gelmektedir. Memeli genomunda metilasyon yalnızca CpG dinükleotidlerindeki sitozin bazının 5. pozisyonundaki karbonuna metil (-CH₃) grubunun kovalent bağla eklenmesiyle meydana gelir (Baylin, 2005) (Şekil 1.5). Herhangi bir metil grubu DNA'nın büyük oluşuna bağlandığından dolayı Watson/Crick baz eşleşmesini bozmamasına rağmen DNA-protein etkileşimini etkilemektedir. CpG adacıkları, "temel genler" olarak bilinen genlerde ve doku tipine özgü genlerin genellikle 5' promotör bölgelerinde yer almakla birlikte genlerin ekzonlarında da bulunmaktadır. Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon DNA replikasyonunda sonra meydana gelir ve bu olay DNA metiltransferaz (MTaz) enzimi tarafından katalizlenir. DNA MTaz enzimi, genomik DNA'daki CpG adacıklarını substrat olarak kullanır. Razin ve grubu tarafından keşfedilen ilk memeli DNA MTaz DNMT1 (DNA methyltransferase 1) 'dir. Bütün DNA MTaz'lar S-adenozil-L-metiyonin (AdoMet)'i metil grubu kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Memeli sitozin DNA MTaz enzimi, substratlarına göre, *de novo* MTaz (DNMT 3A ve 3B) ve sürdürme (maintenance) MTaz (DNMT1) olmak üzere 2 gruba ayrılır. Memeli DNA metilasyon profilleri erken gelişim döneminde *de novo* metiltransferazlar DNMT3A ve DNMT3B tarafından postreplikasyonel m⁵C'e dönüştürürken sürdürme metiltransferaz DNMT1 aracılığıyla ise replikasyon süresince yarı metile DNA'ya metil grubunu ekleyerek somatik hücrelerde metilasyon kalıbı kopyalanmaktadır. DNA metilasyonu DNA'nın içerdiği epigenetik bilginin önemli bir taşıyıcısıdır (Hermann ve ark., 2004). DNA metilasyonunun memelilerde gen baskılanması, hücresel gelişim ve farklılaşmanın kontrolü, kromozomal bütünlüğünün korunumu, paternal imprinting ve X kromozomunun inaktivasyonu, endojen retrovirüslerin sessizleştirilmesi ve homolog rekombinasyonun engellenmesine gibi çok çeşitli önemli fonksiyonlara sahiptir. Genomik metilasyon profilindeki değişimler kanser gelişimine önemli role sahiptir.



Şekil 1.5. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-mC'in mutagenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi.

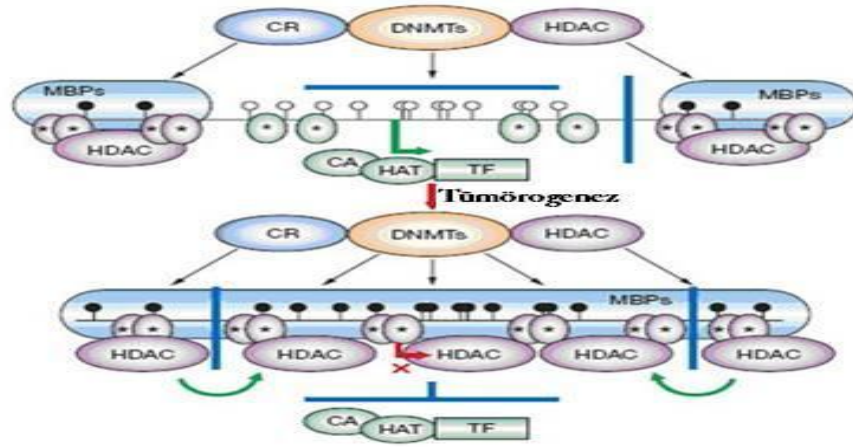
Ayrıca DNA metilasyonu, asetilasyon, metilasyon, ubiquitinasyon ve fosforilasyon gibi dinamik histon modifikasyonları ile birlikte hedef genlerin ifadenmelerinin düzenlenmesinde işbirliği içerisinde hareket ettiği görülmektedir (Esteller, 2007).

1.2.2. Epigenetik Sinyal Olarak DNA metilasyonu

CpG adacıklarında meydana gelen metilasyonu gen ifadenmesini iki yolla düzenler. Metilasyon, çift zincir formunu bozmamasına rağmen transkripsiyon faktörleri gibi özellikle genlerin promotor bölgelerine bağlanan DNA bağlanma proteinlerinin bağlanmasını engeller veya metil bağlanma proteinleri (MBP) gibi metile sitozeni tanıyıp bağlanan proteinlerinin bu bölgelere bağlanmasına yol açarak hem transkripsiyon faktörlerin bağlanmasını engeller hem de heterokromatin bölgelerin oluşumu için gerekli proteinlerin bu bölgede toplanmasına neden olur. Dolayısıyla, DNA metilasyonu geniş ölçüde kromatin organizasyonu ile ilişkilidir; Unmetile bölgeler ökromatin bölgeleri, aşırı derecede metillenmiş bölgeler heterokromatin bölgeleri işaret etmektedir (Esteller, 2007).

DNA metilasyonu, histon kuyruğu modifikasyonları ile fonksiyonel olarak bağlantılıdır. DNA genellikle unmetile durumda iken histonlar asetile durumda, metillenmiş ise genellikle histonlar deasetile durumdadır (Şekil 1.6). DNA metilasyonu ve histon kuyruğu deasetilasyonu birbirini tetiklemek suretiyle sinerjik olarak hareket eder ve baskılanmış kromatin yapısını oluşturur. Epigenetik gen düzenlenme fonksiyonunun kalıtılabilmesi oldukça önemli olup geri dönüşümlüdür.

Ayrıca, ökromatin ve heterokromatin bölgeler, replikasyon mekanizması ve zamanı bakımından farklılık göstermektedir. Heterokromatin bölgeler geç replike olurken ökromatin bölgeler daha erken replike olmaktadır. Heterokromatin yapısının oluşumu, geniş ölçüde gen baskılanmasının etkin ve kararlı bir şekilde olmasını sağlar (Hou ve ark., 2008).



Şekil 1.6. DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel baskılanma mekanizması. HDAC; Histon deasetilaz, TF; Transkripsiyon faktörü, CR; Ko-aktivatör, HAT; Histon asetilaz, MBP; Metil sitozin bağlanma proteini, DNMT; DNA MTaz enzimi, CR; Korepresör (Baylin, 2005).

1.2.3. Epigenetik Sinyal Olarak Histon Modifikasyonlar

Histonlar, kromatinlerin başlıca protein komponentleridir. Ökaryotlarda, her bir nükleozom yapısı, Histon 2A (H2A), Histon 2B (H2B), Histon 3 ve Histon 4 (H4)'den oluşan ve herbirinden iki kopya içeren kor histon oktomeri ile bunu çevreyen 147 bç uzunluğundaki DNA'dan oluşmaktadır. Elektron mikroskobu ile fotoğraflanan bu nükleozom yapıları "beads on a string" denilen tespih taneleri şeklinde yan yana yer almaktadır. Bu yapıda "boncuk" nükleozomları " iplik" ise bağlayıcı DNA'yı ifade etmektedir. Her nükleozom yapısı ise sıkı paketlenmede birbirlerine bağlayıcı histon adı verilen Histon 1 (H1) ile birbirlerine bağlanmaktadır. Histon proteinleri, basitçe "DNA paketlenme" proteinleri değildir, bu proteinler aynı zamanda kromatin dinamiğinin düzenleyicileri olarak tanımlanırlar. Histon

proteinleri, belirli amino asitler (a.a)'lerden asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon, ubiquitinasyon, glikosilasyon, sümolasyon gibi çok çeşitli modifikasyonlara maruz kalır. Bu modifikasyonlar primer olarak, histon proteinlerinin amino uç kuyruklarında meydana gelir. Bu modifikasyonlar, kromozom fonksiyonunu en az iki şekilde etkilemektedir. İlk mekanizmada histon proteinlerinin yükü değişir. Bunun sonucunda histon yapısı veya DNA'ya bağlanma afiniteleri değişir. İkinci mekanizmada ise bu modifikasyonlar protein tanıma modülleri için bağlanma bölgesi oluşturur, örneğin, bromadomainler veya kromodomainler sırasıyla asetillenmiş lizin veya metillenmiş lizini tanıyarak bağlanır.

Histonların her bir post-translasyonel modifikasyonu için çeşitli enzimler bulunmaktadır. Bu enzimler, hedef histondaki amino asitlere bu modifikasyon işaretlerini ekler veya çıkarır. Bu düzenlenmedeki başlıca enzimler histon asetiltransferazlardır. Bu enzimler, histon kuyruklarına asetil grube ekler ve asetillenme kromatinin dekonkonsansasyonuna yol açar. Histon kuyruğundan asetil grubunu uzaklaştıran enzimler ise histon deasetilaz (HDAC)'lar olarak isimlendirilir ve histonların DNA'ya sıkıca bağlanmasına katkıda bulunur. Histon metiltransferazlar, hedefledikleri histon rezidüsüne göre transkripsiyonu baskılar veya teşvik ederken, histon demetilazlar (HDM) ise HMT'lerin etkisini ortadan kaldırır. Histon modifiye edici enzimler, histon proteinlerini sekans spesifik transkripsiyon faktörleri aracılığıyla hedefte toplanmasını sağlayarak lokal olarak veya hedeflenmemiş şekilde hemen hemen genomdaki bütün nükleozomları global olarak etkiler (Fullgrabe ve ark., 2011). Lokal ve global etkiye sahip histon modifiye edici enzimler, gen aktivitesini düzenler. Bu yüzden histon proteinleri, farklı substrat spesifitesine sahip histon modifiye edici enzimlerle bir genden başlayarak büyük bir kromozom bölgesi ve hatta tek bir hücrede hiyerarşik bir yapı içerisinde lokal ve global olarak modifiye edilir. Bu enzimler kanser hücrelerinde deregüle durumdadır. Histon modifiye edici enzimlerin kapsamlı bir şekilde ifadenme analizleriyle, tümör hücreleri ve onların normal suretlerinin ayrımı ve hatta hücre tipine göre tümör örnekleri kümelenendirilebilir (Özdağ, 2006). Bu durum göstermektedir ki,

histon modifiye edici enzimlerin ifadenmelerindeki değişimler oldukça önemli ve kanser gelişimde tümöre özgü role sahiptir.

Histon modifikasyonlarındaki ve gen ifadenmelerindeki çalışmalar sonucunda genlerin transkripsiyona uğraması kısmen histon modifikasyonlarına bağlı olduğu görülmüştür. Bu durum ilk olarak, Strahl - Allis (2000) ve Turner (2000) tarafından ileri sürülmüş ve "histon kod" hipotezi olarak adlandırılmıştır. Bu histon kodu, kromatin yapısındaki ve nüklear fonksiyonların düzenlemesindeki histon modifikasyonlarını kapsar. Histon kod hipotezine göre, histonların kovalent post translasyonel modifikasyonlarının farklı kombinasyonları, kromatin yapısını etkiler ve çeşitli transkripsiyon ürünlerinin oluşumuna yol açar. Örneğin, bazı histon modifikasyonları, apoptozun indüklediği kromatin değişiklikleri ile sıkı bir şekilde ilişkilidir ve bu durum "apoptotik histon kod" olarak adlandırılır (Fullgrade ve ark., 2011).

1.2.4. DNA Metilasyonunun Histon Modifikasyonlarına

Epigenetik mekanizmalar içerisinde en çok çalışılan DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu ve kanser arasındaki ilişki ilk kez 1983 yılında ortaya konmuştur. Feinberg ve Volgestein'in çalışmasında normal hücrelere nazaran kanser hücrelerinde hipometilasyonun arttığını göstermişlerdir. Tümörögenезin erken aşamasında meydana gelen tekrar dizilerindeki global hipometilasyon genomik kararsızlığa yol açmaktadır. Kanserde, hipermetilasyondaki değişimler ise kromatin yapısının değişmesine ve sonuçta transkripsiyonel baskılamaya yol açmaktadır. Neoplastik hücrelere yaşama avantajı sağlayan çoklu tümörle ilişkili genlerdeki değişmiş metilasyon profillerine kanser hücrelerinde sıklıkla karşılaşılmaktadır. Hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre sinyalizasyonu, tümör hücre invazyonu, kromatin yeniden düzenlenme, apoptoz, DNA onarımı ve transkripsiyon ile ilişkili genlerdeki anormal hipermetilasyon ve baskılanma hemen hemen bütün tümör hücrelerinde görülmektedir. DNA metilasyon paterninin oluşturulması ve devam ettirilmesinden sorumlu enzimler DNA metiltransferazlardır. Son zamanlardaki çalışmalar

göstermektedir ki, DNAmetilasyonu ve histon modifikasyonları bir biri ile ilişkidir ve bu ilişkide HMT'ler ve DNA metiltransferazlar bir biri ile etkileşim içerisinde. Kanseri hücrelerindeki promotör CpG adacık hipermetilasyonu, histon H3 ve H4 deasetilasyonu, histon H3 lizin trimetilasyon kaybı, H3K9 ve H3K27 trimetilasyon kazanımlarını içeren belirli histon modifikasyonları ile sıkı bir ilişki içerisinde (Fullgrade ve ark., 2011). Bazı çalışmalar, gen baskılanmasında DNA metilasyon paterni, histon modifikasyonlarına rehberlik ettiği yönünde olsa da gittikçe artan çok sayıdaki çalışma göstermektedir ki, DNA metilasyonunu birincil olarak histon modifikasyonları belirlemektedir (Cedar ve Bergman, 2009). Sonuç olarak, tümör hücrelerinde gen transkripsiyonu ve anormal gen baskılamasında DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları arasında karşılıklı bir etkileşim vardır.

1.2.5. Kanserde Histon Onko-Modifikasyonlar ve Histon Modifiye Edici Enzimler

Normal ve hastalıkla ilişkili çok çeşitli süreçlerin düzenlenmesinde post-translasyonel modifikasyonlar önemli rol oynamaktadır. Histon modifikasyonlarının önemli rolleri dikkate alındığında kanser hücrelerinde anormal histon modifikasyon paternlerinin gözlemlenmesi şaşırtıcı değildir. Bugüne kadar kanserle ilişkili 60 histon rezidüsünde çeşitli modifikasyonlar tanımlanmıştır. Bununla ilaveten kanser hücrelerinde histon modifiye edici enzim düzeylerinde de sıklıkla değişimler meydana gelmektedir (Şekil 1.7) (Kouzarides, 2007; Fullgrade ve ark., 2011).



Şekil 1.7. Nükleozom yapısındaki histon posttranslasyonel modifikasyonlar. A: asetilasyon, M:metilasyon, P: fosforilasyon, U: Ubiquitinasyon (Portela ve Esteller, 2010).

Gen ifadenmesinin düzenlenmesi genel olarak histon kuyruklarındaki spesifik modifikasyonlar ile ilişkidir. H3K4me³ gibi H3K9ac, genel olarak aktif transkripsiyona sahip gen promotor bölgelerinde bulunur iken H3K27me³, H4K20me³, H3K9me³ gibi modifikasyonlar ise transkripsiyonel olarak inaktif gen bölgelerinde bulunur. Bu modifikasyonlar, gen ifadenmesinin kontrolü için önemli role sahiptir ve kanserlerde deregüle durumdadır. Aslında histon modifikasyonlarındaki değişimler, kanser gelişiminde önemli role sahip birçok genin ifadenmesindeki aberasyonlar ile ilişkilidir (Portela ve Esteller, 2010; Fullgrade ve ark., 2011).

Global histon modifikasyonlardan sorumlu histon modifiye edici enzimlerin aktiviteleri, hem ökromatin hemde heterokromatin bölgeleri etkilemektedir. DNA metilasyonunun ve heterokromatin bölgelerdeki baskılayıcı histon modifikasyonlarının global kaybı genomik kararsızlığa yol açmaktadır. Transpozonların, genlerin içine veya yakınına transloke olması gen fonksiyonunu bozabilir. Bu nedenle bu bölgeler hem DNA metilasyonuyla hem de H3K9me^{2/3} aracılığıyla sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu baskılayıcı epigenetik işaretlerin kaybı transpozon elementlerinin rastgele transloke olmasına neden olmakta ve bu durum kanser gelişimini hızlandırmaktadır. Benzer şekilde kanserde imprinting kayıpları, genomik kararsızlığın özelliğidir. İmprint genler, H3K9me³, H4K20me³,

H3K27me³, demetile H3K4 ve CpG adacıklarındaki DNA metilasyonu ile ilişkili olup kanserlerde bu modifikasyon kayıplarına sıklıkla karşılaşılmaktadır (Fullgrade ve ark., 2011).

Hücre döngüsü süresince DNA replikasyonu kritik bir aşamadır, bu aşamadaki bir düzensizlik kardeş hücrelerde çoklu kromozom kopyalarının oluşumuna yol açar. Bu aşama, hücre döngüsü kontrol noktaları aracılığıyla sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Hücre döngüsü kontrol nokta komponentleri olan cdk inhibitörler kanser hücrelerinde genellikle epigenetik olarak sessizleştirilmiştir. Buna ilaveten H3K4, HMT MLL1, hücre döngüsü kontrolünün doğruluğunu regüle eder ve kanserlerde füzyon MLL proteinleri ile sıklıkla karşılaşılmaktadır (Liu ve ark., 2010b). Bununla birlikte, H4K20me HMT enzimi PR-Set7, S fazı kontrol noktasını kontrol eder. Pr-Set7 bağımlı H4K20 metilasyonu S fazı süresince genom replikasyonu ve stabilitesi için gerekli olan post-translasyonel modifikasyondur (Jorgensen ve ark., 2007; Tardat ve ark., 2007).

DNA replikasyonundaki başarısızlıklar DNA onarım sistemi tarafından düzeltilerek genom bütünlüğü sağlanmaktadır. Genotoksik ajanlara maruziyet, DNA hasarına özellikle çift iplikçik kırıklarına yol açmaktadır. DNA hasar süresince histon modifikasyonları önemli rol oynamaktadır. Örneğin DNA hasarı nedeniyle H3K56ac ve H3K9ac'yı azalmaktadır (Tjeertes ve ark., 2009). Bununla birlikte başka bir çalışmada ise DNA hasarında H3K56ac'unun arttığı bildirilmiştir (Das ve ark., 2009). Kontrol noktası mediyatörü 53BP1 direkt olarak DNA çift iplikçik kırığının etrafındaki kromatin bölgesinde toplanır. Bu etkileşim için H4K20me^{1/2} veya H3K79me2 aracılığıyla gerçekleşmektedir (Jorgensen ve ark., 2007). Bu histon modifikasyonlarının kaybı DNA hasar cevabının bozulmasına yol açar. Dolayısıyla bu durum kanser gelişimine önemli katkı sağlamaktadır.

1.2.6. Histon 4 Lizin 20 (H4K20) Trimetilasyonu

Histone H4 metilasyonu ilk keşfedilen histon post-translasyonel modifikasyon olmasına karşın henüz bu modifikasyonu katalizleyen enzimler tam olarak tanımlanabilmiş değildir. Memeli hücrelerinde Histon H4 metilasyonunun büyük bir kısmı lizin 20'de (H4K20) meydana gelmektedir. H4K20 metilasyonu, mono, di ve trimetilasyon olmak üzere üç farklı şekilde meydana gelmektedir. Herbir metilasyon farklı biyolojik sonuçları bulunmaktadır; H4K20 mono ve dimetilasyon, DNA replikasyonu ve DNA onarımı için önemli iken H4K20 trimetilasyon ise sessizleştirilmiş heterokromatin bölgeler için bir belirteçtir (Jorgensen ve ark., 2013). H4K20 metilasyonu, kromatin represyonu ile ilişkilidir. Özellikle, H4K20me³, sürekli heterokromatin bölgelerde sessizleştirilmiş genlerin içeren kromatin bölgelerinde bulunur (Alberts ve Helin, 2010; Fullgrade ve ark., 2011). Bütün kanser hücrelerinde H4K20me³ düzeyinde global bir azalma görülmektedir. Tekrar sekanslarında meydana gelen bu azalma, global DNA metilasyonu ve H4K16ac kaybı ile ilişkilidir. Bununla birlikte, kanser gelişimi süresince genlerin lokal olarak baskılanması H4K20me³ varlığı ile ilişkilidir. H4K20 metilasyonu kompleks bir olaydır (Alberts ve Helin, 2010; Fullgrade ve ark., 2011). Günümüzde sadece spesifik olarak monometiltransferaz enzimi SET8 (PR-SET7 olarak da bilinmektedir) tanımlanmış olmasına karşın di- ve trimetiltransferazlar SUV4-20H1 ve SUV4-20H2 enzimlerinin içerisinde olduğu bazı HMT'ler tarafından da bu modifikasyon katalizlenir (Alberts ve Helin, 2010; Fullgrade ve ark., 2011; Jorgensen ve ark., 2013). H4K20 monometilasyonu SET8 tarafından katalizlenir ve Suv4-20h'ın H4K20me^{2/3}'ü katalizleyebilmesi içinde substrat olarak kullanılır. Çeşitli kanser hücrelerinde H4K20me³ düzeyinde azalma Suv4-20h2 enzim düzeyindeki azalma ile paralellik göstermektedir (Alberts ve Helin, 2010; Fullgrade ve ark., 2011). Memelilerde farklı H4K20 metilasyonu için spesifik enzimler kullanılmaktadır.

1.2.7. Histon 3 Lizin 27 (H3K27) Trimetilasyonu

Histon 3'ün lizin 27'den trimetilasyonu ($H3K27me^3$), genellikle polikomb protein sistemi aracılığıyla bu modifikasyon gerçekleşmektedir. Özellikle polikomb baskılayıcı kompleks 2 (PRC2) tarafından H3K27'ün metilasyonu gerçekleştirilir. Bu post-translasyonel modifikasyon, gen baskılanması ve fakültatif heterokromatin oluşumu için bir işarettir (Jiao,2016). $H3K27me^3$, özellikle soy spesifitesi sürecinde istenmeyen farklılaşma programından sorumlu genlerin baskılanması ile ilişkidir. $H3K27me^3$, prostat, meme, over, pankreas ve özofagus kanserlerinde prognostik faktör olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, düşük $H3K27me^3$ ekspresyonu olan kanser hastaları yüksek ifade edilenler ile karşılaştırıldığında yüksek $H3K27me^3$ sahip hastaların yaşam süreleri oldukça kısalmaktadır. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), polikomb baskılayıcı kompleks 2'nin bir alt ünitesidir ve H3K27'nin trimetilasyonunu katalizlemektedir (Fullgrade ve ark., 2011). Son zamanlardaki çalışmalarda bir çok kanser türünde EZH2'nin ifadenme düzeyinin oldukça arttığı ortaya konmuştur. EZH2'nin aşırı ifadenmesi, özellikle prostat kanserinin progresyonu ve invazyonu ile ilişkilidir (Yu ve ark., 2007). Genel olarak, EZH2'nin ifade düzeyinin artması kanser hücrelerinde $H3K27me^3$ düzeyinin artışına neden olmaktadır. Bununla birlikte, Wei ve ark. çalışmalarında (2008), meme, over ve pankreas kanserlerinde EZH2 ve $H3K27me^3$ düzeyi arasında bir ilişki olmadığı ifade edilmiştir. Bir ilişki bulunamamasının nedeni, $H3K27me^3$ 'den sorumlu histon demetilazlarının düzeyindeki artıştan kaynaklanıyor olabilir. H3K27'deki trimetilasyonun kaldırılmasından sorumlu sorumlu olan HDM'ler JMJD3/KDM6B ve UTX'dir. Son zamanlarda kanserlerde özellikle multiple miyelomada UTX enziminde inaktive edici mutasyonları bildirilmiştir. JMJD3, tümör gelişimi ile bağlantılıdır. JMJD3, Epstein-Barr virüsü indüklenmekte ve Hodgkin lenfomlarda aşırı ifadenmektedir (Anderton ve ark., 2011). Prostat kanserlerinde özellikle metastatik tiplerinde aşırı ifadenmektedir (Xiang ve ark., 2007). Buna ilaveten, fare embriyonik fibroblastlarında JMJD3'in inhibisyonu $p16^{INK4a}$ ve $p19^{ARF}$ 'nin ifadenmesini ve onların immortalizasyonlarını baskılamaktadır (Agger, ve ark. 2009). Kanserde $H3K27me^3$ 'den sorumlu olan enzim aktivitelerinin artması veya

azalması göstermektedir ki bu hassas metilasyon dengesi, normal hücre büyümesi için kritik öneme sahiptir (Martinez ve Licht, 2010).

1.3.AMAÇ

HSP90, hücrel proteostazinin gardiyanları olarak kabul görmektedir ve yüzlerce client proteini bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda HSP90 client proteinlerinin büyük bir kısmı HSP90 bağlanma domaini içeren sitosolik reseptörlerdir (Taipale ve ark., 2012). Örneğin, mitokondrial HSP90 hücrel metabolizmada anahtar role sahiptir ve kanser progresyonunda önemli fonksiyonları bulunmaktadır (Chae et al., 2013). HSP'ler kasa invaze olan ve olmayan mesane kanserlerinde ifadenme düzeyi önemli derecede artmaktadır (Ischia ve So, 2013). Bu durum mesane kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasını ve birçok genomik mutasyonlara rağmen kanser hücrelerinin yaşamasına önemli katkı sağlamaktadır. HSP90 gibi şaperonların aşırı ifadenmesi kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açmaktadır. Böylece HSP90 şaperon kompleksi sinyal sirkülasyonunu devam ettirmek suretiyle büyümeden bağımsız olarak hücrenin kanserleşmesine aracılık etmektedir. Isı şok proteini ekspresyonundaki artışlar sadece tümör gelişim aşamalarında değil, ilaca dirençli fenotip gelişiminde de rol oynar. Bu durum mesane kanserinin de içerisine yer aldığı çok çeşitli kanser türlerinde HSP'lerin inhibisyonunu terapötik hedefler haline getirmektedir. Bununla birlikte, HSP90 nükleusa lokalize olabilmektedir. Nükleus içerisinde HSP90 önemli ölçüde kromatinlere bağlı proteinler olarak bulunur ve kodlanan bütün genlerin yaklaşık olarak üçte birinin başlama bölgesine yakın lokalizedir (Sawarkar ve ark., 2012). Bu durum gösteriyor ki; HSP90, gen transkripsiyonu ve epigenetik düzenlenmede önemli rollere sahiptir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar ışığında HSP90 epigenetik düzenlemelerde oynadığı rol özellikle kor histon proteinleri ve DNA metilasyonundan sorumlu enzimlerin regülasyonu üzerinden gerçekleştirmektedir. Mesane kanser gelişiminde genetik mekanizmalar önemli rol oynadığı görülse de epigenetik mekanizmalarda hastalığın patogeneğinde önemli bir role sahiptir (Chehab ve ark., 2015; Harb-de la Rosa ve

ark., 2015). Bu tez çalışmasıyla HSP90 inhibitörü Geldanamisin'in DNA metilasyonu ve gen ifadenmesini inaktive edici histon metilasyonları (H3K27me³, H4K20me^{1/3}) üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar

- Karbondioksitli etüv (Binder)
- Laminar flow (Metis)
- Hassas terazi (Ohaus)
- PCR cihazı (SenQuest)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (Thermo Scientific)
- Inverted mikroskop (Leica)
- RotorGene Real Time PCR cihazı (Qiagen)
- Sonikatör (Sonics)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- Kuru ısıtıcı blok (Stuart)
- Ph metre (HI 2221, Hanna)
- Elektroforez güç kaynağı (Biorad)
- Soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific)
- Manyetik karıştırıcı (Arex)
- Spin vorteks (Biosan)
- Elektroforez tank ve kaseti (Biorad)
- Vorteks (Biosan)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Mikropipetler; 10µl, 100µl, 1000µl (Thermo)
- Derin dondurucu -20°C (Arçelik)
- Derin dondurucu -80°C (Thermo Scientific)
- +4°C soğutucu (Arçelik)
- Vakum cihazı (Integra)

2.2. Kullanılan Kimyasallar

- Besiyeri McCOY's 5A (Multicell)
- Fetal Bovine Serum (Thermo)
- Penisilin/Streptomisin antibiyotik (Thermo)
- L-Glutamin (Thermo)
- Tripsin-EDTA (Thermo)
- Dimetil Sülfoksid (DMSO) (Sigma)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Roche)
- Etanol (Sigma)
- Metanol (sigma)
- Hücre Lizis Solusyonu (CST)
- PBS (Gibco)
- Primerler (GAPDH, DNMT1 WIF1, HDAC1) (Qiagen)
- Tripure Isolation Reagent (Roche)
- SyberGreen master mix (Qiagen)
- Amonyum Persülfat (Sigma)
- Temed (Sigma)
- Tris base (BioRad)
- Yağsız süt tozu (CST)
- Gendanamisin (CST)
- HDAC inhibitörü Trichostatin A (CST)
- ColorPlus Protein Belirteci (CST)
- Beta-Aktin primer antikor (CST)
- Histone 4 primer antikor (CST)
- H4K20me¹ primer antikor (CST)
- H4K20me³ primer antikor (CST)

- H3K27me³ primer antikor (CST)
- Akt1 primer antikor (CST)
- pAkt (Ser473) primer antikor (CST)
- Bax primer antikor (CST)
- Bcl2 primer antikor (CST)
- SET8 primer antikor (Abcam)
- KMT5C (SUV4-20H2) primer antikor (Abcam)
- Sekonder antikor (CST)

2.3. Kullanılan Kitler

- Hücre Proliferasyon Kiti, WST-1 (Sigma)
- cDNA Sentez Kiti (Qiagen)
- Taqman Master Mix (Qiagen)
- BCA Protein Tayin Kiti (Thermo)

2.4. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

2.4.1. %10'luk McCoy's 5A besiyerinin hazırlanışı

450 ml McCoy's 5A besiyerine sırası ile 50 ml inaktif FBS, 5 ml 200 mM'lık L-Glutamin, 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

2.4.2. PMSF solüsyonu

0,03484 gr PMSF 1 ml izopropanol içerisinde çözdürüldü.

2.4.3. 1,5 M Tris buffer (ph:8,8) (150 ml)

27,23 gr Tris base distile su ile 150 ml'e tamamlandı ve pH metre ile ph değeri HCl ile 8,8'e ayarlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de saklandı.

2.4.4. 0,5 M Tris buffer (ph:6,8) (100 ml)

6 gr Tris base sonra total hacim distile su ile 100 ml'e tamamlandı. Ph değeri 6,8'e ayarlandıktan. sonra hazırlanan solüsyon +4°C'de saklandı.

2.4.5. 10x Tris glisin stok solüsyonu

30,3 gr tris base ve 144 gr glisin 1000 ml distile suda çözdürüldü.

2.4.6. Transfer buffer

100 ml 10X konsantrasyondaki Tris glisin stoğu ve 200 metanol karıştırılarak 1000 ml'e distile su ile tamamlandı.

2.4.7. Amonyum persülfat (APS) solüsyonu

0,1 mg APS, 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

2.4.8. 10X TBS solüsyonu

12,1 gr Tris base ve 40 gr NaCl tartılıp 500 ml distile suda çözdürüldü.

2.4.9. Primer antikor dilüsyon solüsyonu

Primer antikorlar %5 lik yağsız süt tozu veya %3'lük BSA TBST içerisinde 1:1000 oranında dilüe edildi.

2.4.10. Sekonder antikor dilüsyon solüsyonu

Sekonder antikorlar %5 lik yağsız süt tozu TBST içerisinde 1:1000 oranında dilüe edildi.

2.4.11. Membran bloklama solüsyonu

10 ml 1X TBS içerisinde %1 Tween 20, ve 0,5 gr süt tozu (%5) karıştırıldı.

2.5. T24 Hücre Hattı

Bu çalışmadaki, T24 insan mesane hücre hatlarımız, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ece KONAÇ'tan temin edilmiştir.

2.6. Yöntemler

2.6.1. Hücre kültürü

T24 hücreleri, %10 FBS içeren McCoy's 5A besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂'li ortamda 37°C ayarlı etüv içerisinde kültüre edildi.

T24 hücreleri %10'luk McCoy's 5A besiyerinde %95'lik nem ve %5 CO₂'li, ortamda 37°C'de kültüre edilerek çoğaltıldı. T24 hücreleri 24 saat boyunca (0 - 30

μM) Geldanamisin ve (0,1 -1 μM) Trikostatin-A (TSA) dozları ile ayrı ayrı ve birlikte inkübe edildi. Geldanamisin için DMSO ve TSA için ise saf etanol çözücü olarak kullanıldı ve aynı süre saf etanol ve DMSO ile inkübe edilerek çözücü kontrolü olarak kullanıldı. Her bir konsantrasyon için 3 ayrı bağımsız kültür yapılarak deney tekrarlandı.

2.6.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

T24 hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10^5 hücre/ kuyu olacak şekilde ekildi, bir gece %1'lik McCoy's 5A besiyerinde inkübe edilerek hücrelerin yapışmasını takiben besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra TSA (Cell Signaling; Kat. No: #9950) ve Geldanamisin (CST; Kat. No: 9843S) birlikte ve ayrı ayrı çeşitli konsantrasyonları ile hazırlanmış %10'luk McCoy's 5A besiyerinde 0-24 saat süreyle 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde inkübe edildi. Belirtilen sürenin sonucunda her 100 μl için her bir kuyucuğa 10 μl Hücre Proliferasyon Kiti, WST-1 solüsyonu (Roche; Kat. No: 001 644 807) eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 4 saat sonunda spektrofotometre ile 450 nM dalga boyunda belirlendi. Negatif kontroller kör olarak kullanıldı.

2.6.3. Hücrelerden total RNA izolasyonu

6 kuyulu kültür kaplarına ekilen T24 hücreleri inkübasyon sürelerinin ardından aşağıdaki basamaklara göre Tripure Isolation Reagent (Roche; Kat no:11667157001) ile total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

- 1- Hücrelerden ilaçlı besiyerleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 1'er ml Tripure solüsyonu eklendi.
- 2- Hücre lizatları steril ependorf tüplere alındı ve nükleoprotein kompleksinin tamamen ayrılması için 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 3- Her bir tüpe 1000 μl için 200'er μl kloroform eklendi ve 15 sn boyunca vortekslendi.

- 4- Oda sıcaklığında 15 dk inkübasyondan sonra 12000 xg' de 15 dk santrifüj yapıldı.
- 5- Santrifüj sonrasında üç faza ayrılan solüsyonun üstte kalan renksiz sıvı faz yeni ependorf tüplere aktarıldı.
- 6- Her bir tüpe 500'er µl izopropanol eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 7- 12000 xg' de 10 dk santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı ve pelletlerin üzerine 1'er ml %75 lik etanol yıkama amacıyla kondu.
- 8- Tüpler 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı.
- 9- Pelletler belirli süre kurumaya bırakıldı ve 50 µl PCR grade su içerisinde pelletler çözündürüldü.
- 10- Kuru ısıtıcıda 60°C'de 15 dk inkübasyondan sonra izole edilen RNA'lar Nanodrop cihazı ile miktar (ng/µl) ve saflık ölçümleri yapıldı ve kullanılabilecek kadar -80°C'ye kaldırıldı.

2.6.4. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Elde edilen 1 mg total RNA'lar, RT² HT First Strand cDNA sentez kiti (Qiagen, Almanya; Kat. No: 330411) ile kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri üzerine 91µl steril H₂O-PCR grade (Qiagen, Almanya Kat No:1039498) eklendi ve Real-Time PCR'da kullanılmaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

2.6.5. Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü

DNMT1, *HDAC1* ve *WIF1* geninin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile RotorGeneQ cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 25 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü primerler (**Tablo 2.1**) ve RT² SYBR Green Mastermix karışımı (Qiagen, Almanya; Kat. No:330500) ve steril H₂O-PCR grade kullanılarak gerçekleştirildi (**Tablo 2.2**). *DNMT1*, *HDAC1* ve *WIF1* genlerinin ifadenmesini normalize etmek için *GAPDH* mRNA düzeyi referans olarak alındı.

Tablo 2.1. Hedef genlere ait RefSeq ve RT² qPCR primer assay katolog numaraları

Gen Adı	RefSeq(mRNA)	RT ² qPCR primer assay Kat. No.	Band Uzunluğu	Referans Pozisyonu*
<i>DNMT1</i>	NM_138880.2	PPR45050C	71	275
<i>WIF1</i>	NM_007191	PPH02767G-200	145	1909
<i>HDAC1</i>	NM_004964	PPH01735F	70	296
<i>GAPDH</i>	NM_031512.2	PPR06480B	77	820

* RefSeq sekansındaki ampikon pozisyonu.

Tablo 2.2. *DNMT1*, *HDAC1*, *WIF1* ve *GAPDH* Real-Time PCR tepkime karışımı:

	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA	5 µl
RT ² qPCR Primer Assay (10µM stok)	1 µl
H ₂ O	6,5 µl
Total Hacim	25 µl

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 0.2 ml'lık çok PCR tüplerine dağıtıldı ve üzerine cDNA' lar eklendi ve cihaza yerleştirildikten sonra **Tablo 2.3'**de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. *DNMT1*, *HDAC1*, *WIF1* ve *GAPDH* genleri için aynı program kullanıldı.

Reaksiyon sonucunda, *DNMT1* ve *GAPDH* genlerin mRNA düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. *DNMT1* geninin ifade düzeyi *GAPDH* ifade düzeyine göre normalize edildi.

Tablo 2.3. *DNMT1,HDAC1, WIF1* ve *GAPDH* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Döngü	Zaman	Sıcaklık
1	10 dakika	95 ⁰
	15 saniye	95 ⁰
40	1 dakika	60 ⁰
	+ Melting Curve	

2.6.6. Total Protein izolasyonu

Geldanamisin, TSA ve bu ilaçların kombinasyonlarının belirli dozları ile belirli sürelerde inkübe edilen T24 hücrelerinin inkübasyon sürelerinin dolmasının ardından protein izolasyonu amacı ile aşağıdaki basamaklar sırası ile uygulandı.

- 1- Hücrelerden ilaçlı besiyerleri uzaklaştırıldı ve soğuk PBS ile bir defa yıkandı.
- 2- Hücreler üzerine 1mM PMSF içeren 1X Ripa Lizis Buffer (CST; Kat no:9806)'dan 500 µl kondu.
- 3- Hücreler buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı.
- 4- Hücreler scraper ile kaldırılan hücreler ependorf tüplere aktarıldı.
- 5- Buz üzerinde 15 sn sonike edildikten sonra 14 000 xg'de 10 dk santrifüjden edildi.
- 6- Süpernatant yeni tüplere aktarıldı ve western blot aşamasına kadar -80°C'ye saklandı.

2.6.7. Histon Protein İzolasyonu

Geldanamisin, TSA ve kombinasyonlarının inkübasyon sürelerinin dolmasının ardından T24 hücreleri tripsinizasyon yöntemiyle toplandıktan sonra Histon Extraction Kit (Abcam; Kat no:ab113476) kullanılarak histon protein izolasyonu üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi.

1. Tripsinizasyon sonrasında hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
2. Süpernatant uzaklaştırılmasını takiben pelet 1X Pre-Lizis buffer içerisinde çözünür ve buz üzerinde 10 dk inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresinin dolmasından sonra 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
4. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 200 µL lizis buffer içerisinde çözünüp 30 dk buz üzerinde inkübe edildi.
5. Hücreler 12 000rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tübe aktarıldı.
- 7- Süpernatant üzerine 60 µL Balance-DTT solüsyonu eklenip western blot aşamasına kadar -80°C'ye saklandı.

2.6.8. BCA kiti ile protein miktar tayini

T24 hücrelerinden belirli dozlarda ilaç uygulanmasından sonra izole edilen proteinlerin miktarlarının tayini BCA protein ölçüm kiti (Thermo Fisher Scientific, Kat no:23225) ile aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirildi.

- 1- Kit içerisinde gelen bovine serum albumin (BSA) ile 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,025 ve 0 µg/ml konsantrasyonlarda saf su kullanılarak standart tüpler hazırlandı.
- 2- Protein örnekleri ve standart 96 kuyucuklu plakanın her birine 25'er µl eklendi.
- 3- Kit içerinden çıkan Reaktif B:A oranı 1:50 olacak şekilde hazırlandı.
- 4- Bu reaktif karışımından her bir kuyucuğa 200'er µl eklendi.
- 5- 37°C lik inkübatörde yarım saat inkübasyondan sonra mikrolaka ELISA okuyucuda 562 nm dalga boyunda plaka okutuldu ve çıkan sonuca göre excel programında standart eğri çizilerek hesaplamalar yapıldı.

2.6.9. Western blot yöntemi ile protein düzeylerinin belirlenmesi

Akt1 (60 kDa), pAkt(S473) (60 kDa), DNMT1 (200 kDa), Histone H4 (11 kDa), H4K20me¹ (11 kDa), H4K20me³ (11kDa), H3K27me³ (17 kDa), SET8 (43 kDa), KMT5C (52 kDa), BAX (20 kDa) ve BCL2 (28 kDa) genlerinin protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için, hücrelerden belirli dozlarda ve sürelerde ilaç muamelesi sonucu elde edilmiş proteinler ile western blot yöntemi kullanıldı. İnternal kontrol olarak β -aktin (45 kDa) kullanıldı.

İlk aşamada, BCA kiti ile miktarları ve standart grafikleri belirlenen proteinler yükleme için hazırlandı. Bu proteinlerle aynı miktarda üzerlerine 2X konsantrasyon değerinde laemmli örnek buffer'ları eklendi. Böylece protein örnekleri 1:1 oranında dilüe edilerek çalışma konsantrasyonları elde edildi ve protein örnekleri denatürasyon için 95°C'ye ayarlı ısıtıcı blokta 5 dk bekletildiden sonra yükleme aşamasına geçildi. %30'luk Akrilamid ve bisakrilamid polimerleşmesi ile, üst jel olan stacking (%5) ve alt jel olan seperating jellerin (%10-15 ve %4-15 gradient jel) önceden hazırlanıp donması ile yükleme jeli oluşturuldu. Jele yüklenen protein örnekleri, 1X running buffer eklenmesi ile 150 V ve 250 mA de 60- 120 dk boyunca yürütüldü.

Proteinler jel üzerinde moleküler ağırlıklarına göre yürütüldükten sonra güç kaynağı kapatıldı ve jel alındı. Örnekler, ıslak transfer yöntemi ile PVDF membrana transferleri gerçekleştirildi. Transfer kaseti tank içerisine dikey kondu ve transfer buffer de eklendikten sonra 150-250 mA'de 20-120 dk boyunca aktarım gerçekleştirildi. Aktarım aşamasından sonra membran aranan proteine özgü primer ve sekonder antikorlarla muamele edildi. Dilüe edilen primer antikorlar ile bir gece +4°C de, sekonder antikorla ise 2 saatlik inkübasyon gerçekleştirildi. Son aşamada ise membranın görüntülenmesi gerçekleştirildi.

3.7. İstatistiksel analiz

DNMT1, *HDAC1* ve *WIF1* mRNA düzeylerindeki doza ve zamana bağlı değişimler REST 2009 V2.0.13 istatistiksel programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir. 0,05’den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}$$

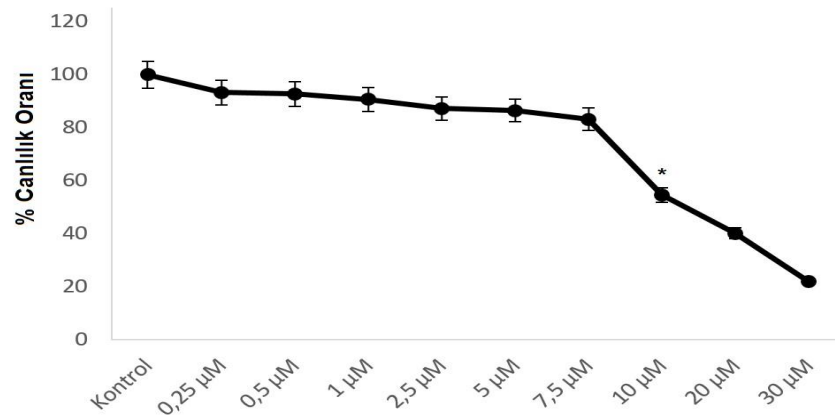
Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade eder ve Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

3. BULGULAR

3.1. Geldanamisin'in Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi

24 saat inkübasyon sonucunda T24 hücrelerinin HSP90 inhibitörü Geldanamisin'e olan cevabının hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Buna göre Geldanamisin ile 24 saat muamele edilmiş T24 hücrelerinin doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu azaldığı belirlenmiştir.

Kullandığımız 1µM Geldanamisin konsantrasyonunda T24 hücrelerinin hücre canlılığını %90,7 iken 10µM konsantrasyonunda ise %54,3 azaldığı görülmektedir. Sonuçlarımıza göre Geldanamisin için 24 saat için IC₅₀ dozunun 10µM olduğu belirlendi.



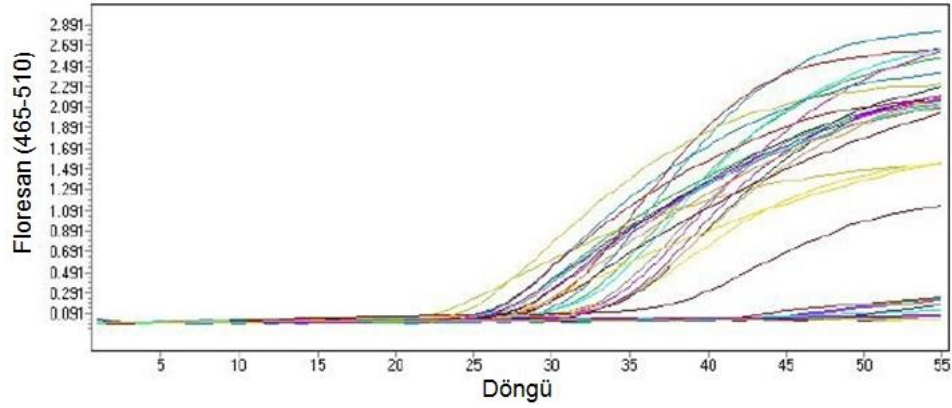
Şekil 3.1. T24 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Geldanamisin ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.*; IC₅₀ değeri.

3.2. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

DNMT1, *HDAC1* ve *WIF1* genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için RotorGeneQ cihazı kullanılmıştır. İnsan mesane kanser hücre hattı T24

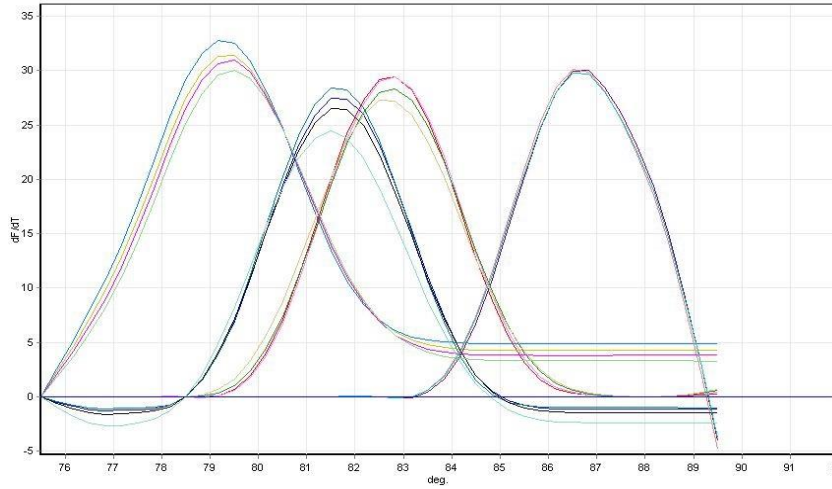
hücrelerinden elde edilen cDNA'larda *DNMT1*, *HDAC1* ve *WIF1* genlerinin normalizasyonu için seçilen *GAPDH* (Gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz) (housekeeping) genine özgü primerler ve SYBR Green floresan boya kullanılarak çalışılmıştır.

DNMT1, *WIF-1* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 3.2'de gösterildi.



Şekil 3.2. *DNMT1*, *HDAC1*, *WIF-1* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. *DNMT1*, *HDAC1*, *WIF-1* ve *GAPDH* geninin Real Time PCR tepkimesine ait Ct değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

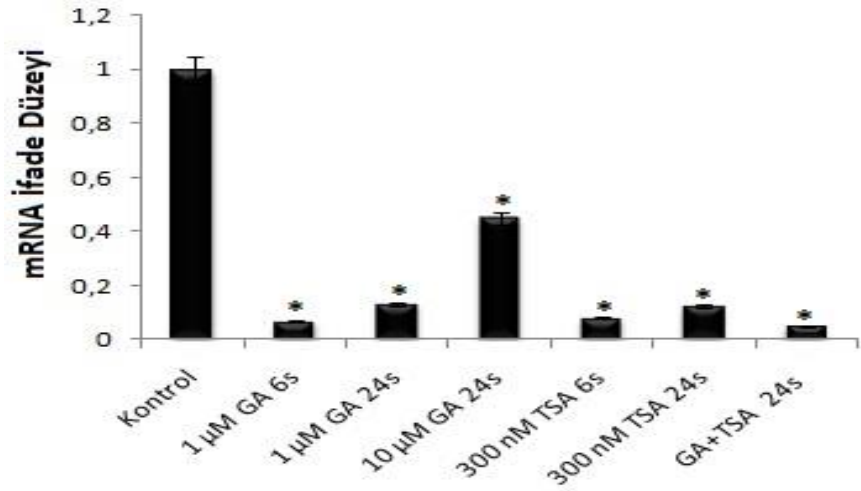
DNMT1, *HDAC1* ve *WIF1* ve *GAPDH* genlerinin mRNA ifade düzeyinin belirlenmesinde elde edilen floresans ısıtmanın hedef bölgenin amplifikasyonu sonucunda gerçekleştiğini gösteren erime eğrisi (melting curve) Şekil 3.3'de gösterilmektedir.



Şekil 3.3. T24 mesane kanser hücrelerinin *DNMT1*, *HDAC1*, *WIF1* ve *GAPDH* genlerine ait erime eğrileri. *DNMT1*, *HDAC1*, *WIF1* ve *GAPDH* geninin Melting Curve analizine ait sıcaklık dereceleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

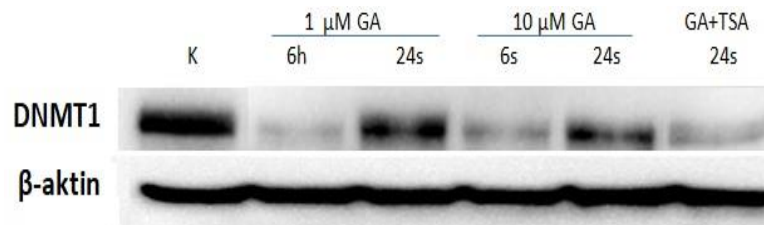
3.2.1. Kantitatif *DNMT1*, *HDAC1* ve *WIF1* Genlerinin İfade Düzeyinin ve *DNMT1* Protein İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi

T24 hücrelerinde 0 - 24 saat süre 1 μ M GA, 10 μ M GA, 300 nM TSA (Varol ve ark., 2014) ve GA + TSA'nın birlikte inkübasyonları öncesi ve sonrası *DNMT1* geninin mRNA düzeyindeki değişimler Şekil 3.4'de gösterildi. *DNMT1* genin mRNA düzeyi kontrole göre sırasıyla 6. saat 1 μ M GA 14.62 kat, 24. saat 1 μ M GA 7.46 kat, 10 μ M GA 2.22 kat, 300 nM TSA 6. saat 12.38 kat, 24. saat 8.06 kat ve 24. saat 1 μ M GA + 300 nM TSA 19,7 kat azaldığı belirlenmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,01$).



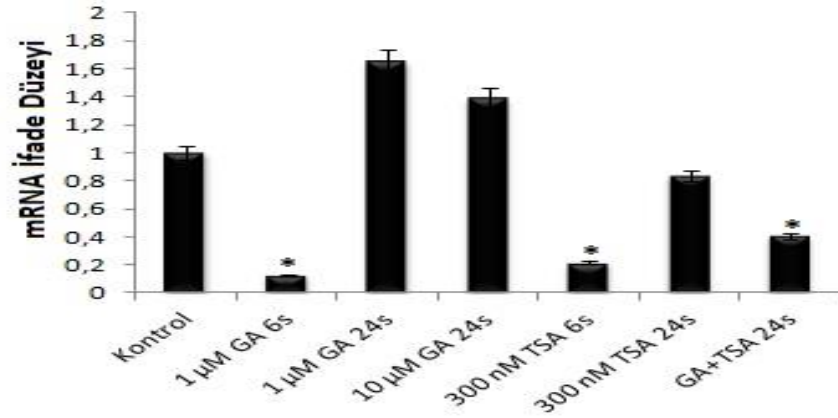
Şekil 3.4. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ve TSA ile inkübasyonu sonrasında *DNMT1* mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi,*; $p < 0,01$.

T24 hücrelerinin 6 ve 24 saat süre 1 μ M ve 10 μ M GA ile 24 saat GA (1 μ M) + TSA (300 nM)'nın tek tek ve birlikte inkübasyonları öncesi ve sonrası *DNMT1* proteininin düzeylerindeki değişimler Şekil 3.5'de gösterildi. 6. saatte 1 μ M ve 10 μ M GA uygulaması sonrasında mRNA düzeyine paralel olarak *DNMT1* protein düzeyinde azalma olduğu belirlendi. Kontrole nazaran düşük olsa da 6. saat ile karşılaştırıldığında 1 μ M ve 10 μ M GA uygulaması sonrasında 24. saatte *DNMT1* ifadenme düzeyinde artış gözlemlendi. Benzer şekilde 1 μ M GA + 300 nM TSA (GA+TSA) uygulaması sonrasında da kontrole göre nazaran *DNMT1* protein düzeyinde önemli ölçüde azalma olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.5. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı 1 μ M ve 10 μ M GA ve 1 μ M GA + 300 nM TSA kombinasyonunun süre bağımlı inkübasyonu sonrasında *DNMT1* protein düzeyindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. s; saat.

T24 hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak GA ve TSA uygulaması öncesi ve sonrası *HDAC1* geninin mRNA düzeyindeki değişimler Şekil 3.6'da gösterildi. *HDAC1* geninin mRNA düzeyinde kontrole göre sırasıyla 6. saat 1 μ M GA 8.17 kat, 6. saat 300 nM TSA 4.69 kat, 24. saat 300 nM TSA 1.2 kat ve 24. saat 1 μ M GA + 300 nM TSA 2.48 kat azalma gözlemlenirken 24. saatte 1 μ M ve 10 μ M GA uygulaması sonrasında sırasıyla 1.65 ve 1.39 kat artma olduğu belirlendi. Bununla birlikte yalnızca 6. saatlerde 1 μ M GA, 300 nM TSA ve 24. saat GA+TSA uygulamaları sonrasındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).

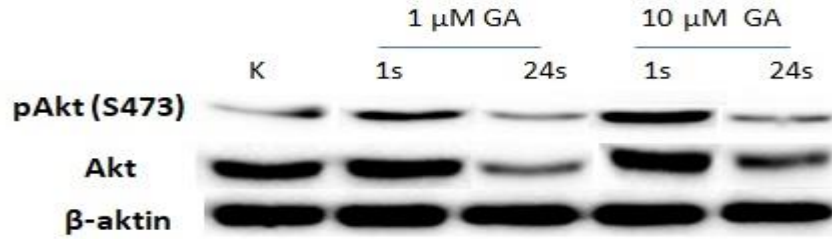


Şekil 3.6. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ve TSA ile inkübasyonu sonrasında *HDAC1* mRNA düzeyindeki değişimler. Hedef genlerin ifade düzeyleri *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi,*; $p<0,01$.

WIF-1 geni T24 hücrelerinde hipermetile olup DAC ve TSA'nın birlikte uygulaması sonrasında promotor bölgesindeki metilasyon kalkmaktadır (Varol ve ark.,2014 ve 2015). *WIF-1* geninin mRNA'sı T24 hücrelerinde doz ve zaman bağımlı GA ve/veya TSA inkübasyonları sonrasında 24 saat sonrasında 1 μ M ve 10 μ M GA, 24 saat TSA ve GA+TSA uygulamaları sonrasında Ct değeri elde edilmiş olup kontrol örneğinde tespit edilemediğinden dolayı istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

3.3. AKT1 Protein İfade Düzeyleri

T24 hücrelerinin 1 ve 24 saat süre süre ve doz bağımlı GA ile inkübasyon öncesi ve sonrası Akt1 ve pAkt1(Ser473) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 3.7’de gösterildi. 1. saat 1 μ M ve 10 μ M GA inkübasyonu sonrasında pAkt(S473) düzeyinde artma gözlemlenirken 24. saatte tam tersi olarak, 1 ve 10 μ M GA uygulaması sonrasında pAkt düzeylerinde azalma belirlendi. Buna paralel olarak 24 saat 1 ve 10 μ M GA muamelesi sonrasında Akt1 protein düzeyinde önemli azalma belirlendi.



Şekil 3.7. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ile inkübasyonu sonrasında pAkt(S473) ve Akt proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. S:saat.

3.3. H3K27me³ Protein İfade Düzeyleri

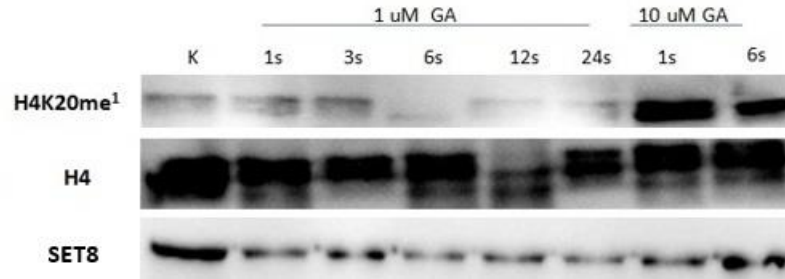
T24 hücrelerinin 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süre 1 μ M GA ile inkübasyon öncesi ve sonrası H3K27me³ protein düzeyinde 6.saatte kontrole göre azalma görülürken 24.saatte ise kontrole nazaran protein düzeyinde artış olduğu belirlendi. Benzer sonuçlar 10 μ M GA uygulaması sonrasında da gözlemlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μM GA ile inkübasyonu sonrasında H3K27me³ protein düzeyindeki değişimler. S:saat.

3.4. Histon H4, H4K20me¹ ve SET8 Protein İfade Düzeyleri

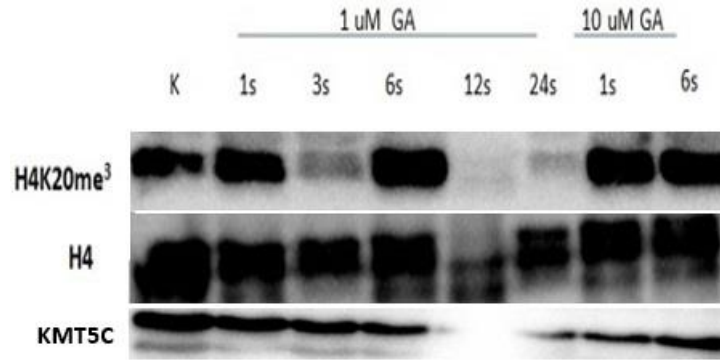
T24 hücrelerinin 1 ve 24 saat süre süre ve doz bağımlı GA ile inkübasyon öncesi ve sonrası Histon 4, H4K20me¹ ve SET8 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 3.9'de gösterildi. 12. saat 1 μM GA uygulaması sonrasında Histon 4 protein düzeyinde azalma olduğu belirlenmesine karşın diğer doz ve sürelerde Histon 4 protein düzeyinde belirgin bir farklılık gözlemlenmedi. H4K20me¹ protein düzeyinde yalnızca 1 ve 6 saat 10 μM GA inkübasyon sonrasında kontrole nazaran önemli bir artma görüldü. H4K20me¹'dan sorumlu enzim SET8 1 μM GA uygulaması sonrasında kontrole göre az da olsa bir azalma belirlenmesine karşın 10 μM GA uygulaması sonra kontrole göre herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi.



Şekil 3.9. T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μM ve 10 μM GA ile inkübasyonu sonrasında H4, H4K20me¹ ve SET8 protein düzeyindeki değişimler.

3.5. Histon H4, H4K20me³ ve KMT5C (SUV4-20H2) Protein İfade Düzeyleri

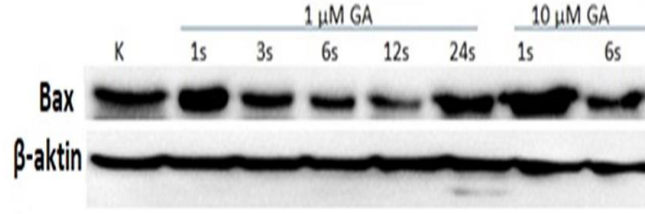
T24 hücrelerinin 1 ve 24 saat süre süre ve doz bağımlı GA ile inkübasyon öncesi ve sonrası Histon 4, H4K20me³ ve KMT5C (SUV4-20H2) proteinlerinin düzeylerindeki değişimler Şekil 3.10'de gösterildi. H4K20me³ protein düzeyinde ise 1 μ M GA uygulaması sonrasında kontrole nazaran 3. 12. ve 24. saatlerde azalma belirlenirken 1. ve 6. saatlerde 1 μ M ve 10 μ M GA uygulaması sonrasında kontrole göre bir artma olduğu belirlendi. KMT5C enzim düzeyinde ise zaman ve doz bağımlı olarak ifadelenem düzeyi azalmıştır.



Şekil 3.10. T24 hücrelerinin süre-bağımlı 1 μ M ve 10 μ M GA ile inkübasyonu sonrasında H4, H4K20me³ ve KMT5C protein düzeyindeki değişimler.

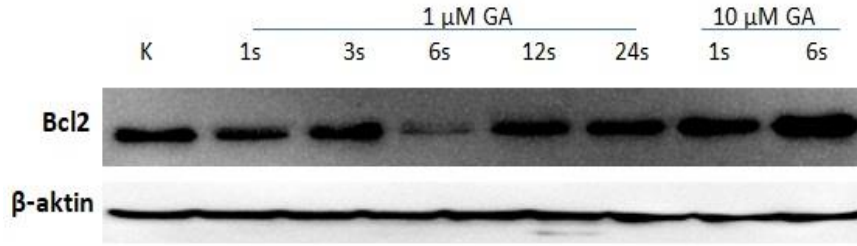
3.6. Geldanamisin'in Apoptoz Üzerine Etkisi

T24 hücrelerinin 1 ve 24 saat süre süre ve doz bağımlı GA ile inkübasyon öncesi ve sonrası Bax protein düzeylerindeki değişimler Şekil 3.11'de gösterildi. 1 ve 24. saat 1 μ M GA inkübasyonu sonrasında Bax protein düzeyinde artma olduğu belirlendi. benzer şekilde 10 μ M inkübasyon sonrasında 1. saatte kontrole karşı protein düzeyinde önemli düzeyde artma belirlendi.



Şekil 3.11. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ile inkübasyonu sonrasında Bax proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. s:saat.

T24 hücrelerinin 1 ve 24 saat süre süre ve doz bağımlı GA ile inkübasyon öncesi ve sonrası Bcl2 protein düzeylerindeki değişimler Şekil 3.12’de gösterildi. 6. saat 1 μ M ve 10 μ M GA inkübasyonu haricinde doz veya süre bağımlı olarak Bcl2 protein düzeyinde bir değişim gözlemlenmezken 6. saat 1 μ M GA uygulaması sonrasında Bcl2 düzeyinde azalma belirlenirken 10 μ M GA uygulaması sonrasında kontrole nazaran önemli bir artış olduğu belirlendi.



Şekil 3.12. T24 hücrelerinin süre ve doz-bağımlı GA ile inkübasyonu sonrasında Bcl2 proteinlerinin düzeylerindeki değişimler. β -aktin, western blot yükleme kontrolü olarak kullanıldı. S:saat.

4. TARTIŞMA

Hücresel proteozis gardiyanları olarak tanımlanan ısı şok proteini HSP90 yüzlerce hedef substratı bulunmaktadır. HSP90, hem nükleus hem de sitoplazma içerisinde lokalizedir. Hücre içerisinde, HSP90'nın substratının büyük bir kısmını hücresel sinyalizasyonda önemli rol oynayan sitosolik reseptörler oluşturmaktadır (Isaacs, 2013). Geniş ölçekli olarak bakıldığında HSP90'nın sinyal iletimi, intraselüler transport ve protein parçalanması gibi çok çeşitli substratı bulunmaktadır. Bu nedenle kanser terapisi için oldukça ilgi çekici hedeflerdir (Li ve Buchner, 2013). Bu proteinler normal fizyolojik şartlar altında düşük düzeyde ifadelenirken, hipertermi, ağır metal iyonlarına maruziyet, hipoksi gibi hücresel stres şartlarında hızlı bir şekilde ifadelenmeleri artar (Ischia ve So, 2013; Chehab ve ark., 2015). Kanser hücrelerinin bulunduğu mikroçevrede de benzer şartlar görülmektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerine bakıldığında HSP90 ifadelenme düzeyi önemli derecede artmaktadır (Chehab ve ark., 2015). HSP90, p53 örneğinde olduğu gibi HSP90 hedef proteinlerinin yabancı tiplerine değil aynı zamanda mutant formlarınada benzer afiniteyi göstermektedir. Bu nedenle kanser hücrelerinde genetik lezyonlar için biyokimyasal bir tampon olarak davranır. Böylece, mutasyonlar sonucu aktive olan onkoproteinler aracılığıyla kontrolsüz sinyalizasyona neden olduklarından dolayı kanser hücrelerinde malign fonksiyon gösterir (Soo ve ark., 2008; Schopf ve ark., 2017). Nükleusta lokalize olan HSP90'nın sitosolik HSP90 proteinlerinden farklı olarak sitosolik HSP90 proteinlerinde, DNA-bağlanam motifleri bulunmamaktadır. HSP90, kromatin bağlı proteinler olarak nükleus içerisinde bulunması şaşırtıcı değildir ve genom içerisindeki bütün kodlayıcı genlerinin yaklaşık üçte birinin transkripsiyon başlama bölgesinin yakınına lokalizedir. Bu durum gösteriyor ki, HSP90, yukarıda sayılan fonksiyonlarının yanı sıra gen ifalenmesi ve epigenetik düzenlenmede de önemli rol oynamaktadır (Isaacs, 2013).

Mesane kanseri dünyada görülme sıklığı bakımından beşinci ve genitoüriner kanserler içerisinde ise prostat kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır.

Mesane kanserinin tedavisi ve aktif izlenimi ile ilişkili sağlık hizmeti giderleri, diğer bütün malignansilerin sağlık hizmet giderlerinden fazladır. Bu nedenle mesane kanseri için etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesi yalnızca hasta için değil halk sağlığı içinde önemlidir (Chehab ve ark., 2015). Mesane kanserlerinde, kasa invaze olan ve invaze olmayan, HSP90'da içerisinde yer aldığı ısı şok proteinlerinin ifadenmesi önemli ölçüde artmaktadır (Cappello ve ark., 2006; Ischia ve So, 2013; Ma ve ark., 2014; Chehab ve ark., 2015). HSP'lerin artışı mesane kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına, genomik mutasyonların birikimine, tedavide kemoterapi ve radyoterapiye direnç gelişmesine yol açmaktadır (Chehab ve ark., 2015). Bununla birlikte, genetik ve epigenetik mekanizmalar birlikte mesane kanserinin patogenezinde önemli bir role sahiptir (Chehab ve ark., 2015; Harb-de la Rosa ve ark., 2015). HSP90'nın hem sitosolik hem de nükleus içerisinde sahip olduğu önemli fonksiyonlar nedeniyle mesane kanserinin yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için HSP90 önemli bir hedeftir.

Benzokinon ansamisin antibiyotik olan Geldanamisin, kanser hücrelerine özgü olarak hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bunun nedeni tam olarak bilinmesede, kanser hücrelerinde HSP90'nın aşırı ifadenmesi ve çok sayıdaki mutant onkogenik client proteinin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Workman ve Powers, 2007). Literatürde, mesane kanser tedavisinde HSP90'nın terapötik etkilerini belirlemeye yönelik özellikle *in vivo* çalışmalar az sayıdadır. Geldanamisin ve T24 hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda Geldanamisin'nin etkin dozu 24 saat uygulamalarda 100 nM ile 10 μ M arasında değişmektedir (Koga ve ark., 2007; Karkoulis ve ark., 2013). Bu nedenle çalışmamızda insan mesane kanser hücre hattı T24'de GA'nın etkin dozunu belirlemek için ilk olarak WST1 aracılığıyla IC50 değeri hesaplanmıştır. 24 saat GA uygulaması sonrasında IC50 değeri 10 μ M olarak belirlenmiştir. Karkoulis ve ark. (2013)'larının çalışmasında 24 saat 10 μ M GA uygulaması sonrasında T24 hücrelerinde hücre canlılığı % 61 olarak belirlenmiştir. Bizde çalışmamızda benzer şekilde 24 saat 10 μ M GA uygulaması sonrasında hücre canlılığını %54,3 olarak gözlemledik.

Kanser hücreleri, transformasyonları süresince genetik ve epigenetik olarak birçok farklı değişime maruz kalır. Sağlıklı hücrelerin kontrolsüz olarak

bölünmesinin nedenlerinden biri tümör baskılayıcı genlerin ifadenmelerinin azalması veya tamamen baskılanmasıdır (Llinàs-Arias ve Esteller, 2017). DNA metilasyonu, histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmaların geri dönüşümlü olmasından dolayı kanser araştırmacılarının büyük ilgisini çekmektedir. DNA metilasyonu, en çok çalışılmış epigenetik mekanizma olup histon modifikasyonları ile birbiri içerisine geçmiş durumdadır. DNA metilasyonu, CpG adacıkları adı verilen bölgelerde DNA metiltransferaz enzimleri aracılığıyla replikasyon sonrasında meydana gelir. Kanser hücrelerine bakıldığında DNA metilasyonunda global bir azalma görülmesine karşın tümör baskılayıcı genlerin özellikle promotor bölgelerinde DNA metilasyonunun arttığını ve buna bağlı olarak hedef genin ifadenmesinin azaldığı veya tamamen sessizleştiği görülmektedir. Kanser tipine özgü olarak meydana gelen bu mekanizmanın nasıl gerçekleştiği henüz bilinmemesine karşın kanser hücrelerinde DNA metilasyonundaki artışın en önemli nedenlerinden biri DNA metilasyonundan sorumlu enzimler olan DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin ifadenme düzeyindeki önemli artıştır (Turek-Plewa ve Jagodziński, 2005; Zhang ve ark., 2007; Llinàs-Arias ve Esteller, 2017). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi mesane kanserinde de DNMT enzimlerinin düzeyinde önemli artışlar görülmektedir (Varol ve ark., 2014 ve 2015). DNMT enzimleri özellikle DNMT1, HSP90'nın client proteinlerinden biridir (Isaacs ve ark., 2016; Nagaraju ve ark., 2017). Kanser hücrelerinde geldanamisininde içerisinde yer aldığı çok çeşitli HSP90 inhibitörleri ile inkübasyon sonrasında DNMT1 hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde ifadenmesi azalmaktadır (Zhou ve ark., 2008; Nagaraju ve ark., 2013; Nagaraju ve ark., 2017). Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak T24 hücrelerine düşük doz (1 μ M) ve yüksek doz (10 μ M) GA uygulaması sonrasında DNMT1'in kontrole nazaran hem mRNA hem de protein düzeyinde azalma olduğunu belirledik. Bununla birlikte, bu azalmanın DNA hipermetilasyonu aracılığıyla baskılanan tümör baskılayıcı genlerin üzerine etkisini değerlendirmek için T24 hücrelerinde hipermetilasyon aracılığıyla baskılandığını bildiğimiz β -katenin sinyal yolağının antagonisti olan *WIF1* geninin ifadenme düzeyini inceledik. T24 hücrelerinde *WIF1* geninin tekrardan aktivasyonu için DNMT inhibitörü DAC ve histon deasetilaz inhibitörü TSA birlikte kullanılması gereklidir (Varol ve ark., 2014). 24 saat 1 μ M ve 10 μ M GA inkübasyon sonrasında

HDAC1 mRNA düzeyinde bir azalma belirlenmiştir. Bununla birlikte, T24 hücrelerinde kontrolde *WIF1* geninin ekspresyonu görülmezken, GA uygulaması sonrasında *WIF1* geni için bir Ct değerleri elde edilmiştir. Bu durum göstermektedir ki, GA uygulanması sonrasında DNMT1'in ifadelenmesine paralel olarak *WIF1* geninin promotor bölgesindeki metilasyon kalkmaktadır. Kanser hücrelerinde DNMT1'in transkripsiyonel düzeyde ifadelenmesindeki artma nedenlerinden biri β -katenin sinyal yolağındaki onkogenik aktivasyondur. β -katenin'in nükleusa translokasyonunda GSK3 β 'nın inhibisyonu önemli rol oynamaktadır ve kanserlerde bu yolağın aktivasyonunda birinci derecede GSK3 β inhibisyonu önemli rol oynar (Varol ve ark., 2015). HSP90'nın client proteinlerinden biri Akt proteinidir. Akt'nin Serin 473 rezidüsünden fosforillenmesi, GSK3 β 'nin inhibisyonuna dolayısıyla β -katenin'in nükleusa geçerek hedef genlerini aktive etmesine neden olur. HSP90 inhibitörü, Akt ifadelenmesini baskılamak suretiyle p-Akt'nin GSK3 β üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldır ve böylece β -katenin proteozom yolağıyla parçalanır (Kurashia ve ark., 2009). Koga ve ark., (2006)'ları yaptıkları çalışmada 1 μ M GA uygulaması sonrasında zamana bağlı olarak Akt ve p-Akt(S473) düzeyinde azalma olduğu belirlendi. Bizde çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak hem düşük hem de yüksek doz 24 saat GA uygulaması sonrasında hem Akt1 hem de p-Akt(S473) düzeyinde bir azalma ve bu azalmaya paralel olarak DNMT1 düzeyinde de kontrole nazaran protein düzeyinde azalma belirlenmiştir.

Epigenetik mekanizmalarda görevli proteinlerden yalnızca DNMT'lar HSP90 client proteinleri değildir. Kromatin yeniden modelleyicilerde HSP90 client proteinlerdir. EZH2 bir histonmetiltansferaz enzimidir ve H3 Lizin 27 trimetilasyonundan sorumludur (Göllner ve ark., 2017). EZH2'in kanser hücrelerinde ifadelenen düzeyi artmaktadır. Yabanıl tip ve mutant EZH2 proteinleri HSP90'nın client proteinleridir (Isaacs, 2016). EZH2, epigenetik düzenlenmedeki tek rolü histon metiltransferaz olmasından kaynaklanmaz, aynı zamanda hedef bölge DNMT'ların toplanmasına da aracılık etmektedir (Reynolds ve ark., 2006). Göllner ve ark. (2017)'ları akut miyeloid lösemilerde yapmış oldukları çalışmalarında HSP90 inhibitörünün ilaç dirençli hücrelerde EZH2'in proteozom yolağıyla parçalanmasına yol açmak suretiyle H3K27me³ düzeyinde azalma olduğunu belirlemişler. Başka bir

çalışmada ise, HSP90'nın inhibitörünün glioblastoma hücrelerinde EZH2'in baskılanmasını takiben farklılaşmayı arttırıcı genlerdeki H3K27me³ düzeyinde azalma olduğu belirlenmiştir (Dror ve ark., 2013). Bizde çalışmamızda yalnızca 6. saat düşük ve yüksek doz GA uygulamasında H3K27me³ düzeyinde azalma belirlerken 24. saat düşük doz GA uygulaması sonrasında önemli bir değişme belirlenmedi.

HSP90 nükleus içerisinde kromatine bağlı proteinler şeklinde görülmektedir ve genlerin transkripsiyon başlama bölgelerine yakın yerleşimlidir ve kromatin düzeyleyiciler, HSP90 client proteinlerdir (Isaacs, 2016). Bu durum gösteriyor ki, HSP90 genomunu epigenetik düzenlenmesinde oldukça önemli rolleri bulunmaktadır. Histon H4 lizin 20 mono ve dimetilasyonu DNA replikasyonu ve DNA hasar onarımı için gereklidir. Proliferatif hücrelerde H4K20me¹ düzeyi oldukça düşüktür. H4K20me¹ düzeyi, hücre döngüsü süresince farklılık göstermektedir; G1 ve S fazının başında oldukça düşük düzeyde iken S ve G2 fazında artma M fazında ise en üst düzeye çıkmaktadır (Jorgensen ve ark., 2013). Çalışmamızda 1 µM GA uygulaması sonrasında kontrole nazaran 1., 3., 12. ve 24. saatlerde H4K20me¹ düzeyinde bir değişiklik olmazken 6. saat sonunda en düşük H4K20me¹ düzeyi belirlenmiştir. Buna karşın, 10 µM GA inkübasyonu, 1 µM GA uygulamasıyla karşılaştırıldığında H4K20me¹ düzeyinde önemli ölçüde bir artış gözlemlenmiştir. H4K20'nın monometilasyonundan sorumlu olduğu bilinen SET8 enzim düzeyinde ise 1 µM ve 10 µM GA uygulaması sonrasında kontrole nazaran bir azalma olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki, H4K20me¹ düzeyinden SET8 metiltransferaz enzimi primer olarak sorumlu değil gibi görülmekte ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü hücrede H4K20me¹ düzeyinin düşük olmasının bir diğer nedeni ise ilerleyen H4K20 di- ve trimetilasyon düzeyleridir (Jorgensen ve ark., 2013). Başka bir neden ise H4K20me¹ düzeyinde sorumlu diğer lizin metiltransferaz enzimi SMYD2'in ifadenme düzeyidir. SYMD2'de HSP90 client proteinidir (Boehm ve ark., 2017).

H4K20me³ post-translasyonel modifikasyonu, büyük çoğunlukla perisentrik heterokromatin, telomeraz, imprintlenmiş bölgeler ve tekrar elementlerinin bulunduğu bölgelerde sıklıkla görülmekte olup transkripsiyonel baskılamayı gösteren bir belirteçtir. Bu post-translasyonel modifikasyonun büyük bir kısmının

gerçekleşmesinden sorumlu enzimler SUV4-20H histon metiltransferaz enzimleridir. Bu enzimler, hücrenin G1 fazında, SUV4-20H2 enzimi H4K20me¹'leri substrat olarak kullanarak H4K20me³'e dönüştür (Jorgensen ve ark., 2013). Çalışmamızda 1 µM ve 10 µM GA uygulaması sonrasında 1 ve 6 saat uygulamalarında H4K20me³ düzeyinde artma belirlenmesine karşın 1 µM 24 saat GA uygulaması sonrasında kontrole nazaran H4K20me³ düzeyinde önemli bir azalma gözlemlenmiştir. GA'nın Histon H4 ve bu histonun post-translasyonel modifikasyonları H4K20me^{1/3} üzerine etkisi ilk kez bu tez ile çalışılmıştır. Ancak Li ve ark. (2017)'de yaptıkları bir çalışmada, mesane kanseri hücre hattı 5637'de farklı HSP90 inhibitörleri AUY922, STA9090 ve SNX2112 kullanılmıştır. HSP90 inhibitörlerinin 24 saat inkübasyonu sonrasında kontrole nazaran önemli ölçüde H4K20me³ düzeyinde artma belirlenmiştir. Bu inhibitörlerde GA ile aynı şekilde HSP90'nın N terminal ATP bağlanma bölgesine bağlanarak HSP90'nın inaktivasyonuna yol açarlar (Chandarlapaty ve ark., 2008; Lin ve ark., 2008; Okui ve ark., 2011). T24 ve 5637 mesane kanser hücre hatları patolojik olarak birbirlerinden farklıdır. T24 hücreleri kasa invaze mesane kanser hücre hattı iken 5637 hücreleri ise kasa invaze olmayan mesane kanser hücre hattıdır (Kanat ve Kanat, 2015). Ayrıca T24 hücreleri grade III iken 5637 hücreleri ise grade II'dir. Bizim çalışmamızda, 6 saat GA uygulaması sonrasında H4K20me³ düzeyinde önemli bir artış görülmektedir. Bu hücrelerde ayrıca TSA uygulaması sonrasında *HDAC1* ifadenin düzeyinin en yüksek olduğu zaman 6. saattir. Epigenetik mekanizmalarda özellikle DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları için hücre döngüsünün belli zaman aralıkları önemlidir. Örneğin H4K20me¹ düzeyi hücre döngüsünün G1 aşamasında düşük iken M fazında ise en yüksek düzeye çıkmaktadır (Jorgensen ve ark., 2013). Bu sonuçlar gösteriyor ki, T24 hücreleri için histon 4 proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonları için 6.saat oldukça önemlidir.

Bilindiği üzere HSP90 ifadeninmesi kanser hücrelerinde önemli ölçüde artmaktadır. HSP90'nın yüzlerce hedef proteini vardır ve hem yabancıl tip hem de mutant formlarına bağlanabilmesinden dolayı kanserogeneizde önemli rol oynamaktadır. HSP90'ın kanser hücrelerinde fonksiyonlarından biri apoptozonu inhibe etmektir ve özellikle kemoterapötiklere dirençte de önemli rol oynamaktadır

(Ischia ve So, 2013; Chehab ve ark., 2015). Bu nedenle bu çalışmamızda ki amaçlarımızdan biri GA uygulaması sonrasında tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktivasyonu sonrasında kanser hücrelerinin apoptotik mekanizmasında nasıl bir değişiklik meydana geldiğini araştırmaktır. Bu amaçla, T24 hücrelerinde apoptozu değerlendirmek için BAX/BCL2 oranı incelenmiştir. GA uygulaması sonrasında kontrole nazaran 1. ve 24. saatlerde BAX düzeyinde artış olmasına karşın aynı süre ve doz GA uygulaması sonrasında kontrole nazaran BCL2 düzeyinde bir değişim gözlemlenmedi. 6. saat GA uygulama sonrasında BCL2 düzeyinde önemli azalma gözlemlenirken Bax düzeyinde kontrole nazaran bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Çalışmamızın sonucunda GA uygulaması sonrasında aynı dozda farklı zaman aralıklarında BAX düzeyindeki artış veya BCL2 düzeyinde azalış hücreleri apoptoza yönlendirmektedir. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak Lee ve ark., (2012)'larında over kanser hücrelerinde GA uygulaması sonrasında kontrole nazaran sitoplazmik ve mitokondrideki BAX oranında artış, sitoplazmik BCL2 düzeyinde ise azalma belirlemişlerdir. Kolon kanseri hücre hattı HT29 hücrelerinde de benzer şekilde GA uygulaması sonrasında BAX düzeyinde artış ve BCL2 düzeyinde azalma belirlenmiştir (Mohammedi ve ark., 2016). Başka bir kolon kanseri hücre hattında (HCT116) GA uygulama sonrasında p53^{+/+} ve p53^{-/-} hücrelerinde BCL2 düzeyinde azalma belirlenmiştir (McNamara ve ark., 2012). Karkoulis ve ark. (2013)'ları çalışmasında ise mesane kanser hücrelerinde (T24 ve RT4) Geldanamisin'in apoptozu hangi yolakla indüklediğini araştırmışlardır. Bu amaçla, Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 proteinlerinin düzeyindeki değişimleri incelemişlerdir. 24 saat 1 µM ve 10 µM GA uygulaması sonrasında aktif kaspaz-8 ve aktif kaspaz-3 düzeyinde artış belirlenirken aktif kaspaz-9 düzeyinde önemli bir artış belirlenememiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki, geldanamisin hücreleri apoptoza dışsal yolak aracılığıyla indüklemektedir.

Sonuç olarak insan mesane kanser hücre hattı T24 hücrelerinde Geldanamisin hem DNA metilasyonu hem de histon modifikasyonları üzerinden epigenetik regülasyonu düzenlemekte ve kanser hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bu durum gösteriyor ki, insan mesane kanser hücrelerinde düşük doz HSP90 inhibitörleri terapötik olarak önemli bir etkiye sahiptir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda insan mesane kanser hücre hattı T24 hücrelerinde HSP90 inhibitörü Geldanamisin, DNA metilasyonu ve gen ifadenmesini inaktive edici histon metilasyonları (H3K27me³, H4K20me¹, H4K20me³) üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda HSP90 spesifik inhibitörü olan Geldanamisin, doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlendi. IC₅₀ değeri 10 µM olarak belirlendi.

Geldanamisin DNA metilasyonundaki etkisini belirlemek için T24 hücrelerinde hipermetilasyon nedeniyle inhibe *WIF1*, *DNMT1* ve *HDAC1* incelendi. Geldanamisin, doz ve zamana bağlı olarak DNMT1'i hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde inhibe etmiştir. GA uygulaması sonrasında DNMT1'e paralel olarak *HDAC1* mRNA düzeyinde de azalma belirlendi. Aynı azalma TSA uygulaması sonrasında da görüldü. DNMT1'in azaldığı doz ve zaman aralığında *WIF1* geninde de reaktivasyon görüldü.

Geldanamisin'in histon post-translasyonel modifikasyonlarındaki rolünü belirlemek için GA uygulaması öncesi ve sonrasında H3K27me³ ve H4K20me^{1/3} ve histon H4 metilasyonundan sorumlu enzimler SET8 ve KMT5C düzeyleri incelendi. Geldanamisin uygulaması sonrasında H3K27me³, H4K20me^{1/3}, SET8 ve KMT5C düzeylerinde doz ve zamana bağlı olarak artma ve azalmalar belirlendi. Geldanamisin'in histon post-translasyonel modifikasyonlar üzerine etkisinin tam olarak belirlenebilmesi için ilave doz-zaman aralığının genişletilmesi ve bu modifikasyonlardan sorumlu olabileceği düşünülen SMYD2 ilave lizin histon metiltransferaz ve demetilaz enzimlerinde çalışılması gereklidir.

β-katenin sinyal yolağının antagonistlerinden bir olan *WIF1* geninin Geldanamisin aracılı reaktivasyonunu takiben meane kanser hücredeki apoptotik yolağın aktivasyonu BAX/BCL2 düzeyi ile değerlendirildi. Geldanamisin uygulaması sonrasında 6. saat hariç BAX düzeyinde artma, BCL-2 düzeyinde ise kontrole nazaran bir değişim gözlemlenmedi. Buna karşın 6 saat Geldanamisin inkübasyonu sonucunda BCL2 düzeyinde önemli bir azalma belirlenirken BAX

düzeyinde kontrole nazaran herhangi bir değişim gözlemlenmedi. Sonuç olarak *WIF1*'in aktivasyonunu takiben mesane kanser hücreleri apoptoza indüklenmiştir.

Çalışmamız sonucunda HSP90'nın hem DNA metilasyonu hem de histon post-translasyonel modifikasyonlar üzerinden epigenetik mekanizmalar üzerine önemli etkileri olduğunu belirledik. Ancak HSP90'nın epigenetik mekanizmalar üzerinde etkisini tam olarak ortaya koyabilmek için HSP90'nın nükleusa transloke olabilmesi için HSP70 ile oluşturduğu kompleksten ayrılması gerekmektedir. Bu nedenle Geldanamisin'in HSP70 üzerindeki etkisinin HSP90 ve histon post-translasyonel modifikasyonlarda görevli HSP90 client proteinlerinin birlikte değerlendirilmesi epigenetik mekanizmalardaki etkisinin tam olarak aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.

ÖZET

Mesane Kanseri Hücrelerinde Hsp90 İnhibitörlerinin Histon Metilasyonu üzerine Etkisi

Isı şok protein 90 (HSP90), ATP-bağımlı moleküler bir şaperon olup kanserin temel özellikleri olarak tanımlanan çok sayıdaki onkogenik sinyal proteinlerinin stabilitesi ve fonksiyonu için gereklidir. Son yollarda, HSP90'ın epigenetik yolaklarda da önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Mesane kanseri, en sık görülen ürogenital kanserler içerisinde ikinci sırada yer almaktadır. Mesane kanseri, geleneksel olarak genetik bir hastalık olarak kabul edilmekle birlikte epigenetik mekanizmaların da bu hastalığın etiyolojisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı HSP90 proteininin mesane kanserinde inaktive edici metilasyon düzeyine olan etkisinin belirlenmesidir. HSP90 spesifik inhibitörü Geldanamisin (GA)'nin sitotoksitesi, insan mesane kanser hücre hattı T24 hücrelerinde zamana ve doza bağımlı olarak WST1 aracılığıyla, *DNMT1*, *HDAC1* ve *WIF-1* hedef genlerin ifadelendirme değişimleri real-time PCR *DNMT1*, *H3K27me3*, Histone H4, *H4K20me1*, *H4K20me3*, Akt1, pAkt1(S473), SET8, KMT5C, Bax ve Bcl2 protein düzeyleri western blot kullanılarak belirlendi. Bulgularımıza göre geldanamisin yüksek dozda (10µM) hücre proliferasyonunu inhibisyonuna neden olmaktadır. Düşük ve yüksek dozlarda GA, Akt1 inhibisyonu aracılığıyla transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde *DNMT1*'in ifadelendirilmesini ve aynı zamanda *HDAC1* ifadelendirilmesini azaltmaktadır. Bununla birlikte, GA muamelesi sonrasında *DNMT* ve *HDAC1* gen düzeylerindeki azalmaya bağlı olarak *WIF1* geninin yeniden ifadelendiği gözlemlendi. Buna ek olarak, histon post-translasyonel modifikasyonlar (*H3K27me3*, *H4K20me1* and *H4K20me3*) ve bu modifikasyonlardan sorumlu enzimlerin (SET8 ve KMT5C), GA uygulamasını takiben doz ve zaman bağımlı olarak upregüle veya downregüle olduğu ve Histon H4 protein düzeyinde önemli bir değişimin olmadığı gözlemlendi. *WIF1* yeniden ifadelendirilmesini takiben kanser hücrelerinde apoptotik indüksiyon belirlendi. Bizim sonuçlarımız, HSP90 proteininin moleküler etkilerinin epigenetik düzenlenme üzerine etkilerinin tam olarak belirlenmesine ve invaziv mesane kanserlerinin tedavisi için yeni moleküler hedeflerin (HSP 90 client proteinler) tanımlanmasına katkı sağlayabilecektir.

Anahtar kelimeler:HSP90, DNA metilasyonu, Histon post-translasyonel modifikasyonlar
Mesane kanseri.

SUMMARY

The Effect of HSP90 Inhibitors on Histone Methylation in Bladder Cancer

Heat shock protein 90 (HSP90) is an ATP-dependent molecular chaperone that required for the stability and function of numerous oncogenic signaling proteins that determine the hallmarks of cancer. HSP90 has been shown to play an pivotal role in epigenetic pathways in recent years. Bladder cancer constitutes the second most common type of cancer among urogenital cancers. Bladder cancer has traditionally been accepted as a genetic disease, however it is known that the epigenetic mechanisms also play an important role in the etiology of this disease. The aim of this thesis project to explain how the HSP90 protein affects to inactivating histone methylation markers levels in bladder cancers. Cytotoxic effect of HSP90 spesific inhibitor Geldanamycin (GA) in human bladder cancer cell line T24 was detected time and dose dependent manner with WST1, expression aberration of target genes DNMT1, HDAC1 and WIF-1 using real-time PCR and protein levels of DNMT1, H3K27me3, Histone H4, H4K20me1, H4K20me3, Akt1, pAkt1(S473), SET8, KMT5C, Bax and Bcl2 using western blot. Our results demostrated that GA caused an decreased cell proliferation at high dose (10 μ M). In both low and high dose cases, GA was decreased DNMT1 at both transcriptional and translational levels via inhibition of Akt1 and therewithal *HDAC1* expression. However, reexpression of *WIF1* gene was observed after treatment GA based on decreased *DNMT1* and *HDAC1* gene levels. Furthermore we showed that histone post-translational modifications (H3K27me³, H4K20me¹ and H4K20me³) and enzymes (SET8 and KMT5C) responsible for this modifications was up regulated or downregulated depend on the dose and time following GA treatment and also not observe significantly any changes at Histone H4 protein level. We demonstrated to induce apoptosis following reexpression of *WIF*. Our findings may offer a new approach determination of molecular effect of HSP90 on epigenetic regulation would allow us to identify new molecular targets (HSP90 client proteins) for treatment of the invasive bladder cancer.

Keywords:HSP90, DNA methylation, Histone post-translational modifications, Bladder cancer

KAYNAKLAR

- ABU-FARHA, M., LANOUE, S., ELİSMA, F., TREMBLAY, V., BUTSON, J., FİGEYS, D., COUTURE, J.F. (2011). Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *J Mol Cell Biol*, **3(5)**:301-8.
- ABU-FARHA, M., LAMBERT, J.P., AL-MADHOUN, A.S., ELİSMA, F., SKERJANC I.S., FİGEYS, D. (2008). The tale of two domains: proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase. *Mol Cell Proteomics*, **7(3)**:560-72.
- ACQUAVIVA, J., SMİTH, D.L., JİMENEZ, J.P., ZHANG, C., SEQUEİRA, M., HE, S., SANG, J., BATES, R.C., PROİA, D.A. (2014). Overcoming acquired BRAF inhibitor resistance in melanoma via targeted inhibition of HSP90 with ganetespib. *Mol Cancer Ther*, **13(2)**:353-63.
- AGGER, K., CLOOS, P.A., RUDKJAER, L., WILLİAMS, K., ANDERSEN, G., CHRISTENSEN, J., HELİN, K. (2009). The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev*, **23(10)**:1171-6.
- ALBERT, M., HELİN, K. (2010). Histone methyltransferases in cancer. *Semin Cell Dev Biol*, **21(2)**:209-20.
- ALİ, M.M., ROE, S.M., VAUGHAN, C.K., MEYER, P., PANARETOU, B., PİPER, P.W., PRODROMOU, C., PEARL L.H. (2006). Crystal structure of an HSP90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, **440(7087)**:1013-7.
- ANDERTON, J.A., BOSE, S., VOCKERODT, M., VRZALİKOVA, K., WEİ, W., KUO, M., HELİN, K., CHRISTENSEN, J., ROWE, M., MURRAY, P.G., WOODMAN, C.B. (2011). The H3K27me3 demethylase, KDM6B, is induced by Epstein-Barr virus and over-expressed in Hodgkin's Lymphoma. *Oncogene*, **30(17)**:2037-43.
- BAYLİN, S.B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology*, **2**:4-11.
- BOEHM, D., JENG, M., CAMUS, G., GRAMATİCA, A., SCHWARZER, R., JOHNSON, J.R., HULL, P.A., MONTANO, M., SAKANE, N., PAGANS, S., GODİN, R., DEEKS, S.G., KROGAN, N.J., GREENE, W.C., OTT, M. (2017). SMYD2-Mediated Histone Methylation Contributes to HIV-1 Latency. *Cell Host and Microbe*, baskıda.

- CALDAS-LOPES, E., CERCHIETTI, L., AHN, J.H., CLEMENT, C.C., ROBLES, A.I., RODÍNA, A., MOULICK, K., TALDONE, T., GOZMAN, A., GUO, Y., WUN, D.E., STANCHINA, E., WHITE, J., GROSS, S.S., MA Y, VARTICOVSKI, L., MELNICK A., CHIOSIS, G. (2009). HSP90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106(20)**:8368-73.
- CALDERWOOD, S.K., NECKERS, L. (2016). HSP90 in Cancer: Transcriptional Roles in the Nucleus. *Advances in Cancer Research*, **129**:89-106.
- CALDERWOOD, S.K., GONG, J. (2016). Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends in Biochemical Sciences*, **41(4)**:311-23.
- CAPPELLO, F., DAVID, S., ARDIZZONE, N., RAPPÀ, F., MARASÀ, L., BUCCHIERI, F., ZUMMO, G. (2006). Expression of Heat Shock Proteins HSP10, HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90 in Urothelial Carcinoma of Urinary Bladder. *Journal of Cancer Molecules*, **2(2)**: 73-77, 2006
- CARASCOSSA, S., DUDEK, P., CENNI, B., BRIAND, P.A., PICARD, D. (2010). CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP. *Genes Dev*, **1;24(7)**:708-19.
- CARDILLO, M.R., SALE, P., D.Í, SILVERÍO, F. (2000). Heat shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer. *Anticancer Res*, **20(6B)**:4579-83.
- CEDAR, H., BERGMAN, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*, **10(5)**:295-304.
- CHAE, Y.C., ANGELIN, A., LISANTI, S., KOSSENKOV, A.V., SPEICHER, K.D., WANG, H., POWERS, J.F., TISCHLER, A.S., PACAK, K., FLIEDNER, S., MICHÁLEK, R.D., KAROLY, E.D., WALLACE, D.C., LANGUINO, L.R., SPEICHER, D.W., ALTIERI, D.C. (2013). Landscape of the mitochondrial HSP90 metabolome in tumours. *Nature Communications*, **4**:2139.
- CHANDARLAPATY, S., SAWAI, A., YE, Q., SCOTT, A., SILINSKI, M., HUANG, K., FADDEN, P., PARTDRIGE, J., HALL, S., STEED, P., NORTON, L., ROSEN, N., SOLIT, D.B. (2008). SNX2112, a synthetic heat shock protein 90 inhibitor, has potent antitumor activity against HER kinase-dependent cancers. *Clin Cancer Res*, **14(1)**:240-8.
- CHEHAB, M., CAZA, T., SKOTNICKI, K., LANDAS, S., BRATSLAVSKY, G., MOLLAPOUR, M., BOURBOULIA, D. (2015). Targeting HSP90 in urothelial carcinoma. *Oncotarget*, **6(11)**:8454-73.

- CHEN, Y., CHEN, J., YU, J., YANG, G., TEMPLE, E., HARBINSKI, F., GAO, H., WILSON, C., PAGLIARINI, R., ZHOU, W. (2014). Identification of mixed lineage leukemia 1(MLL1) protein as a coactivator of heat shock factor 1(HSF1) protein in response to heat shock protein 90 (HSP90) inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, **289**(27):18914-27.
- DAS, C., LUCIA, M.S., HANSEN, K.C., TYLER, J.K. (2009). CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature*, **459**(7243):113-7.
- DING, G., CHEN, P., ZHANG, H., HUANG, X., ZANG, Y., LI, J., WONG, J. (2016). Regulation of Ubiquitin-like with Plant Homeodomain and RING Finger Domain 1 (UHRF1) Protein Stability by Heat Shock Protein 90. *Chaperone Machinery. J Biol Chem*, **291**(38):20125-35.
- DROR, N., MANDEL, M., LAVIE, G. (2013). Unique anti-glioblastoma activities of hypericin are at the crossroad of biochemical and epigenetic events and culminate in tumor cell differentiation. *PLoS One*, **8**(9):e73625.
- ECHEVERRÍA, P.C., BERNTHALER, A., DUPUIS, P., MAYER, B., PICARD, D. (2011) An interaction network predicted from public data as a discovery tool: application to the HSP90 molecular chaperone machine. *PLoS One*, **6**(10):e26044.
- ECHTENKAMP, F.J., GVOZDENOV, Z., ADKINS, N.L, ZHANG, Y., LYNCH-DAY, M., WATANABE, S., PETERSON, C.L, FREEMAN, BC4. (2016). HSP90 and p23 Molecular Chaperones Control Chromatin Architecture by Maintaining the Functional Pool of the RSC Chromatin Remodeler. *Molecular Cell*, **64**(5):888-899.
- EHRlich, E.S., WANG, T., LUO, K., XIAO, Z., NIEWIADOMSKA, A.M., MARTÍNEZ, T., XU, W., NECKERS, L., YU X.F. (2009). Regulation of HSP90 client proteins by a Cullin5-RING E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(48):20330-5.
- ESTELLER, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histonemodification maps. *Nature Reviews Genetics*, **8**: 286-98.
- EUSTACE, B.K., JAY, D.G. (2004). Extracellular roles for the molecular chaperone, HSP90. *Cell Cycle*, **3**(9):1098-100.
- EVANS, S.S., REPASKY, E.A., FISHER, D.T. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nature Reviews Immunology*, **15**(6):335-49.
- FISKUS, W., BUCKLEY, K., RAO R., MANDAWAT, A., YANG, Y., JOSHI, R., WANG, Y., BALUSU, R., CHEN, J., KOUL, S., JOSHI, A., UPADHYAY, S., ATADJA P., BHALLA, K.N. (2009). Panobinostat treatment depletes EZH2 and DNMT1 levels and enhances decitabine mediated

- de-repression of JunB and loss of survival of human acute leukemia cells. *Cancer Biol Ther*, **8(10)**:939-50.
- FÜLLGRABE, J., KAVANAGH, E., JOSEPH, B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene*, **30(31)**:3391-403.
- GARG, G., KHANDELWAL, A., BLAGG, B.S. (2016). Anticancer Inhibitors of HSP90 Function: Beyond the Usual Suspects. *Adv Cancer Res*, **129**:51-88.
- GÖLLNER, S., OELLERICH, T., AGRAWAL-SINGH, S., SCHENK, T., KLEIN, H.U., ROHDE, C., PABST, C., SAUER, T., LERDRUP, M., TAVOR, S., STÖLZEL, F., HEROLD, S., EHNINGER, G., KÖHLER, G., PAN, K.T., URLAUB, H., SERVE, H., DUGAS, M., SPIEKERMANN, K., VICK, B., JEREMÍAS, I., BERDEL, W.E., HANSEN, K., ZELEN, A., WICKENHAUSER, C., MÜLLER, L.P., THIEDE, C., MÜLLER-TIDOW, C. (2017). Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. *Nat Med*, **23(1)**:69-78.
- HAMAMOTO, R., FURUKAWA, Y., MORITA, M., IIMURA, Y., SILVA, F.P., LI, M., YAGYU, R., NAKAMURA, Y. (2004). SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol*, **6(8)**:731-40.
- HARB-DE, L.A., ROSA, A., ACKER, M., KUMAR, R.A., MANOHARAN, M. (2015). Epigenetics application in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *The Canadian Journal of Urology*, **22(5)**:7947-51.
- HERMANN, A., GOWHER, H., JELTSCH, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**:2571-87.
- HOU, J., LIU, L., ZHANG, J., CUI, X.H., YAN, F.X., GUAN, H., CHEN, Y.F., AN, X.R. (2008). Epigenetic modification of histone 3 at lysine 9 in sheep zygotes and its relationship with DNA methylation. *BMC Dev Bio.*, **8**:60.
- IPENBERG, I., GUTTMANN-RAVIV, N., KHOURY, H.P., KUPERSHMIT, I., AYOUB, N. (2013). Heat shock protein 90 (HSP90) selectively regulates the stability of KDM4B/JMJD2B histone demethylase. *J Biol Chem*, **288(21)**:14681-7.
- ISAACS, J.S. (2016). HSP90 as a "Chaperone" of the Epigenome: Insights and Opportunities for Cancer Therapy. *Advances in Cancer Research*, **129**:107-40.
- ISCHIA, J., SO, A.I. (2013). The role of heat shock proteins in bladder cancer. *Nature Reviews Urology*, **10(7)**:386-95.
- JØRGENSEN, S, ELVERS, I., TRELLE MB, MENZEL, T., ESKILDSEN, M., JENSEN, O.N., HELLEDAY, T., HELIN, K., SØRENSEN, C.S.

- (2007). The histone methyltransferase SET8 is required for S-phase progression. *J Cell Biol*, **179**(7):1337-45.
- KAMAL, A., THAO, L., SENSINTAFFAR, J., ZHANG, L., BOEHM, M.F., FRITZ, L.C., BURROWS, F.J. (2003). A high-affinity conformation of HSP90 confers tumour selectivity on HSP90 inhibitors. *Nature*, **425**(6956):407-10.
- KANAT, B.H., KANAT, Z. (2015). Letter to the editor in response to the article "The effect of laser epilation on recurrence and satisfaction in patients with sacrococcygeal pilonidal disease: a prospective randomized controlled trial" by Demircan et al. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(2): 2929-2933. *Int J Clin Exp Med*, **8**(7):11642-4.
- KARAGÖZ, G.E, DUARTE, A.M., AKOURY, E., IPPEL, H., BIERNAT, J., MORÁN, LUENGO, T., RADLI, M., DIDENKO, T., NORDHUES, B.A., VEPRINTSEV, D.B., DICKEY, C.A., MANDELKOW, E., ZWECKSTETTER, M., BOELEN, R., MADL, T., RÜDIGER, S.G. (2014). HSP90-Tau complex reveals molecular basis for specificity in chaperone action. *Cell*, **156**(5):963-74.
- KARKOULIS, P.K., STRAVOPODIS, D.J., KONSTANTAKOU, E.G., VOUTSINAS, G.E. (2013). Targeted inhibition of heat shock protein 90 disrupts multiple oncogenic signaling pathways, thus inducing cell cycle arrest and programmed cell death in human urinary bladder cancer cell lines. *Cancer Cell International*, **13**(1):11.
- KASIOULIS, I., SYRED, H.M., TATE, P., FINCH, A., SHAW, J., SEAWRIGHT, A., FUSZARD, M., BOTTING, C.H., SHIRHAN, S., ADAMS, I.R., JACKSON I.J., VAN, HEYNINGEN, V., YEYATI, P.L. (2014). Kdm3a lysine demethylase is an HSP90 client required for cytoskeletal rearrangements during spermatogenesis. *Mol Biol Cell*, **25**(8):1216-33.
- KERAMISANO, D. , ABOALROUB , A. , ZHANG, Z., LIU , W., MARSHALL, D., DIVINEY, A., LARSEN, R.W., LANDGRAF, R., GELIS, I. (2016). Molecular Mechanism of Protein Kinase Recognition and Sorting by the HSP90 Kinome-Specific Cochaperone Cdc37. *Mol Cell*, **62**(2):260-71.
- KLÍKOVÁ, K., PÍLCHOVA, I., STEFANÍKOVA, A., HATOK, J., DOBROTA, D., RACAY, P. (2016). The Role of Heat Shock Proteins in Leukemia. *Klinicka Onkologie*, **29**(1):29-38.
- KOGA, F., TSUTSUMI, S., NECKERS, L.M. (2007). Low dose geldanamycin inhibits hepatocyte growth factor and hypoxia-stimulated invasion of cancer cells. *Cell Cycle*, **6**(11):1393-402.

- KOH, C.M., BEZZI, M., LOW, D.H., ANG, W.X., TEO, S.X., GAY, F.P., AL-HADDAWI, M., TAN, S.Y., OSATO, M., SABO, A., AMATI, B5, WEE, K.B., GUCCIONE, E. (2015). MYC regulates the core pre-mRNA splicing machinery as an essential step in lymphomagenesis. *Nature*, **523(7558)**:96-100.
- KOUZARIDES, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128(4)**:693-705.
- KU, S., LASORSA, E., ADELAÏYE, R., RAMAKRISHNAN, S., ELLIS, L., PILI, R. (2014). Inhibition of HSP90 augments docetaxel therapy in castrate resistant prostate cancer. *PLoS One*, **9(7)**:e103680.
- KUNDRAT, L., REGAN, L. (2010). Identification of residues on Hsp70 and HSP90 ubiquitinated by the cochaperone CHIP. *Journal of Molecular Biology*, **395(3)**:587-94.
- KURASHINA, R., OHYASHIKI, J.H., KOBAYASHI, C., HAMAMURA, R., ZHANG, Y., HIRANO, T., OHYASHIKI, K. (2009). Anti-proliferative activity of heat shock protein (HSP) 90 inhibitors via beta-catenin/TCF7L2 pathway in adult T cell leukemia cells. *Cancer Letters*, **284(1)**:62-70.
- LEACH, M.D., KLIPP, E., COWEN, L.E., BROWN, A.J. (2012). Fungal HSP90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. *Nature Reviews Microbiology*, **10(10)**:693-704.
- LEE, C.S., KIM, Y.J., LEE, S.A., MYUNG, S.C., KIM, W. (2012). Combined effect of HSP90 inhibitor geldanamycin and parthenolide via reactive oxygen species-mediated apoptotic process on epithelial ovarian cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **111(3)**:173-81.
- LI, J., BUCHNER, J. (2013). Structure, function and regulation of the HSP90 machinery. *Biomed journal*, **36(3)**:106-17.
- LI, Q.Q., HAO, J.J., ZHANG, Z., KRANE, L.S., HAMMERICH, K.H., SANFORD, T., TREPEL, J.B., NECKERS, L., AGARWAL, P.K. (2017). Proteomic analysis of proteome and histone post-translational modifications in heat shock protein 90 inhibition-mediated bladder cancer therapeutics. *Sci Rep*, **7(1)**:201.
- LI, J., RICHTER, K., BUCHNER, J. (2011). Mixed HSP90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nat Struct Mol Biol*. **18(1)**:61-6.
- LI, Y., ZHANG, D., XU, J., SHI, J., JIANG, L., YAO, N., YE, W. (2012). Discovery and development of natural heat shock protein 90 inhibitors in cancer treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2**:238-245.

- LIN, T.Y., BEAR, M., DU, Z., FOLEY, K.P., YING, W., BARSOUM, J., LONDON, C. (2008). The novel HSP90 inhibitor STA-9090 exhibits activity against Kit-dependent and -independent malignant mast cell tumors. *Exp Hematol*, **36**(10):1266-77.
- LLINÀS-ARIÀS, P., ESTELLER, M. (2017). Epigenetic inactivation of tumour suppressor coding and non-coding genes in human cancer: an update. *Open Biol*, **7**(9):170152.
- LLINÀS-ARIÀS, P., ESTELLER, M. (2017). Epigenetic inactivation of tumour suppressor coding and non-coding genes in human cancer: an update. *Open Biol*, **7**(9): 170152.
- MA, L., SATO, F., SATO, R., MATSUBARA, T., HIRAI, K., YAMASAKI, M., SHIN, T., SHIMADA, T., NOMURA, T., MORI, K., SUMINO, Y., MIMATA, H. (2014). Dual targeting of heat shock proteins 90 and 70 promotes cell death and enhances the anticancer effect of chemotherapeutic agents in bladder cancer. *Oncology Reports*, **31**(6):2482-92.
- MARCU MG, CHADLI A, BOUHOUCHE I, CATELLI, M., NECKERS, L.M. (2000). The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**(47):37181-6.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, E., LICHT, J. D. (2010). Deregulation of H3K27 methylation in cancer. *Nature Genetics*, **42**(2):100-1.
- MCNAMARA, A.V., BARCLAY, M., WATSON, A.J., JENKINS, J.R. (2012). HSP90 inhibitors sensitise human colon cancer cells to topoisomerase I poisons by depletion of key anti-apoptotic and cell cycle checkpoint proteins. *Biochem Pharmacol*, **83**(3):355-67.
- MITRA, A.P., COTE, R.J. (2009). Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annual Review of Pathology*, **4**:251-85.
- MITSIÁDES, C.S., MITSIÁDES, N.S., MCMULLAN, C.J., POULAKI, V., KUNG, A.L., DAVIES, F.E., MORGAN, G., AKIYAMA, M., SHRİNGARPURE, R., MUNSHI, N.C., RICHARDSON, P.G., HİDESHİMA, T., CHAUHAN, D., GU, X., BAİLEY, C., JOSEPH, M., LİBERMANN, T.A., ROSEN, N.S., ANDERSON, K.C. (2006). Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood*, **107**(3):1092-100.
- MİYAJİMA, N., TSUTSUMI, S., SOURBIER, C., BEEBE, K., MOLLAPOUR, M., RIVAS, C., YOSHIDA, S., TREPEL, J.B., HUANG, Y., TATOKORO, M., SHİNOHARA, N., NONOMURA, K., NECKERS, L. (2013). The HSP90 inhibitor ganetespib synergizes with the MET kinase

inhibitor crizotinib in both crizotinib-sensitive and -resistant MET-driven tumor models. *Cancer Research*, **1;73(23)**:7022-33.

MOHAMMADI, A., YAGHOUBI, M.M., GHOLAMHOSEYNIAN-NAJAR, A., KALANTARI-KHANDANI, B., SHARIFI, H., SARAVANI, M. (2016). HSP90 inhibitor enhances anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on HT-29 colorectal cancer cells via increasing BAX/BCL-2 ratio. *Cell Mol Biol*, **62(12)**:62-67.

NAGARAJU, G.P., ZHU, S., WEN, J., FARRIS, A.B., ADSAY, V.N., DIAZ, R., SNYDER, J.P., MAMORU, S., EL-RAYES, B.F. (2013). Novel synthetic curcumin analogues EF31 and UBS109 are potent DNA hypomethylating agents in pancreatic cancer. *Cancer Letters*, **341(2)**:195-203.

NAGARAJU, G.P., WU, C., MERCHANT, N., CHEN, Z., LESINSKI, G.B., EL-RAYES, B.F. (2017). Epigenetic effects of inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) in human pancreatic and colon cancer. *Cancer Letters*, **402**:110-116.

NJEMINI, R., SMITZ, J., DEMANET, C., SOSSO, M., METS, T. (2011). Circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in elderly members of a rural population from Cameroon: Association with infection and nutrition. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, **53**: 359–363

OKUI, T., SHIMO, T., HASSAN, N.M., FUKAZAWA, T., KURIO, N., TAKAOKA, M., NAOMOTO, Y., SASAKI, A. (2011). Antitumor effect of novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 against oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, **31(4)**:1197-204.

ÖZDAĞ, H., TESCHENDORFF, A.E., AHMED, A.A., HYLAND S.J., BLENKIRON, C., BOBROW, L., VEERAKUMARASIVAM, A., BURTT, G., SUBKHANKULOVA, T., ARENDS, M.J., COLLINS, V.P., BOWTELL, D., KOUZARIDES, T., BRENTON, J.D., CALDAS, C. (2006). Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genomics*, **7**:90.

PICK, E., KLUGER, Y., GILTNANE, J.M., MOEDER, C., CAMP, R.L., RIMM, D.L., KLUGER, H.M. (2007). High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res*, **67(7)**:2932-7.

PORTELA, A., ESTELLER, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*, **28(10)**:1057-68.

PRODROMOU, C. (2016). Mechanisms of HSP90 regulation. *Biochemical Journal*, **473(16)**:2439-52.

REYNOLDS PA, SIGAROUDINIA M, ZARDO G, WILSON MB, BENTON GM, MILLER CJ, HONG C, FRIDLYAND J, COSTELLO JF, TLSTY TD. Tumor

- suppressor p16INK4A regulates polycomb-mediated DNA hypermethylation in human mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 2006;281(34):24790-802.
- RİCHTER, K., WALTER, S., BUCHNER, J. (2004). The Co-chaperone Sba1 connects the ATPase reaction of HSP90 to the progression of the chaperone cycle. *Journal of Molecular Biology*, **342(5)**:1403-13.
- RODİNA, A., WANG, T., YAN, P., GOMES, E.D., DUNPHY, M.P., PİLLARSETTY, N. (2016). The epichaperome is an integrated chaperome network that facilitates tumour survival. *Nature*, **538(7625)**:397-401.
- ROE, S.M., PRODROMOU, C., O'BRIEN, R., LADBURY, J.E., PİPER, P.W., PEARL, L.H. (1999). Structural basis for inhibition of the HSP90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem*, **42(2)**:260-6.
- RUTHERFORD, S.L. (2003). Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability. *Nature Reviews Genetics*, **4(4)**:263-74.
- SANG, J., ACQUAVIVA, J., FRIEDLAND, J.C., SMİTH, D.L., SEQUEİRA, M., ZHANG, C., JİANG, Q., XUE, L., LOVLY, C.M., JİMENEZ, J.P., SHAW, A.T., DOEBELE, R.C., HE, S., BATES, R.C., CAMİDGE, D.R., MORRİS, S.W., EL-HARİRY, I., PROİA, D.A. (2013). Targeted inhibition of the molecular chaperone HSP90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*, **3(4)**:430-43.
- SAUSVILLE, E.A., TOMASZEWSKİ JE, IVY, P. (2003). Clinical development of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin. *Curr Cancer Drug Targets*, **3(5)**:377-83.
- SAWARKAR, R., SİEVERS, C., PARO, R. (2012). HSP90 globally targets paused RNA polymerase to regulate gene expression in response to environmental stimuli. *Cell*, **149(4)**:807-18.
- SCHLESİNGER, Y., STRAUSSMAN, R., KESHET, I., FARKASH, S., HECHT, M., ZİMMERMAN, J., EDEN, E., YAKHİNİ, Z., BEN-SHUSHAN, E., REUBİNOFF, B.E., BERGMAN, Y., SİMON, I., CEDAR, H. (2007). Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nature Genetics*, **39(2)**:232-6.
- SCHOPF, F.H., BİEBL, M.M., BUCHNER, J. (20039). The HSP90 chaperone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **18(6)**:345-360.
- SOO, E.T., YİP, G.W., LWIN, Z.M., KUMAR, S.D., BAY, B.H. (2008). Heat shock proteins as novel therapeutic targets in cancer. *In Vivo*, **22(3)**:311-5.

- SOO., E.T., YİP, G.W., LWIN, Z.M., KUMAR, S.D., BAY, B.H. (2008). Heat shock proteins as novel therapeutic targets in cancer. *In Vivo*, **22(3)**:311-5.
- SOROKA, J., WANDINGER, S.K., MÄUSBACHER, N., SCHREIBER, T., RICHTER, K., DAUB, H., BUCHNER, J. (2012). Conformational switching of the molecular chaperone HSP90 via regulated phosphorylation. *Mol Cell*, **45(4)**:517-28.
- SOUKUP, V., KALOUSOVÁ, M., CAPOUN, O., SOBOTKA, R., BREYL, Z., PEŠL, M., ZÍMA, T., HANUŠ, T. (2015). Panel of Urinary Diagnostic Markers for Non-Invasive Detection of Primary and Recurrent Urothelial Urinary Bladder Carcinoma. *Urol Int*, **95(1)**:56-64.
- SPELLMON, N., HOLCOMB, J., TRESCOTT, L., SIRINUPONG, N., YANG, Z. (2015). Structure and function of SET and MYND domain-containing proteins. *Int J Mol Sci*, **16(1)**:1406-28.
- STRAHL, B.D., ALLIS, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403(6765)**:41-5.
- ŞENCAN, İ., KESKİNKILIÇ, B. (2017). Türkiye Kanseri İstatistikleri, TC. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Ankara.
- TAİPALE, M., KRYKBAEVA, I., KOEVA, M., KAYATEKİN, C., WESTOVER, K.D., KARRAS, G.I., LİNDQUİST, S. (2012). Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell*, **150(5)**:987-1001.
- TAİPALE, M., KRYKBAEVA, I., KOEVA, M., KAYATEKİN, C., WESTOVER, K.D., KARRAS, G.I., LİNDQUİST, S. (2012). Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell*, **150(5)**:987-1001.
- TARDAT, M., MURR, R., HERCEG, Z., SARDET, C., JULIEN, E. (2007). PR-Set7-dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *J Cell Biol*, **179(7)**:1413-26.
- TARİQ, M., NUSSBAUMER, U., CHEN, Y., BEİSEL, C., PARO, R. (2009). Trithorax requires HSP90 for maintenance of active chromatin at sites of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106(4)**:1157-62.
- TJEERTES, J.V., MİLLER, K.M., JACKSON, S.P. (2009). Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *EMBO J*, **28(13)**:1878-89.
- TUREK-PLEWA, J., JAGODZIŃSKI, P.P. (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett*, **10**: 631-47.

- TURNER, B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, **22(9)**:836-45.
- VAROL, N., KONAC, E., BİLEN, C.Y. (2015). Does Wnt/ β -catenin pathway contribute to the stability of DNMT1 expression in urological cancer cell lines? *Exp Biol Med*, **240(5)**:624-30.
- VAROL, N., KONAC, E., ONEN, I.H., GUROCAK, S., ALP, E., YİLMAZ, A., MENEVSE, S., SOZEN, S. (2014). The epigenetically regulated effects of Wnt antagonists on the expression of genes in the apoptosis pathway in human bladder cancer cell line (T24). *DNA Cell Biology*, **33(7)**:408-17.
- VAUGHAN, C.K., MOLLAPOUR, M., SMİTH, J.R., TRUMAN, A., HU, B., GOOD, V.M., PANARETOU, B., NECKERS, L., CLARKE, P.A., WORKMAN, P., PİPER, P.W., PRODROMOU, C., PEARL, L.H. (2008). HSP90-dependent activation of protein kinases is regulated by chaperone-targeted dephosphorylation of Cdc37. *Molecular Cell*, **31(6)**:886-95.
- VERBA, K.A., WANG, R.Y., ARAKAWA, A., LİU, Y., SHİROUZU, M., YOKOYAMA, S., AGARD, D.A. (2016). Atomic structure of HSP90-Cdc37-Cdk4 reveals that HSP90 traps and stabilizes an unfolded kinase. *Science*, **352(6293)**:1542-7.
- VOELLMY, R., BOELLMANN, F. (2007). Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **594**:89-99.
- WANDİNGER, S.K., SUHRE, M.H., WEGELE, H., BUCHNER, J. (2016). The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone HSP90. *EMBO J*, **25(2)**:367-76.
- WEİ, H., WANG, B., MİYAGİ, M., SHE, Y., GOPALAN, B., HUANG, D.B., GHOSH, G., STARK, G.R., LU, T. (2013). PRMT5 dimethylates R30 of the p65 subunit to activate NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110(33)**:13516-21.
- WEİ, Y., XİA, W., ZHANG, Z., LİU, J., WANG, H., ADSAY, N.V., ALBARRACÍN, C., YU, D., ABBRUZZESE, J.L., MİLLS, G.B., BAST, R.C., J.R., HORTOBAGYÍ, G.N., HUNG, M.C. (2008). Loss of trimethylation at lysine 27 of histone H3 is a predictor of poor outcome in breast, ovarian, and pancreatic cancers. *Molecular Carcinogenesis*, **47(9)**:701-6.
- WHİTESELL, L., LİNDQUİST, S.L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*, **5(10)**:761-72.
- WHİTESELL, L., SHİFRİN, S.D., SCHWAB, G., NECKERS, L.M. (1992). Benzoquinonoid ansamycins possess selective tumoricidal activity unrelated to src kinase inhibition. *Cancer Res*, **52(7)**:1721-8.

- WILSON, S., FAN, L., SAHGAL, N., QI, J., FILIPP, F.V. (2017). The histone demethylase KDM3A regulates the transcriptional program of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncotarget*, **8(18)**:30328-30343.
- WORKMAN, P., POWERS, M.V. (2007). Chaperoning cell death: a critical dual role for HSP90 in small-cell lung cancer. *Nat Chem Biol*, **3(8)**:455-7.
- XIANG, Y., ZHU, Z., HAN, G., LIN, H., XU, L., CHEN, C.D. (2007). JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res*, **17(10)**:850-7.
- YAMAGUCHI, H., HUNG, M.C. (2014). Regulation and Role of EZH2 in Cancer. *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association*, **46(3)**: 209-222.
- ZHANG, Z., JOH, K., YATSUKI, H., ZHAO, W., SOEJIMA, H., HIGASHIMOTO, K. (2007). Retinoic acid receptor beta2 is epigenetically silenced either by DNA methylation or repressive histone modifications at the promoter in cervical cancer cells. *Cancer Lett*, **247**: 318-27.
- ZHOU, Q., AGOSTON, A.T., ATADJA, P., NELSON, W.G., DAVIDSON, N.E. (2008). Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA methyltransferase 1 in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Research*, **6(5)**:873-83.

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nuran ÇOBAN

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Cumhuriyet Üniversitesi	2013

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

“Mesane Kanseri Hücrelerinde HSP90 İnhibitörlerinin Histon Metilasyonu Üzerine Etkisi ”

Danışman: Yrd.Doç. Dr. Nuray VAROL

Yabancı Dili: İngilizce

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Nermin Akçalı, Muhsin Elmas, Cem Karaosmanoğlu, Ayşen Yıldırım, **Nuran Çoban.** Trizomi X sendromlu bir olgu. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 26-29 Ekim 2017, Fethiye/Türkiye, Özet kitabı, pp:155