T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİTOKONDRİYAL DERİVE PEPTİDLERİN (MOTS-C) GLİOMA U87 HÜCRE HATTINDA ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Duygu ZÜHRE
ORCID: 0000-0003-2494-2740

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

AĞUSTOS 2023

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2019970236

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİTOKONDRİYAL DERİVE PEPTİDLERİN (MOTS-C) GLİOMA U87 HÜCRE HATTINDA ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Duygu ZÜHRE

ORCID: 0000-0003-2494-2740

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

ORCID: 0000-0001-7939-5153

İZMİR
AĞUSTOS 2023

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ danışmanlığında hazırlayıp sunduğum "Mitokondriyal Derive Peptitlerin (MOTS-c) Glioma U87 hücre hattında Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin in vitro Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri , belgesel akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun sunduğumu , tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi , tezimin özgün olduğunu , tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.

Duygu ZÜHRE

Tarih:08.08.2023

İmza:

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana rehberlik eden ve benden desteğini esirgemeyen danışmanım Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi **Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ**' a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç içerisinde hiçbir koşulda beni yalnız bırakmayan ve bilgilerini esirgemeyen Deniz Evrim KAVAK' a, Yüksek Lisans eğitimime başladığım günden bu güne bana her konuda destek olan değerli dostum Serap KURT 'a ve bana sabırla yardımcı olan arkadaşlarım; Dilan ULUKAYA, Khayala RASULOVA ve Beste BALBAL'a teşekkür ediyorum.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan başta Suat ZÜHRE ve Aynur ZÜHRE olmak üzere tüm aile bireylerime en büyük teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisans eğitimimden bu yana her zaman, her koşulda bana destek olan, her zorlukta beni motive eden ve arkamda duran değerli yol arkadaşım Aykut ŞİMŞEK' e sonsuz teşekkür ediyorum.

Duygu ZÜHRE
İZMİR-2023

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ ..... **İ**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **İİ**

KISALTMALAR ..... **İV**

ÖZET ..... **V**

1.GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2.GENEL BİLGİLER **3**

2.1. KANSER TANIMI **3**

2.1.1 Beyin Tümörleri ve Sınıflandırılması 5

2.1.1.1.Glioblastoma Multiform 8

2.2.APOPTOZ **12**

2.3.MİTOKONDRİYAL DNA VE MOTS-C **15**

2.3.1.MOTS-c Fonksiyonu 17

2.3.2.MOTS-c Yapısı ve Lokalizasyonu 17

2.3.3.MOTS-c ‘nin Fizyolojik Etkileri 19

2.3.4.MOTS-c' nin Mekanizması 20

2.4.MOTS-C VE KANSER **21**

3.GEREÇ VE YÖNTEM **22**

3.1.ARAŞTIRMANIN TİPİ **22**

3.2.ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI MERKEZ **22**

3.3.ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ **23**

3.4.ÇALIŞMA MATERYALİ **23**

3.5.ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ **23**

3.6.VERİ TOPLAMA ARAÇLARI **23**

3.6.1.Çalışmada Kullanılan Materyaller 23

3.6.1.1.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları 23

3.6.1.2.Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları 25

3.6.2.Kullanılan Metotlar 26

3.6.2.1. Hücre Hattının Çözdürülmesi, Uygun Ortam Koşullarında İnkübe Edilmesi 26
3.6.2.2.Pasajlama..... 28
3.6.2.3.Hücre Hattının Dondurulması 30
3.6.2.4.MOTS-c'nin U87 GM Hücre Hattında Sitotoksik Etkisinin Araştırılması..... 30
3.6.2.7.In Vitro Kanser Hücrelerine MOTS-c Alımı 34
3.6.2.8. MOTS-c'nin Apoptoz ilişkili genlerde mRNA 34
ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması (RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve..... 34
Kantitatif Real-Time PCR) 34
3.7.ARAŞTIRMA PLANI..... 39
4.BULGULAR..... 40
4.1.MTT SİTOTOKSİSİTE DENEY BULGULARI..... 40
4.1.1.U-87 MG Hücre Hattının MTT Deney Sonuçları 40
4.2.GERÇEK ZAMANLI PCR ANALİZ SONUÇLAR..... 43
4.2.1. Apoptoz ilişkili genlerde mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması (RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Kantitatif Real-Time PCR) 43
5.TARTIŞMA..... 45
6.SONUÇ VE ÖNERİLER..... 47
7.KAYNAKÇA 48
8.EKLER..... 54
EK 1. ETİK KURUL ONAYI 54
EK 2. ARBİS ÖZGEÇMİŞ..... 56

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları 26
Tablo 2.Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları 27
Tablo 3.cDNA Sentez Kiti Bileşenleri 40
Tablo 4.Tasarlanan Primer Dizileri 41
Tablo 5.Real Time PCR İşlemlerinde Kullanılan Malzemeler ve Miktarları 42
Tablo 6.Gerçek Zamanlı PCR ısıl koşul tablosu 42
Tablo 7:Araştırma Planı 43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanserin Gelişimi ve Yayılımı 3
Şekil 2. Kanserin Temel Özellikleri 4
Şekil 3.Kanserde Yaygın Kullanılan Tedavi Yöntemleri 4
Şekil 4. Dünya Sağlık Örgütünün 2016 Verilerine Göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırması 6
Şekil 5. Dünya Sağlık Örgütünün 2016 Verilerine Göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırması..... 7
Şekil 6. 2015 DSÖ Verilerine Göre Beyin ve Sinir Sistemi Kanserlerinin Yaşa Bağlı Gösterimi 9
Şekil 7.Gliomadaki Spesifik Moleküler Değişiklikler..... 10
Şekil 8.Yetişkin Bireylerde Beyin Tümörlerinin Dağılım Şeması 10
Şekil 9.Glioblastoma Manyetik Rezonans Görüntüsü 11
Şekil 10.Apoptoz Yolakları 14
Şekil 11.mtDNA Tarafından Kodlanan Mitokondri Kaynaklı Peptitler..... 16
Şekil 12. Mitokondriyal Türevli Peptit MOTS-c'nin Açık Okuma Çerçevesi 18
Şekil 13.Mitokondriyal Genlerin Nükleer genlerle iletişimi 19
Şekil 14.MOTS-c' nin Çekirdek ve Mitokondrideki Etkileri 20
Şekil 15.MOTS-c'nin Mekanizması ve İşlevi 21
Şekil 16.Yöntemin Şematize Edilerek Özetlenmesi 22
Şekil 17.U87 MG Hücre Hattının İnkübasyonunda Kullanılan CO2 İnkübatör..... 27
Şekil 18.U87 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü 28
Şekil 19.U87 GM Hücrelerinin Deney Uygulamalarının Yapıldığı Laminer Kabin.. 29
Şekil 20.Ticari Olarak Satın Alınan MOTS-c 31
Şekil 21.MTT Aşamalarının Şematik Gösterimi..... 32
Şekil 22. U87 MG Hücrelerinin 96 kuyulu plaka Düzenine Ekimi ve MTT Görüntüleri (24 ve 48 saat) 32
Şekil 23.U87 MG Hücrelerinin 96 kuyulu plaka Düzenine Ekimi ve MTT Görüntüleri (24 ve 48 saat) 33
Şekil 24.Gerçek Zamanlı PCR İçin Hazırlanan Deney Düzenekleri. 34

Şekil 25.Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 24. saat sonraki U87 MG % Canlılığı.MTT Sonucu 40
Şekil 26.Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 48. saat sonraki U87 MG % Canlılığı.MTT Sonucu 41
Şekil 27.Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 24. Saat sonraki U87 MG % Canlılığı.MTT Sonucu 41
Şekil 28.Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 48. Saat sonraki U87 MG % Canlılığı.MTT Sonucu 42
Şekil 29:Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 48. Saat sonraki U87 hücre serisi üzerinde anti-apoptotik (BCL-2) ve pro-apoptotik (BAX) genlerinin RT-PCR analizi 43

KISALTMALAR

MDP	(Mitokondriyal Türevli Peptit)
MtDNA	(Mitokondriyal DNA)
DNA	(Deoksiribonükleik asit)
DSÖ	(Dünya Sağlık Örgütü)
AMPK	(AMP ile aktive edilmiş protein kinazı)
AICAR	(5-Aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid)
DMEM	(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
MTT	(3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür)
PBS	(Fosfat tamponlu salin)
DMSO	(Dimetil sülfoksit)
FBS	(Fetal Bovine Serum)
GBM	(Glioblastoma Multiform)
RNA	(Ribonükleik Asit)
Rt- PCR	(Gerçek Zamanlı PCR)
PCR	(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
mRNA	(mesajcı RNA)
Ct	(Eşik eğrisi)
Dk	(dakika)
°C	(Santigrat)
µl	(mikrolitre)
µg	(mikrogram)
µm	(mikrometre)
µM	(mikro molar)

MİTOKONDRİYAL DERİVE PEPTİDLERİN (MOTS-C) GLİOMA U87 HÜCRE HATTINDA ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi
Duygu ZÜHRE

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Balçova İzmir Türkiye

ÖZET

Gliomalar yüksek görülme sıklığına sahip agresif primer tümörler olup tedaviye direnç göstermektedirler. Glioma hücrelerinde, hücre döngüsünü ve apoptozu düzenlemede görev alan BCL-2 protein ailesinin üyelerinden BAX ve BCL-2 apoptotik genleri yer almaktadır. BCL-2 protein ailesi, içsel veya mitokondriyal apoptotik yolakları kontrol eder ve düzenler. Bu yolak mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP) destekler. Bcl-2 proteinlerinin ana etkisi mitokondrilerde gerçekleşir.

Warburg hipotezine göre kanser hücreleri oksijen varlığında yüksek oranda glikoz kullanmaktadır ve ardından glikoz laktata fermente edilmektedir. Mitokondri türevli peptit olan MOTS-c'nin glikoz alımını uyarmada, glikolizin kullanımını ve laktat üretimini arttırmada görev aldığı anti-apoptotik ve anti-oksidatif stres gibi etkilere de sahip olduğu bilinmektedir. Günümüzde glioma patogenezinde halen aydınlatılamamış noktalar bulunmaktadır. Çalışmamızda MOTS-c'nin GBM hücre hattındaki sitotoksik etkisi ve apoptoz mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda insan GBM (U-87 MG) hücre hattında, MOTS-c kullanımının sitotoksik etkileri MTT analizi kullanılarak değerlendirildi. Farklı konsantrasyonlardaki MOTS-c'nin GBM (U87) hücresinin sitotoksisitesinde rol alan sinyal yollarına ait gen ifadeleri seviyeleri kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir

reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemiyle araştırıldı. Çalışmamızda Farklı konsantrasyonlarda uygulanan MOTS-c'nin U87 hücre hattında doza bağlı olarak 48. Saatte hücre canlılığını anlamlı ölçüde azalttığı gözlemlendi. U87 hücre hattına uygulanan 20 µM MOTS-c 40 µM MOTS-c uygulamasından daha yüksek BAX/BCL-2 pro-apoptotik 20 kat değişim göstererek apoptoza teşvik etmiştir. Bu da MOTS-c'nin doz spesifik etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Glioblastoma, MOTS-c, Apoptoz, Kanser, U87
Tezin sayfa adedi: 72
Danışman: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

MITOCHONDRIAL DERIVE PEPTIDES (MOTS-C)
GLIOMA U87 ON CELL LINE IN VITRO
INVESTIGATION OF APOPTOTIC EFFECTS

Master Thesis

Duygu ZÜHRE

Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences
Department of Medical Biology
Balcova- Izmir/ Turkey

ABSTRACT

Gliomas are aggressive primary tumors with a high incidence and are resistant to treatment. Glioma cells contain BAX and BCL-2 apoptotic genes, members of the BCL-2 protein family, which are involved in regulating the cell cycle and apoptosis. The BCL-2 family of proteins controls and regulates intrinsic or mitochondrial apoptotic pathways. This pathway supports mitochondrial outer membrane permeability (MOMP). The main action of Bcl-2 proteins takes place in mitochondria.

According to the Warburg hypothesis, cancer cells use high levels of glucose in the presence of oxygen, and then glucose is fermented into lactate. It is known that MOTS-c, a mitochondria-derived peptide, has effects such as anti-apoptotic and anti-oxidative stress, where it plays a role in stimulating glucose uptake, increasing the use of glycolysis and lactate production. Today, there are still unexplained points in the pathogenesis of glioma. In our study, it was aimed to investigate the cytotoxic effect and apoptosis mechanisms of MOTS-c in GBM cell line. For this purpose, the cytotoxic effects of the use of MOTS-c in the human GBM (U-87 MG) cell line were evaluated using MTT analysis. The gene expression levels of the signaling pathways involved in the cytotoxicity of the GBM (U87) cell of different concentrations of MOTS-c were investigated by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) method. In our study, it was observed that MOTS-c applied at

different concentrations significantly reduced cell viability in the U87 cell line at the 48th hour depending on the dose. 20 μM MOTS-c applied to the U87 cell line showed a higher BAX/BCL-2 pro-apoptotic 20-fold change than 40 μM MOTS-c application, promoting apoptosis. This revealed that MOTS-c had a dose-specific effect.

Key words: Glioblastoma, MOTS-c, Apoptosis, Cancer, U87

Number of pages of the thesis: 72

Advisor: Prof. Dr. Sefa KIZILDAG

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Gliomalar, (Malign glioma, glioblastoma veya GBM) merkezi sinir sisteminin glial hücrelerinden ortaya çıkan heterojen nöroepitelyal tümörlerdir (1). Gliomalar en çok görülme sıklığına sahip kötü huylu primer tümörler olmasının yanı sıra oldukça agresif ve tedaviye dirençli tümörler olarak literatürde yer edinmiştir. Gliomaların görülme sıklığı 100.000'de 6.03 olmakla birlikte vakaların yaklaşık olarak %55' inde glioblastoma (GBM) olarak kendini göstermektedir. Glioblastomaların, genetik ve epigenetik deformasyon sonucu oluştuğu bilinmektedir (2). Kanserin ayırt edici özellikleri arasında hücre ölümüne direnç gösterme, replikatif ölümsüzlüğe katkı sağlama, metastazı aktive etme ve genom kararsızlığı yer alırken son çalışmalar enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi ve bağışıklık sisteminden kaçışın da ayırt edici özellikler arasına eklendiğini göstermiştir (3). Mitokondriyal türevli peptitler metabolizma düzenlenmesinde, yaşlanma, iltihaplanma ve ters insülin direncini düzenlemede görev almaktadır. Tüm bunların yanı sıra MOTS-c'nin glikoliz alımını uyarmada, glikoliz kullanımı arttırmada, yağ asitlerini okside etmede ve insülin faaliyetlerini düzenlemede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (4). Yapılan çalışmalarda mitokondriyal türevli peptitlerin in vivo olarak anti apoptotik, anti oksidatif stres ve anti inflamatuar yanıt yoluyla sitoprotektif etkiler uyguladığı sonucuna varılmıştır. MOTS-c üzerinde yapılan az sayıda çalışma, bu peptidin özellikle hücresel metabolizma üzerinde önemli roller üstlenebileceğini göstermektedir. Bilimsel çalışmalar MOTS-c varlığına cevap olarak hücrede 5-Aminoimidazol-4-karboksamid ribo nükleotid (AICAR) oranlarının artış gösterdiğini bu durum sonucunda ise AMP-aktive protein kinaz (AMPK) ifadesinin aktive olduğunu ortaya çıkarmıştır. AMPK, neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde yer edinmiş hücresel enerji sensörü olarak bilinmektedir. AMP/ATP oranındaki artış AMPK yolağını harekete geçirir bunun sonucunda enerji tüketimini engellenir ve katabolik olaylar tetiklenir. (5,6). AMPK çeşitli metabolik yolları düzenlemesinin yanı sıra kanser tedavisi içinde terapötik bir hedef olarak görülmektedir (7,8).

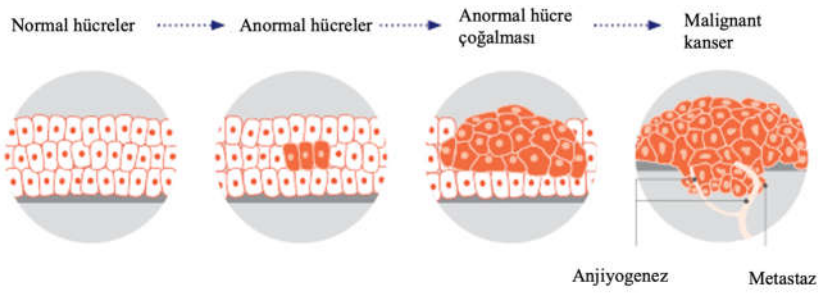
Kanser hücrelerinde düzensiz metabolik değişiklikler AMPK ile önlenebilir. AMPK 'nın hücresel enerji regülasyonundaki rolü kanser tedavisinde önemli ve etkili

olabileceğini de göstermiştir. Yürütülen çalışmalar MOTS-c'nin hücredeki AMPK seviyesinde önemli artış sağlamasının yanında kanser hücrelerinde apoptoz yolaklarında da AMPK tarafından modüle edilebileceğini göstermektedir. Bu çalışmada insan GBM U87 hücre hattında MOTS-c'nin proliferatif ve/veya anti-apoptotik etkisi olup olmadığı ve mitokondriyal türevli peptit olan MOTS-c'nin hangi apoptotik moleküler sinyal yolaklarını indüklediği ve sitotoksik etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda MOTS-c'nin GBM U87 hücre hattı üzerindeki etkisini göstermek amacıyla belirli konsantrasyonlarda uygulama yapılıp hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda MOTS-c peptidinin Glioblastoma hücre hattı U87 üzerinde antikanser etki gösterip-göstermediği konusunda bulgular elde edilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Tanımı

Vücudun çeşitli bölgelerindeki kontrolsüz hücre bölünmeleri kanserli yapıların oluşmasına neden olur. Yılda yaklaşık 10 milyondan fazla ölüm prevalansı ile dünyadaki önde gelen ölüm nedenlerinin ikinci sırasında yer edinmiştir. Kanser gelişimi, metastaz, mutasyon ve genetik olayları içeren olaylar sonucu kendini gösterir (9). Kanser hücreleri büyürken sınır tanımayan, sağlıklı hücrelerin kontrolsüz hücre bölünmeleri sonucu artan, çevrelerindeki doku ve damarların içine girip yayılım gösteren özelliktedirler. Tedavi edilemeyen ve tedavisi gecikmiş olan kanserler ölümcüldür. Mevcut kanser tedavileri, genellikle sağlıklı hücreleri öldüren ve hastalarda toksisiteye neden olan kemoterapötik ilaçların alınmasını içerir. Kanser erken tanı ve tedavisi literatürde önemli bir yere sahiptir.

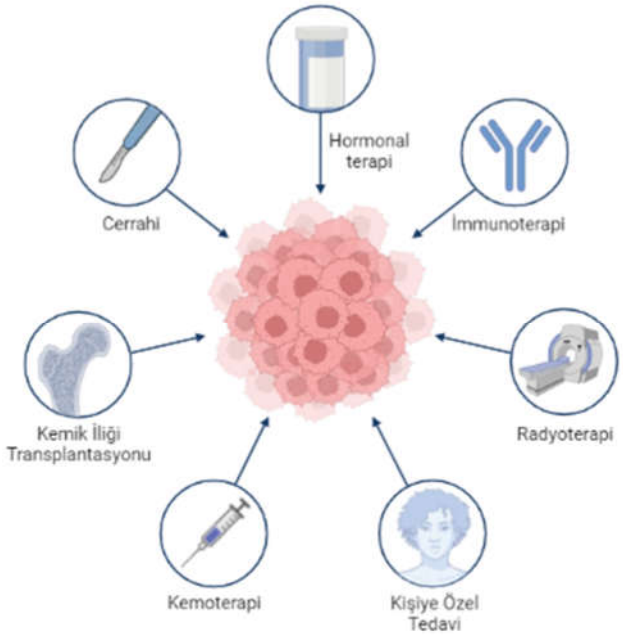


Şekil 1. Kanserin Gelişimi ve Yayılımı (10)

Kanserin temel özellikleri, normal hücreler tarafından neoplastik büyüme durumlarına geçişte kazanılan bir dizi işlevsel yetenek, olarak belirlenmiştir. Son çalışmalar ile kanserin 8 temel özelliğine ek olarak, genomik kararsızlık ve mutasyon, tümör teşvik eden inflamasyon, fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşma, mutasyonlu olmayan epigenetik yeniden programlama, polimorfik mikro biyomlar ve senesens temel özellikleri eklenmiş ve kanserin bildiğimiz 14 temel özelliği literatüre kazandırılmıştır (11).



Şekil 2. Kanserin Temel Özellikleri (12)



Şekil 3.Kanserde Yaygın Kullanılan Tedavi Yöntemleri (BioRender ile yapılmıştır)

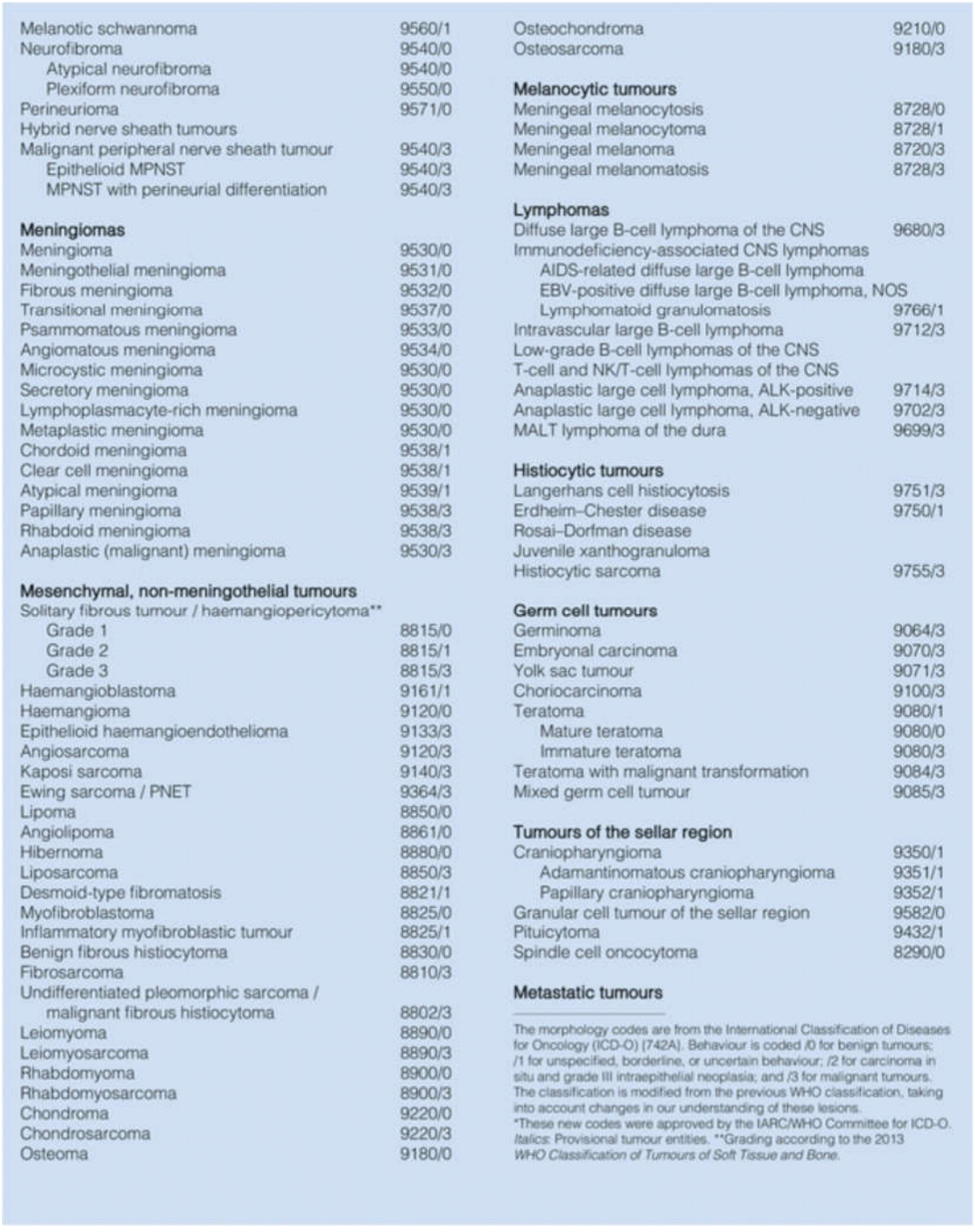
2.1.1 Beyin Tümörleri ve Sınıflandırılması

Beyin tümörleri, iyi huyludan kötü huylu tümöre kadar değişen malignite derecesine sahip beyin içi dokulardan ve beyin zarlarından kaynaklanan bir neoplazma grubunu ifade eder (13). Beyin tümörleri genel olarak 2 sınıfta gruplandırılır; primer beyin tümörü, kötü huylu tümörler (malign) veya iyi huylu tümörler (benign). Merkezi sinir sistemi dışına metastaz yapamazlar yüksek derecede morbidite ve mortalite ile ilişkili heterojen neoplazma grubu olarak tanımlanırlar (14). Metastatik (sekonder) beyin tümörleri, vücudun farklı bölümlerinde bulunan kanser veya sarkom gibi primer bir neoplazmadan beyne doğru yayılım gösteren kötü huylu lezyonlar olarak tanımlanır. Beyin metastazları nörolojik fonksiyonun bozulmasına neden olma eğilimindedir ve hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkiler (15). Beyin tümörü metastazları nörolojik işlevlerin olumsuz etkilemelerinin yanı sıra yaşam kalitesinin ve yaşam süresinin kısalmasına da neden olmaktadır (15). Merkezi sinir sistemi tümörleri 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından güncellenerek moleküler özellikler histolojik derecelendirme ile birleştirilmiştir (16). Gliomalar, Dünya Sağlık Örgütü tarafından oluşturulan kriterlere göre sınıflandırılmıştır.

Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin 2016 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3
Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype	*9400/3*
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype	*9401/3*
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
Epithelioid glioblastoma	*9440/3*
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*
Glioblastoma, NOS	9440/3
Diffuse midline glioma, H3 K27M–mutant	9385/3*
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3
Oligodendroglioma, NOS	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3
Anaplastic oligodendroglioma, NOS	*9451/3*
Oligoastrocytoma, NOS	*9382/3*
Anaplastic oligoastrocytoma, NOS	*9382/3*
Other astrocytic tumours	
Pilocytic astrocytoma	9421/1
Pilomyxoid astrocytoma	9425/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Ependymal tumours	
Subependymoma	9383/1
Myxopapillary ependymoma	9394/1
Ependymoma	9391/3
Papillary ependymoma	9393/3
Clear cell ependymoma	9391/3
Tanycytic ependymoma	9391/3
Ependymoma, *RELA* fusion–positive	9396/3*
Anaplastic ependymoma	9392/3
Other gliomas	
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1
Angiocentric glioma	9431/1
Astroblastoma	9430/3
Choroid plexus tumours	
Choroid plexus papilloma	9390/0
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1
Choroid plexus carcinoma	9390/3
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours	
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gangliocytoma	9492/0
Ganglioglioma	9505/1
Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte–Duclos disease)	9493/0
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	9412/1
Papillary glioneuronal tumour	9509/1
Rosette-forming glioneuronal tumour	9509/1
Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour	
Central neurocytoma	9506/1
Extraventricular neurocytoma	9506/1
Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
Paraganglioma	8693/1
Tumours of the pineal region	
Pineocytoma	9361/1
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Pineoblastoma	9362/3
Papillary tumour of the pineal region	9395/3
Embryonal tumours	
Medulloblastomas, genetically defined	
Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
Medulloblastoma, SHH-activated and *TP53*-mutant	9476/3*
Medulloblastoma, SHH-activated and *TP53*-wildtype	9471/3
Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	9477/3*
Medulloblastoma, group 3	
Medulloblastoma, group 4	
Medulloblastomas, histologically defined	
Medulloblastoma, classic	9470/3
Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Medulloblastoma, NOS	9470/3
Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	9478/3*
Embryonal tumour with multilayered rosettes, NOS	*9478/3*
Medulloepithelioma	9501/3
CNS neuroblastoma	9500/3
CNS ganglioneuroblastoma	9490/3
CNS embryonal tumour, NOS	9473/3
Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3
CNS embryonal tumour with rhabdoid features	*9508/3*
Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Schwannoma	9560/0
Cellular schwannoma	9560/0
Plexiform schwannoma	9560/0

Şekil 4. Dünya Sağlık Örgütünün 2016 Verilerine Göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırması (17)



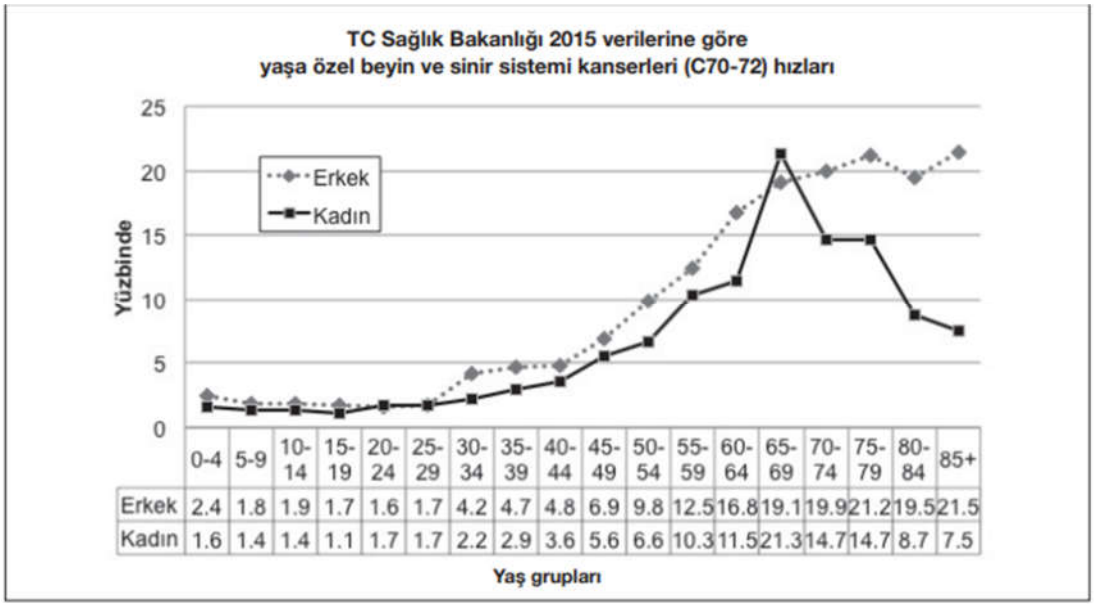
Melanotic schwannoma	9560/1
Neurofibroma	9540/0
Atypical neurofibroma	9540/0
Plexiform neurofibroma	9550/0
Perineurioma	9571/0
Hybrid nerve sheath tumours	
Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3
Epithelioid MPNST	9540/3
MPNST with perineurial differentiation	9540/3
Meningiomas	
Meningioma	9530/0
Meningothelial meningioma	9531/0
Fibrous meningioma	9532/0
Transitional meningioma	9537/0
Psammomatous meningioma	9533/0
Angiomatous meningioma	9534/0
Microcystic meningioma	9530/0
Secretory meningioma	9530/0
Lymphoplasmacyte-rich meningioma	9530/0
Metaplastic meningioma	9530/0
Chordoid meningioma	9538/1
Clear cell meningioma	9538/1
Atypical meningioma	9539/1
Papillary meningioma	9538/3
Rhabdoid meningioma	9538/3
Anaplastic (malignant) meningioma	9530/3
Mesenchymal, non-meningothelial tumours	
Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma**	
Grade 1	8815/0
Grade 2	8815/1
Grade 3	8815/3
Haemangioblastoma	9161/1
Haemangioma	9120/0
Epithelioid haemangioendothelioma	9133/3
Angiosarcoma	9120/3
Kaposi sarcoma	9140/3
Ewing sarcoma / PNET	9364/3
Lipoma	8850/0
Angiolipoma	8861/0
Hibernoma	8880/0
Liposarcoma	8850/3
Desmoid-type fibromatosis	8821/1
Myofibroblastoma	8825/0
Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1
Benign fibrous histiocytoma	8830/0
Fibrosarcoma	8810/3
Undifferentiated pleomorphic sarcoma / malignant fibrous histiocytoma	8802/3
Leiomyoma	8890/0
Leiomyosarcoma	8890/3
Rhabdomyoma	8900/0
Rhabdomyosarcoma	8900/3
Chondroma	9220/0
Chondrosarcoma	9220/3
Osteoma	9180/0
Osteochondroma	9210/0
Osteosarcoma	9180/3
Melanocytic tumours	
Meningeal melanocytosis	8728/0
Meningeal melanocytoma	8728/1
Meningeal melanoma	8720/3
Meningeal melanomatosis	8728/3
Lymphomas	
Diffuse large B-cell lymphoma of the CNS	9680/3
Immunodeficiency-associated CNS lymphomas	
AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma	
EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, NOS	
Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Intravascular large B-cell lymphoma	9712/3
Low-grade B-cell lymphomas of the CNS	
T-cell and NK/T-cell lymphomas of the CNS	
Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive	9714/3
Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative	9702/3
MALT lymphoma of the dura	9699/3
Histiocytic tumours	
Langerhans cell histiocytosis	9751/3
Erdheim–Chester disease	9750/1
Rosai–Dorfman disease	
Juvenile xanthogranuloma	
Histiocytic sarcoma	9755/3
Germ cell tumours	
Germinoma	9064/3
Embryonal carcinoma	9070/3
Yolk sac tumour	9071/3
Choriocarcinoma	9100/3
Teratoma	9080/1
Mature teratoma	9080/0
Immature teratoma	9080/3
Teratoma with malignant transformation	9084/3
Mixed germ cell tumour	9085/3
Tumours of the sellar region	
Craniopharyngioma	9350/1
Adamantinomatous craniopharyngioma	9351/1
Papillary craniopharyngioma	9352/1
Granular cell tumour of the sellar region	9582/0
Pituicytoma	9432/1
Spindle cell oncocytoma	8290/0
Metastatic tumours	

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (742A). Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions.
*These new codes were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O. *Italics*: Provisional tumour entities. **Grading according to the 2013 *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*.

Şekil 5. Dünya Sağlık Örgütünün 2016 Verilerine Göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırması Devamı (17)

2.1.1.1.Glioblastoma Multiform

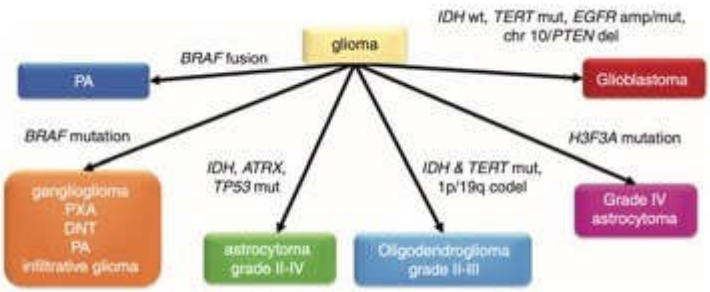
Glioblastoma agresif ve en yaygın primer beyin tümörü olarak literatürde yer edinmiştir. Gliomaların görülme sıklığı 100.000'de 6.03 olmakla birlikte vakaların yaklaşık %55'inde glioblastoma (GBM) olarak görülmektedir (2). Bu oran hastalığın görüldüğü ülkeye, tıbbi koşullara ve bireyin genetik yatkınlıklarına göre değişiklik gösterebilir. Türkiye istatistiklerine göre merkezi sinir sistemi kanserlerinin tüm kanserlerin %2'sini oluşturduğu bilinmektedir (18). GBM esas olarak ilerleyen yaşlarda teşhis edilir ve ortalama tanı yaşı 64'tür. Sıfır ila 19 yaşları arasında bildirilen tüm beyin ve MSS tümörlerinin yaklaşık %3'ünü oluşturan bu kanser türü çocuklarda nadir gözlemlenir. Glial tümörler yaş ile değişiklik gösterir. Yaş ile birlikte tümör sıklığı ve şiddeti artış gösterir. Yaşa göre ayarlanmış yıllık glioblastoma görülme sıklığı, çocuklarda 100.000'de 0.15'ten 75-84 yaşındaki hastalarda 100.000'de 15.03'e kadar yaşla birlikte artar (15) insidans 75 ila 84 yaşlarında zirve yaparken ve 85 yaşından sonra düşüş göstermektedir. (19). GBM tanısı almış hastalar genellikle tanıdan 12 ila 18 ay sonra kötüleşme gösterir. Günümüzde güvenli rezeksiyon artı adjuvan kemo radyoterapi uygulanan hastalarda ortalama sağkalım 14 ay olarak gözlemlenmiştir Sağkalıma dahil olan prognostik faktörler arasında yaş ve rezeksiyonun boyutu yer almaktadır. (20). Gliomaların isimlendirilmesi ve teşhisi için uluslararası standart, GBM' nın 4. derece kanser olarak tanımlandığı Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmasıdır. 2016 yılından bu yana gliomaların DSÖ sınıflandırması, bu neoplazmanın dört tipinin ayırt edildiği histopatolojik kriterler tarafından belirlenen malignite derecesine dayanmaktadır. (17). 2016 DSÖ verilerine göre tümörün klinik, histolojik, immün histolojik ve genetik özellikleri arasında uyumsuzluk olabileceğini gösterilmiştir. Henüz DSÖ'ne göre sınıflandırılmamış olması farklı ve keşfedilmemiş bir özelliğe sahip GBM alt biriminin var olma olasılığını ortaya koymaktadır (21). T.C. Sağlık Bakanlığı 2015 istatistiklerine göre Türkiye'de merkezi sinir sistemi kanserlerinin görülme sıklığı erkeklerde yüz binde 5,3 kadınlarda ise 4,1 olarak kayıtlara geçmiştir (18). Yaş dışındaki glioblastoma gelişimi ve yayılımı için risk faktörleri henüz tam anlamıyla tanımlanmamıştır. Erkeklerin kadınlardan (1.6:1) ve beyaz bireylerin siyahi bireylerden (2:1) daha sık etkilendiği yapılan çalışmalarda gün yüzüne çıkmıştır (22). Bu dağılımların nedenleri belirsizdir.



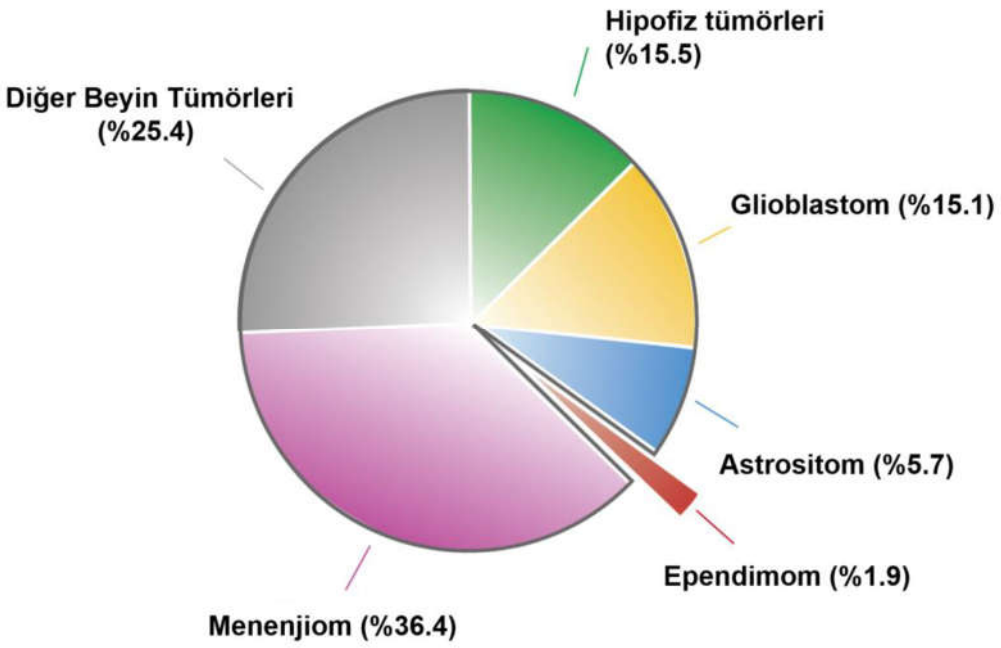
	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85+
Erkek	2.4	1.8	1.9	1.7	1.6	1.7	4.2	4.7	4.8	6.9	9.8	12.5	16.8	19.1	19.9	21.2	19.5	21.5
Kadın	1.6	1.4	1.4	1.1	1.7	1.7	2.2	2.9	3.6	5.6	6.6	10.3	11.5	21.3	14.7	14.7	8.7	7.5

Şekil 6. 2015 DSÖ Verilerine Göre Beyin ve Sinir Sistemi Kanserlerinin Yaşa Bağlı Gösterimi (18)

GBM oluşumu ile ilgili olarak literatürde kesin kanıtlar henüz var olmamakla birlikte 3 farklı mekanizmanın GBM oluşumuna zemin oluşturabildiği kanıtlanmıştır. Bunlar; Ailesel kalıtım, Alerji öyküsü ve Çevresel faktörler olarak sıralanabilir. Sunulan en tutarlı sonuçlar, iyonize radyasyon maruziyeti sonrası artış gösteren risk ve atopik hastalık öyküsü ile azalan risktir (23). Çevresel faktörler ile (Sigara içimi, alkol tüketimi, uyuşturucu kullanımı, azotlu bileşik tüketimi) GBM arasında önemli bir kanıt sunulamamıştır (24). Kahve ve çay tüketimi birkaç kanser riskinin azalması ile ilişkilendirilirken, glioma risk ilişkileri ile ilgili olarak değerlendirildiğinde büyük ölçüde geçersiz olmuştur (25). Moleküler çalışmalara mendelian olmayan kalıtımın glioma gelişiminde etkisinin yok denilecek kadar az olduğu düşünülürken son yapılan çalışmalarda kalıtımın büyük ölçüde etki ettiği kanıtlanmıştır (26).



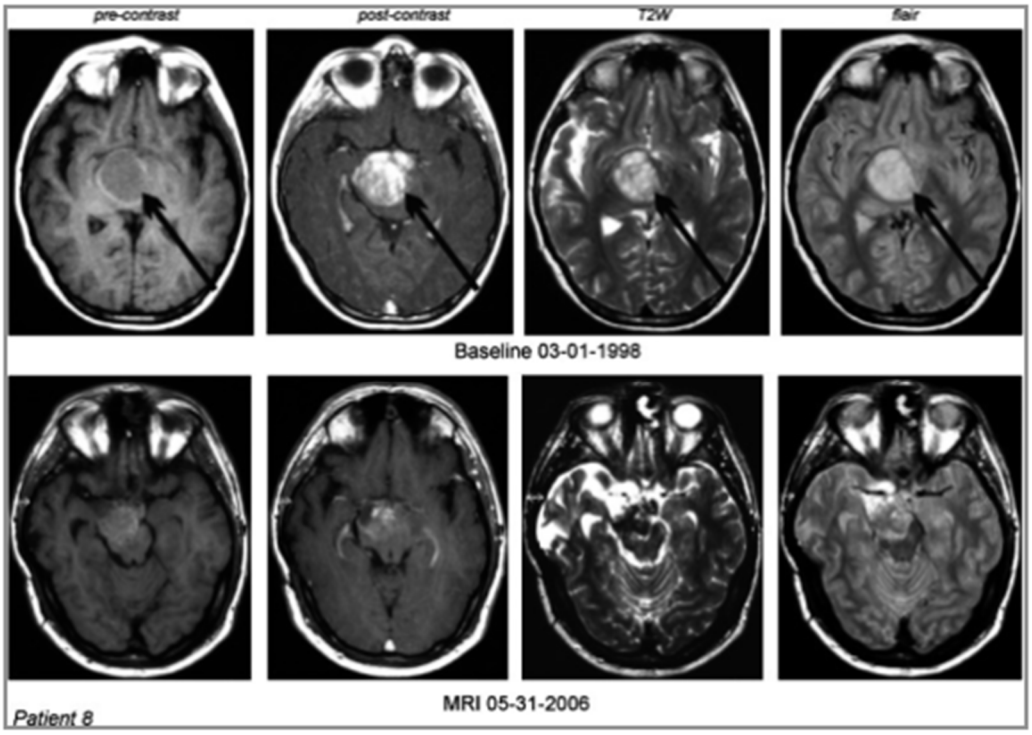
Şekil 7.Gliomadaki Spesifik Moleküler Değişiklikler (27)



Şekil 8.Yetişkin Bireylerde Beyin Tümörlerinin Dağılım Şeması (28)

GBM tanılı hastalarda nörolojik defisit, nöbet ve kafa içi basıncı olarak kendini gösteren klinik belirtiler sonrası ilk olarak acil servis birimine kabulü yaygındır. Semptomların açığa çıkması durumunda genellikle istenen radyolojik görüntüleme kontrastlı veya kontrastsız Bilgisayarlı Tomografidir. Bunu takiben hasta durumu doğrultusunda tümör tipi ve derecesini belirlemek amacıyla biyopsi, moleküler ve

histopatolojik tanıları koyabilmek için manyetik rezonans görüntüleme (MR) de prosedüre dahil edilir (29). Gliomaların metastazları nadir olsa da çoğu GBM hastası müdahalelere rağmen tanı sonrası 1-2 yıl içerisinde ölmektedir (30). GBM' lerin tedavisinin temelini cerrahi işlemler oluşturur. Bunun yanı sıra kemoterapi ve radyasyon da tedavi sürecine eşlik eder. Cerrahi işlemler sonucunda sağlıklı beyin dokusuna zarar vermeyecek şekilde tümörün mümkün olduğu kadar fazlasını çıkarmak hedeflenirken radyasyon tedavisinde çevredeki sağlıklı beyin dokusuna sızmış olan tümör hücrelerinin temizlenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 9.Glioblastoma Manyetik Rezonans Görüntüsü (31)

2.2.Apoptoz

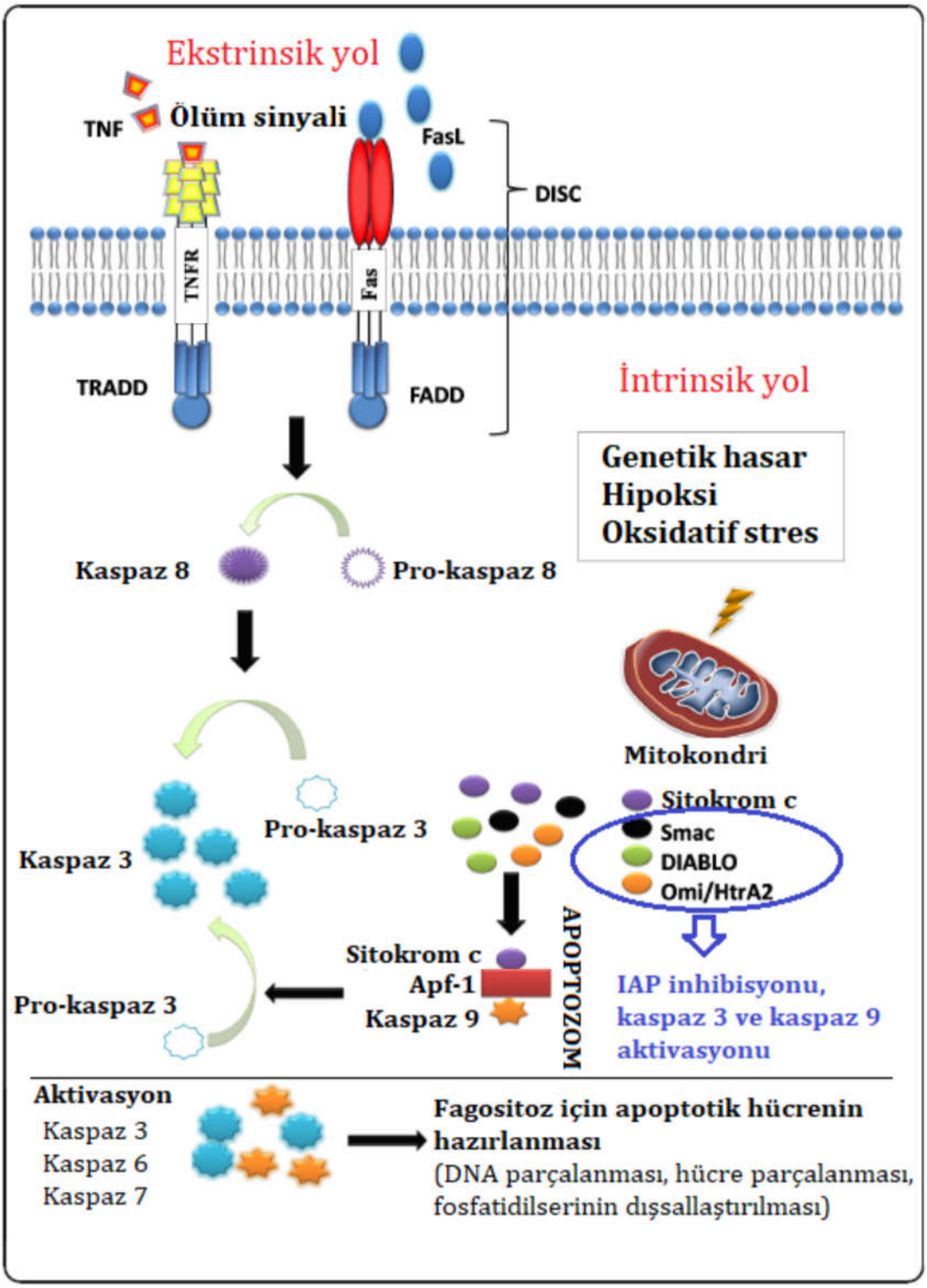
Apoptoz (programlanmış hücre ölümü); hücre ölümlerinin fizyolojik formudur. Hücreler, hasar gördüklerinde veya yaşlandıklarında kendi kendilerini ölüme götürme yeteneğine sahiptirler (32). Ölüm süreci hücrelerden alınan sinyaller ile düzenlenir. Hücre ölüm sinyallerinin etkilerine karşı direnç ve ölümsüzlük, kanserli hücrelerin en önemli özelliklerinden biridir. Sinyallerin düzenlenmesinde farklı biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler etkilidir. Birçok hormonun, apoptozisin başlamasını engelleyen, dokuya özelleşmiş, yaşamsal faktörler olarak hareket ettiği bilinirken birçoğunun ise apoptoz sürecine negatif ve pozitif katkı sağladığı bilinmektedir (33) Kanser tedavisinde başlıca hedef hızla ve kontrolsüzce proliferasyona uğrayan hücrelerin proliferasyonlarının önlenmesi ve vücuttaki sağlıklı hücrelere zarar vermeden hücre ölümünün sağlanmasıdır. Tedavi yöntemlerden en etkili kanser tedavisi kemoterapi ve radyasyon uygulamalarıdır; ancak bu tedaviler oldukça toksik ve ölümcül etkilere neden olabilmektedir (34). Yapılan çalışmalar kanser hastalarının sadece %50'sinin hayatta kalabildiğini göstermiş; bu durum ele alındığında hastalığa olumlu katkıları olabilecek toksisitesi daha az olan alternatif tedavi yöntemi arayışları ortaya çıkmıştır. Tedavi sürecinde kendini gösteren ciddi yan etkileri önlemek için yapılmakta olan ilaç çalışmalarında, kemoterapötik ajanların yüzlerce kimyasal varyantı uygulansa da maalesef daha az yan etkiye sahip bir ilaç bulunamamıştır.

Programlanmış hücre ölümü üç sınıftan oluşmaktadır: apoptoz, otofaji ve nekroz kanser hücresinin kaderini birlikte belirleyebilirler. (35). Değişkenlik sergileyen morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı olarak biyokimyasal mekanizmalar apoptozu karakterize edilir. Apoptoz süreci, hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin işleyişi, embriyonik gelişim ve kimyasal kökenli hücre ölümü gibi çeşitli mekanizmaların hayati bir bileşeni olarak kabul edilir (32).

Hücre içinde hareket eden ve çeşitli uyaranları içeren intrinsik yolak mitokondriden açığa çıkan negatif ve pozitif sinyallere bağlıdır ve apoptozun mitokondriyal yolunu oluşturur. Apoptoz başlangıcında adaptör bir protein APAF1'e bağlanan kaspaz 9'un intrinsik yolu kontrol ettiği bilinmektedir. (33). Apoptozun pozitif veya negatif faktörler ile indüklenmesi mitokondri membranında değişimlerin ortaya çıkmasına bunun sonucunda mitokondride geçiş porlarının açılmasına neden olur. Mitokondriyal

Geçiş porlarının açık duruma gelmesi pro-apoptotik proteinlerin mitokondriden hareket ederek hücre sitoplazmasına geçmesini ve apoptozu tetiklemesini sağlamaktadır (36).

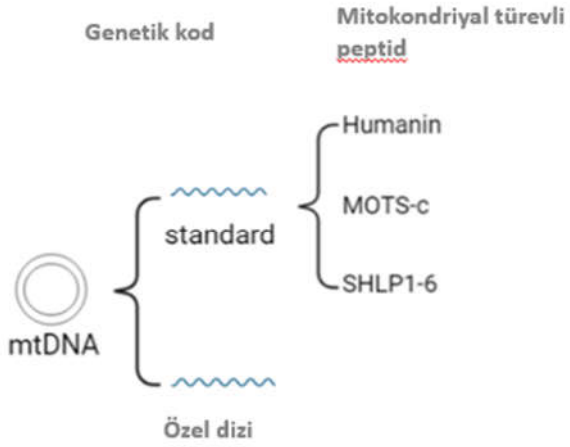
Ekstrinsik yolak apoptozun ölüm reseptör yolu olarak bilinir ve hücre yüzeyinde bulunan tümör nekroz faktörünün (TNF) apoptoz reseptörlerine ligasyonu ile tetiklenir. Makrofajlardan salınan ölüm ligandlarının reseptör ligasyonu sonucu adaptör proteinlerin alımının tetiklenmesi kaspaz 8'in aktivasyonu sonucu ortaya çıkar (37.38). Aktif kaspaz-8'in başlıca hedefleri arasında BID proteini bulunmaktadır. Bazı koşullarda ekstrinsik ölüm sinyalleri kaspaz 8 aracılığıyla intrinsik yolda çapraz iletişim kurabilir. Kesik BID' in oluşması sonrasında tBID' in mitokondrinin dış zarında yerleşmesi ve BH3 bölgesi aracılığıyla, mitokondriyal sitokrom c salınımını ve apoptozun birleştirilmesini teşvik edebilir. Bu durum, Anti-apoptotik BCL-2 ve/veya BCL-XL proteinlerinin görevini bloke edip, mitokondri dış zarında BAX/BAK oluşmasını sağlayabilmektedir. Bu aşamada açığa çıkan kanallar sitokrom c salımına neden olur bunun sonucunda ekstrinsik yolaktan ilerleme gösteren apoptoz sinyali mitokondriyal apoptotik yolak ile birleşir. (39)



Şekil 10.Apoptoz Yolakları (40)

2.3.Mitokondriyal DNA ve MOTS-c

Mitokondri doku, organ ve sistemlerin enerji üretim merkezi olup hücresel değişikliklerin algılanması, yanıtların hücresel bileşenlere iletilmesi, hücre içi sinyal mekanizması, metabolik denge, yaşlanma ve apoptoz gibi hücresel süreçlerin kontrol edilebilmesinde önemli bir rol oynar (41) Mitokondriyal DNA çekirdek haricinde, mitokondride bulunan bağımsız DNA parçasıdır. Mitokondriyal genomda yer alan az korunmuş ve korunmuş bölgelerin bulunması yüksek oranda oluşan mutasyonlar mtDNA'nın tek tipleşmesini engeller ve aynı zamanda çekirdeği kontrol etmek için mesajları şifreleyen önemli bir yapıdır (42). İnsan mitokondriyal DNA'sının (mtDNA), toplam 37 geni kodladığı bilinmektedir. Mitokondrinin 1200 farklı protein içerdiği, özellikle bu proteinlerin çoğunun mtDNA ifadesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. MtDNA ekspresyonunun düzenlenmesi çoklu kontrol mekanizmalarını içerir (43). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, rRNA lokuslarının, kopyalanabilen ve mitokondri türevli peptitler (MDP' ler) olarak adlandırılan kısa peptitlere çevrilebilen küçük açık okuma çerçeveleri (ORF' ler) içerdiğini ortaya koymuştur (44). Mitokondriyal Türevli Peptitler (MDP) mitokondriyal DNA tarafından kodlanan, pleiotropik özelliklere sahip polipeptit sınıfıdır. Yapılan çalışmalarda MDP'lerin Mitokondriyal enerji dengesinin sağlanmasında ve iletişiminde rol oynayan bir hormon olduğu ortaya konmuştur, MDP 'ler mitokondri ile benzer enerji işlevlerine sahip olup vücutta hücre koruyucu olarak görev alır.



Şekil 11.mtDNA Tarafından Kodlanan Mitokondri Kaynaklı Peptitler (9)

Mitokondriyal DNA, standart ve Özelleştirilmiş olmak üzere iki farklı genetik koda sahiptir. Mitokondri kaynaklı peptitlerin (Humanin, MOTS-c ve SHLP1-6) mitokondriyal genomdan kodlandığı bilinmektedir (44). Humanin, çeşitli streslere karşı koruyucu etkiler sağlayan, Alzheimer hastalığı (AD) ile ilgili bir çalışmada hayatta kalma faktörleri için taranan bir cDNA kütüphanesinden orijinal olarak izole edilen 24 amino asitlik peptittir (45). Humanin ekspresyonu, mitokondriyal stres faktörleri tarafından tetiklenebilirken steroid hormonları tarafından inhibe edilebilir. Kanserin ilk evrelerinde Humanin'in potansiyel bir onko-peptit olduğu ileri sürülmüştür bunun yanı sıra Humanin'in kemorez direncine ve kansere katkıda bulunduğu da son çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. Yakın tarihte Lee vd. tarafından keşfedilmiş olan MOTS-c hücresel DNA üzerinde etki gösteren ve mitokondriyal genom tarafından kodlanan AMP-aktive protein kinazı (AMPK) aktive ederek hücresel enerji metabolizmasında yer edinmiş bir peptittir (46). İlk araştırmalarda 12S rRNA'sında kısa açık okuma çerçeveleri (sORF' ler) incelenmiştir ve metabolik homeostazda biyolojik bir işleve sahip olduğu ortaya konmuştur. MOTS-c'nin sadece genel dolaşımda değil hücre çekirdeğinde de var olması doğal ve yararlı bir hormon olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalar MOTS-c'nin, 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribo nükleotit (AICAR) ve AMP ile aktive edilmiş protein kinazı (AMPK) aktive etmek için sentez yollarını hedef aldığını göstermektedir (47).

Mitokondriyal oksijen tüketiminin azalması ve yağ asidi kullanımının artması glikoz kullanımını ve laktat üretimini tetikleyebilir, MOTS-c'nin obezite, diyabet, egzersiz, osteoporoz ve uzun ömürlülüğün düzenlenmesi için metabolik homeostazı koruyabildiğini ve bu süreçlerde önemli roller üstlendiğini ortaya koymuştur (48).

2.3.1.MOTS-c Fonksiyonu

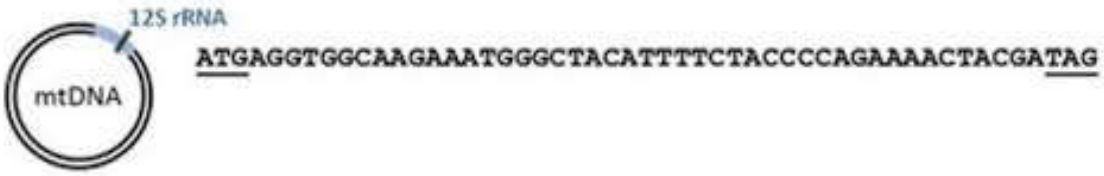
Mitokondrinin, ATP (enerji) üretimi ve yağ asidi oksidasyonuna ayrılmış özelleşmiş ana hücresel bölgeler barındırdığı bilinmektedir. Mitokondriyal Türevli Peptit MOTS-c**,** metabolik homeostazı destekler, obeziteyi ve insülin direncini azaltır (48). MOTS-c etki mekanizmaları, insülin duyarlılığını, gelişmiş glikoz kullanımını, mitokondriyal solunumun baskılanmasını ve folat-AICAR-AMPK yolunun hedeflenmesini içerir. Glikoz metabolizmasını düzenler ve insülin duyarlılığını geri kazandırır (9). Ayrıca kemik oluşumuyla sonuçlanan hücre farklılaşmasını desteklediği de bulunmuştur. MOTS-c'nin fizyolojik işlevi, obezite, insülin direnci, kronik yorgunluk gibi metabolik sendromların giderilmesiyle sergilenebilir. Mitokondriyal oksijen tüketiminin azalması ve yağ asidi kullanımının artması glikoz kullanımını ve laktat üretimini tetikleyebilir, bu da MOTS-c'nin obezite, diyabet, egzersiz ve uzun ömürlülüğün düzenlenmesi için metabolik homeostazı koruyabileceğini düşündürür (48). Bir mitokondriyal sinyal peptiti olan MOTS-c'nin, kas üzerinde etki etmesinin yanı sıra, AMPK' yı aktive etmesi ve metabolik esneklik homeostazın korunmasına katkı sağlaması bilimsel çalışmalar için yeni bir bakış açısı oluşturmuştur (49).

2.3.2.MOTS-c Yapısı ve Lokalizasyonu

Mitokondriyal genom, mitokondriyal genomun transkripsiyonu ve translasyonu için gerekli olan 12S rRNA ve 16S rRNA'yı içerir. Hem 16S rRNA hem de 12S rRNA genleri, MDP' leri kodlayan dizileri taşıyan olarak tanımlanan kısa açık okuma çerçeveleri taşır (46). MOTS-c, mitokondriyal 12S rRNA'da eksprese edilen 16 amino asitlik bir peptittir. Araştırmalar, mitokondrinin sinyalleşmede ve enerji üretiminde önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar sunmaktadır.

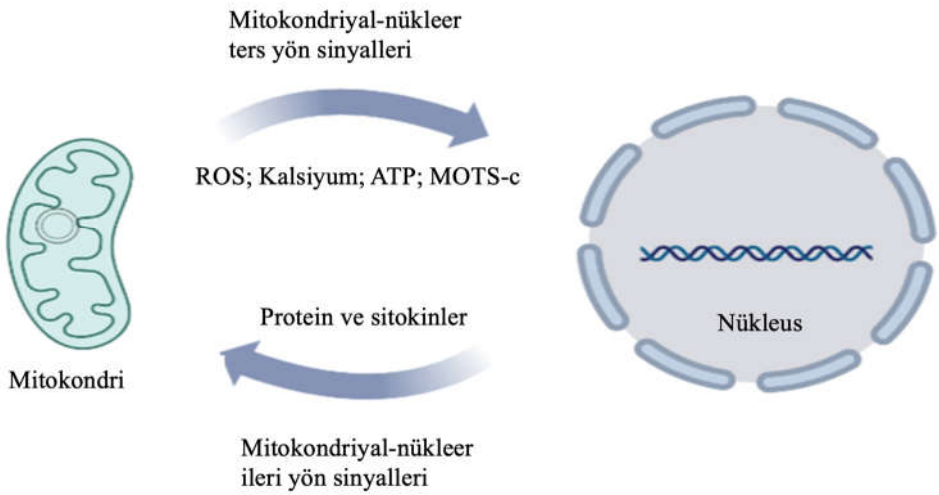
Molekül ağırlığı 2174.61 Da'dır.

MOTS-c peptidinin mitokondriyal translasyonunun şematik gösterimi Şekil 12'de sunulmuştur (46).



Şekil 12. Mitokondriyal Türevli Peptit MOTS-c'nin Açık Okuma Çerçevesi (46)

MOTS-c translasyonu nükleer genom tarafından, sitoplazma içerisinde gerçekleşmektedir. Bunun nedeni ise mitokondriyal genom içerisinde sıralı olarak bulunan başlatma ve durdurma kodonlarının yer alması ve translasyon durumunda 16 amino asitlik MOTS-c peptidinin oluşturulamayacak olmasıdır (46). Kemirgenlerde, dolaşımda (plazma), İnsanda ve birçok farklı dokuda MOTS-c'nin Eksprese edilebildiği bilinmektedir. Bu durum MOTS-c'nin hücre ve hormonal sistemin bir parçası olduğunu göstermektedir (50) Bazı araştırmalar ise iskelet kasının MOTS-c'nin ana hedef dokusu olduğunu kanıtlamaktadır. Plazmada MOTS-c varlığının keşfi bu peptidin sinyalizasyon için önemli olduğunu ve gen ifadesinin düzenlenmesine katkı sağladığını da ortaya koymuştur (46). Çekirdek, mitokondriyal fonksiyonu düzenleyen proteinlerin ve sitokinlerin ekspresyonu yoluyla ilerleme sinyalleri gönderir. Mitokondri ayrıca nükleer gen ekspresyonunu düzenlemek için ROS, kalsiyum iyonu, ATP ve MOTS-c yoluyla retrograd sinyaller gönderebilir (9).



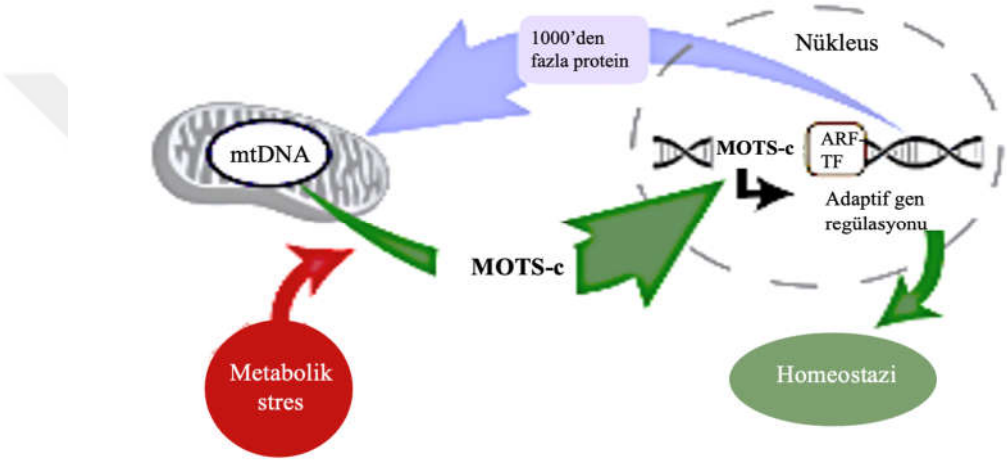
Şekil 13.Mitokondriyal Genlerin Nükleer genlerle iletişimi (9)

2.3.3.MOTS-c 'nin Fizyolojik Etkileri

Yapılan Çalışmalar metabolik homeostazın mitokondriyal düzenleyicisi olarak tanımlanan MOTS-c peptidinin nükleotid, yağ asidi ve hücresel glikoz metabolizmasını 5' adenozin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) ve folat döngüsü ile düzenlediğini ortaya çıkarmıştır. Lee ve arkadaşları tarfından yürütülen çalışma MOTS-c'nin hormonal ve hücresel metabolizmadaki işlevlerinin ortaya çıkmasına katkı sağlamıştır (46).

Fareler üzerinde yürütülmüş olan çalışmalar AMPK aktivasyonu ile kas sistemi uyarımının glikoz taşıyıcılarının etkilerini arttırdığını, MOTS-c peptidinin yaş bağımlı olarak kas üzerinde insülin direncini ters yönde etkilediğini ve kasta glikoz alımını pozitif yönlü etkilediğini ortaya koymuştur (51). Japonlar tarafından yürütülen çalışmalarda Uzun yaşam süresi ve MOTS-c ilişkisi arasındaki bağlantı ortaya konmuştur. Normal şartlarda proteinin 14. Pozisyonunda yer alan Lizin' in glutamat ile yer değiştirmesi MOTS-c de farklılaşmaya yol açtığı bu durumun ise protein işlevini etkilediği düşünülmektedir (52). Bunun yanı sıra önemli metabolik organel olan mitokondrinin yaşa bağlı hastalıklar ve yaşam süresi ile ilişkili olması MOTS-c gibi peptitlerin mitokondriyal işlevleri doğrudan etkileyebildiğini de ortaya koymuştur (52)

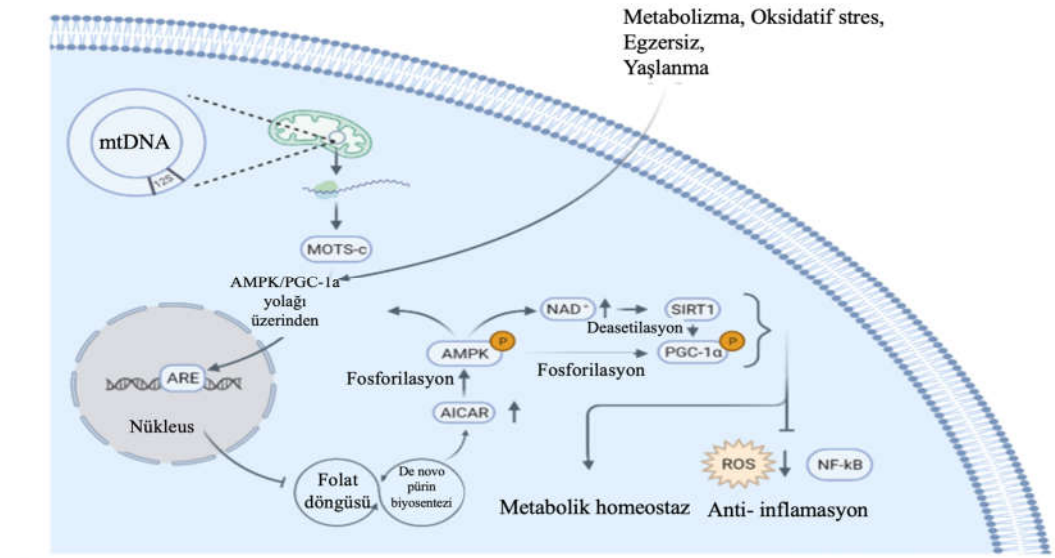
Yapılan çalışmalarda elde edilen verilere göre MOTS-c ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde AMPK yolağının önemli katkısı olduğu düşünülmektedir. MOTS-c'nin mitokondri dışına hareket edebildiği, gen ekspresyonuna önemli ölçüde etki edebildiği ve bu nedenle de çekirdeğe doğru ilerleme gösterebildiği ortaya konmuştur. Bu da MOTS-c' nin sadece metabolik streste değil glikoz kısıtlaması ile ilgili nükleer genleri de düzenleyebildiğini göstermiştir (49).



Şekil 14.MOTS-c' nin Çekirdek ve Mitokondrideki Etkileri (49)

2.3.4.MOTS-c' nin Mekanizması

Mitokondriyal DNA'nın 12S rRNA'sındaki kısa açık okuma çerçevesi, mitokondride mRNA'yı kopyalar bununla birlikte mRNA, MTOS-c' yi çevirmek amacıyla sitoplazmaya doğru hareket eder. MOTS-c, çekirdeğe doğru tetiklenerek yer değiştirir bunun sonucu olarak genlerin antioksidan tepki elemanları (ARE) ve stres adaptasyonu ile ilişkili ifadeler düzenlenir. MOTS-c AICAR' da bir artışa yol açabildiği gibi AMPK, SIRT1 ve PGC-la' yı (Fosforilasyon ve deasetilasyon) aktive ederek enerji homeostazını düzenleyebilir ve anti-enflamatuvar etkiler üretebilir (9). Mitokondriyal enerji dengesini sağlamada önemli rol oynar. Karaciğerde yağ asidi metabolizmasını, metabolik esnekliği ve homeostazı düzenler.



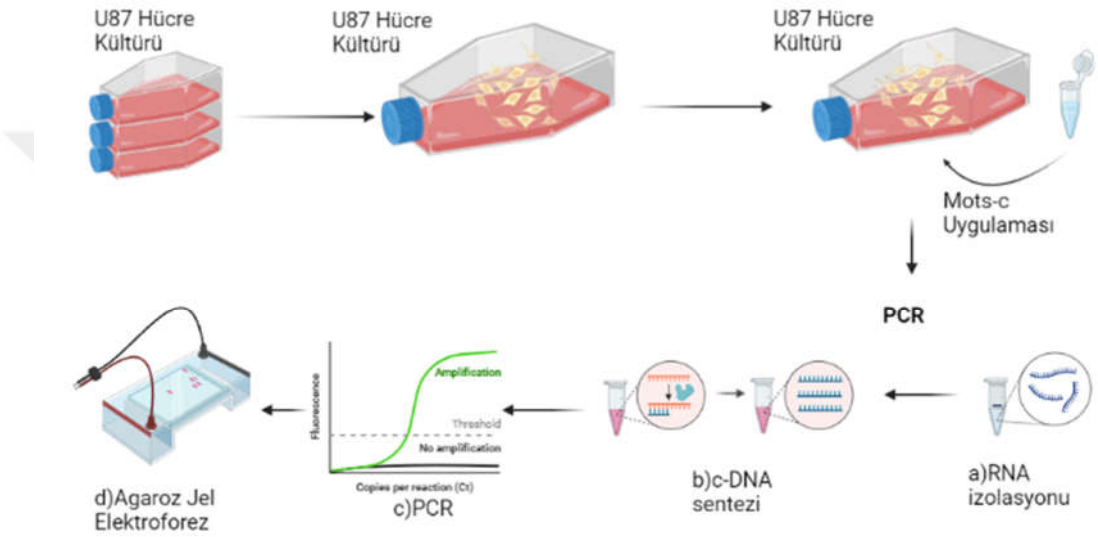
Şekil 15.MOTS-c'nin Mekanizması ve İşlevi (9)

2.4.MOTS-c ve Kanser

Kanser türlerinde, nokta mutasyonları ve mtDNA kopya sayısı değişiklikleri gibi birçok farklı mtDNA değişiklikleri tanımlanmıştır. Mutasyona maruz kalmış mtDNA kanserlerde tespit edilebilmesinden dolayı moleküler teşhis belirteci olarak önemli bir yere sahiptir. Farklı kanser türlerinde mtDNA kopya sayısı farklılık gösterebilir ve bu farklılık dokuya özgü olabilir. Glioma, endometriyal adenokarsinom, lenfoma gibi kanserlerde mtDNA kopya sayısının artış gösterdiği bilinmektedir. MtDNA'nın protein kodlama bölgesindeki somatik mutasyonların homoplazmik olması nedeni ile tümör oluşumu sırasında mitokondri kusurlarına yol açabileceği ve mutasyona uğramış mtDNA içeren tümör hücresini baskın hale getirebileceği gösterilmiştir. Mitokondri türevli moleküller, kanserin ilerlemesi ve gelişmesi için mitokondriyal retrograd sinyal üretebilir. Bu sinyaller hücrelerde homeostazın düzenlenmesini ve hücreleri çevresel streslere karşı korunmasını sağlayabilmektedir. Humanin ve MOTS-c gibi mitokondri türevi moleküllerin de retrograd sinyal yolağına dahil olduğu bilinmektedir. Metabolik bozukluk ve yeniden şekillenme, kanser hücrelerinin tipik özelliklerindendir. Mitokondriyal türevli peptitler ve metabolik düzenlemenin kanser oluşumu ve progresyonundaki etkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Mitokondriyal disfonksiyon, AMPK yolu aracılığıyla aşağı doğru düzenleme yapabilir

bu da MOTS-c ile kanser ilerlemesi arasında bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM



Şekil 16.Yöntemin Şematize Edilerek Özetlenmesi. (BioRender ile yapılmıştır)

3.1.Araştırmanın Tipi

Deneysel, kontrollü bir araştırma yapılmıştır.

3.2.Araştırmanın Yapıldığı Merkez

Projemizin hücre kültürü ve moleküler genetik kısımları Dokuz Eylül Üniversitenin moleküler biyoloji ve genetik ile hücre kültürü laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.3.Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu çalışma Glioblastoma (U-87 MG) hücre hattı üzerinde çalışılacaktır.

3.4.Çalışma Materyali

Bu çalışmada yer alan Glioblastoma hücresi U-87 MG ATCC'den temin edilmiştir.

3.5.Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken, BCL-2, BAX ve GAPDH gen ifadeleri

Bağımsız değişken; Mitokondriyal Türevli Peptit (MOTS-c) olarak kabul edilmiştir.

3.6.Veri Toplama Araçları

3.6.1.Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar, sarf malzemeler, diğer malzemeler markalarıyla aşağıda belirtilmiştir

3.6.1.1.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Laminar Akışlı Biyogüvenlik Kabini	Nuve
Karbondioksit İnkübatör	Nuve
Otomatik Pipet Seti	Eppendorf
Su Banyosu	Clifton
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Rotanta 460R
Jel Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourm

Neubauer Lamı	Isolab
4°C Buzdolabı	Beko
-20°C Derin Dondurucu	Beko
-80°C Derin Dondurucu	Hettich Freezer
Jel Elektroforez Tankı	Thermo
Mikro Santrifüj	Eppendorf
Hassas Elektronik Tartı	Precisa 205 A SCS
Mikrodalga Fırın	Samsung
Vorteks	Labnet
RT-Qpcr Cihazı	LightCycler480 RT-Qpcr cihazı
Faz-Kontrast Mikroskop	Olympus CK X 41
Mikroplate Okuyucu	Multiscan

3.6.1.2.Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları

Tablo 2.Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları

Penisilin/Streptomisin	Gibco™
Tripsin	Gibco™, Trypsin-Edta (0.25%), Phenol Red
Dmem- Dulbecco's Modified Eagle Medium	Sigma-Aldrich
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco™,
Filtre Kapaklı Hücre Kültürü Flaskları	25cm^2 -75 Cm^2, Cellstar
Dmso (Dimetil Sülfoksit)	Sigma-Aldrich
Pbs (Dpbs W/O: Ca And Mg)	Gibco™,
AGAROZ	Prona Agarose Biomax
TBE 10X	AppliChem Panreac
Etidyum Bromür	Sigma-Aldrich
96, 6 Kuyulu Plakalar	Thermo
Serolojik Pipet 5 Ml,10 Ml ve 25 Ml	Isolab
15 Ml'lik ve 50 Ml'lik Santrifüj Tüpleri	Isolab
Kryojenik Vial	Tarsons 523021
PCR Tüpü	Isolab

Cdna Sentez Kiti	ProtoScript First Strand cDNA Sentez Kiti
Rna İzolasyon Kiti	Bio Basic
Rt-qPCR Kiti	Roche
Cell Proliferation KİT	Roche
MOTS-c	GenScript
Hücre Kazıyıcı	Nunc™ Cell Scrapers- Thermo Fisher

3.6.2.Kullanılan Metotlar

Laboratuvar çalışmalarının birçok alanında ve kanser araştırmalarında hücre hatlarının kullanıldığını bilmekteyiz. Hücre hatları Birçok kanser araştırması için önemli yer tutmaktadır. Klonlama çalışmaları sırasında hücre kültürü için ticari bir firmadan hazır halde alınmış olan U87 (GBM) hücre hattı kullanılmıştır.

Çalışmamız MOTS-c 'nin U87 hücre hattına uygulanması sonucunda hücrelerin canlılığının tayin edilmesi ve anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin ekspresyon seviyelerine etkisinin incelenmesi aşamalarından oluşmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarının sonunda tripan blue ile boyama yapılacak ardından Neubauer lamında hücre sayımı yapılmıştır. İncelenen genlerin m-RNA ekspresyon seviyesi ise RT-qPCR cihazında Sybr Green deteksiyonu ile ct değeri belirlenmiştir.

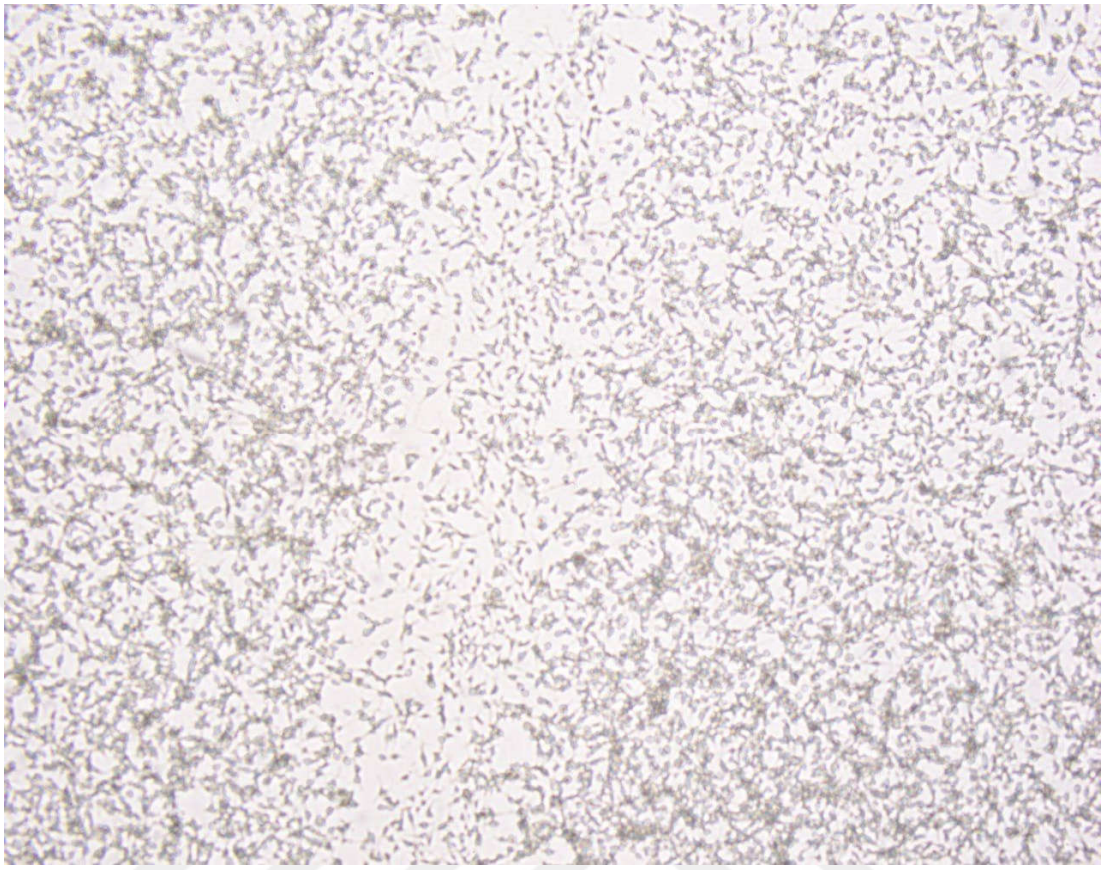
3.6.2.1. Hücre Hattının Çözdürülmesi, Uygun Ortam Koşullarında İnkübe Edilmesi

Uygun temizlik ve güvenlik önlemleri alınmış kabin hava akşının sabitlenmesi için yaklaşık 15 dk öncesinde çalıştırıldı. Kabin içi %70'lik etil alkol ile silindikten sonra Malzemelerin kabinin hava akışını bozmayacak ve çalışmak için boş alan kalacak şekilde yerleştirilmesine dikkat edilerek gerekli malzemeler de yüzeyleri temizlenip kabin içine alındı. -80 ºC'deki kriyotüpler 37 ºC'deki sıcak su banyosuna bırakıldı. Çözdürme işleminin hücrelere zarar vermemesi için hızlı yapılmasına dikkat edilerek

yaklaşık olarak 5 dk beklendi. Çözünen tüpler kabin içine alınarak DMSO'nun toksik etkisinin önlenmesi için 15 ml'lik falkon tüpe 1 ml hücre ve 9 ml 37 ºC sıcaklıkta besi ortamı eklendi. Hücreler falkon tüpe eklendikten sonra birkaç kez çek bırak yapılarak homojenize edildi. Ardından 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra hücreler dipte biriktiği için süpernatant atılıp üzerlerine 500 ul besin ortamı eklendi. Çek bırak yapılarak dipteki hücreler kaldırıldı ve Ardından tüm içerik alınarak 5 ml ortam içeren flaska yazılı yüzeyi çalışan kişiye bakacak şekilde yatay vaziyetteyken eklendi. Flask sağa sola birkaç kez eğilerek hücrelerin yüzeye yayılması sağlandı. Hücrelerin ne durumda olduğu, işlemin başarılı olup olmadığının kontrolü için mikroskopta flask gözlemlendi. Ardından 37 ºC'de %5 CO_2'li inkübatöre bırakıldı.



Şekil 17.U87 MG Hücre Hattının İnkübasyonunda Kullanılan CO2 İnkübatör

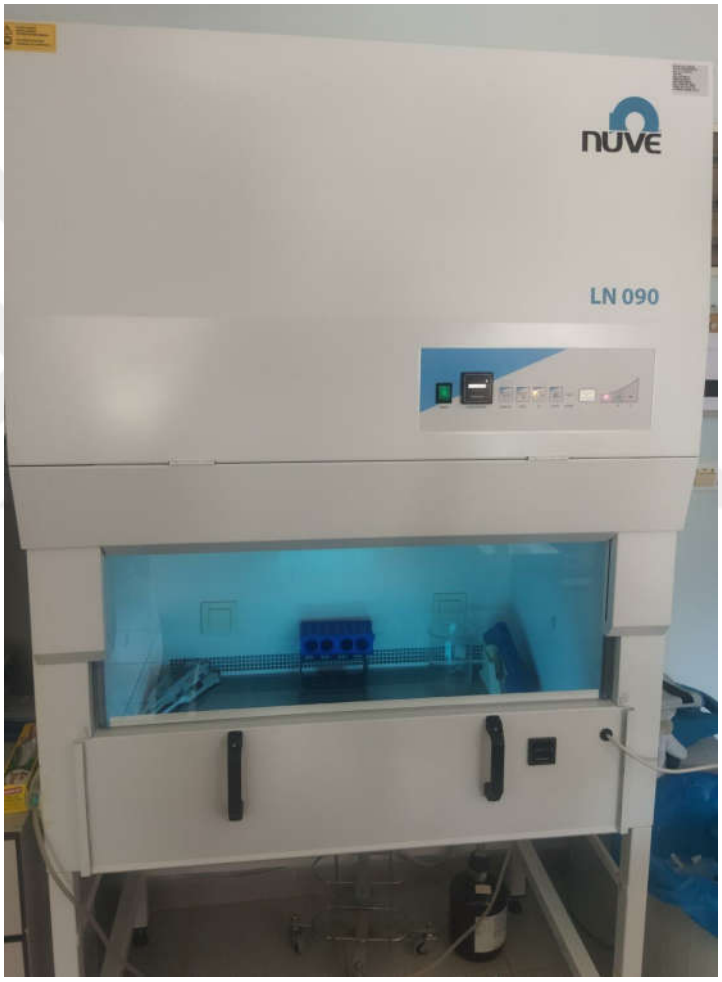


Şekil 18.U87 Hücre Hattının Mikroskop Altındaki Görüntüsü

3.6.2.2.Pasajlama

Pasajlama işlemi şu şekilde gerçekleştirildi. İnkübatördeki flasklar mikroskopta gözlendikten sonra konfluensi oranı belirlendi. Substratın %70'inin dolduğu görülünce pasaj işlemi yapılması kararlaştırıldı. Flask kabin içine alındı kullanılacak malzemeler ve flaskın kapağı gevşetildi. Flask içindeki ortam pipet yardımıyla toplandıktan sonra atık kabına atıldı. Her flask için ayrı pipet kullanıldı.1 ml PBS flaskın yazılı yüzeyine bırakılarak hücrelerin tutunduğu yüzey yıkandıktan sonra pipetle flasktaki sıvı toplanıp atıldı. Ardından flaska 1 ml tripsin enzimi eklenerek flask yüzeyinde iyice gezdirildikten sonra 37 ºC'de 2 dk bekletildi. Tripsin hücrelerin yüzey bağlantılarını koparark yüzeyden kalkmalarını sağlayan bir enzimdir. Optimum çalışma sıcaklığı 37 º C olduğu için bu derecede bekletilmesi uygundur. Çok uzun süre bekletildiğinde hücrelerin yüzeylerini tıraşladığı için 2 dk yeterli olmaktadır. 2 dk sonunda inkübatörden alınan flask mikroskopta gözlemlendi ve hücrelerin yuvarlak ve

yüzeyden ayrılmış olduğu görüldü. Kabine alınan flaska tripsini inaktive etmesi için 2 katı miktarda besin ortamı eklenerek Çek bırak yapıldı ve hücrelerin tutunduğu yüzey yıkandı. Hücrelerin doubling time süreleri göz önüne alınarak 1:6 oranında seyreltme yapılması uygun görüldü. Yeni flaska alınan hücrelerin üzerine 5 ml besin ortamı eklendikten sonra flask yüzeyindeki pasaj numarası bir artırıldı ve inkübatöre kaldırıldı.



Şekil 19.U87 GM Hücrelerinin Deney Uygulamalarının Yapıldığı Laminer Kabin

3.6.2.3.Hücre Hattının Dondurulması

U87 hücrelerinin bulunduğu T25 flasktan pipet yardımı tüm besiyeri toplandı.

T25 flask yüzeyi 1ml PBS ile yıkandı. PBS çekildikten sonra 1ml Tripsin flaska eklendi. Yaklaşık 5 dakika inkübasyona kaldırıldı. Hücreler mikroskop altında gözlemlendi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması ile 3 ml DMEM besi yeri flaska eklendi. Daha sonra pipet yardımı ile flask içindeki sıvı 15'lik falkona alınarak 5 dk 1200 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant (sıvı kısım) pipet yardımı ile atılarak pellet (katı kısım) 1ml Dondurma ortamı ile pipetaj yapılarak homojenize edildi. 1,5 ml'lik kriyovial tüpe aktarıldı. 2 saat -20 ºC'de bırakıldıktan sonra -80 ºC' e kaldırıldı.

3.6.2.4.MOTS-c'nin U87 GM Hücre Hattında Sitotoksik Etkisinin Araştırılması

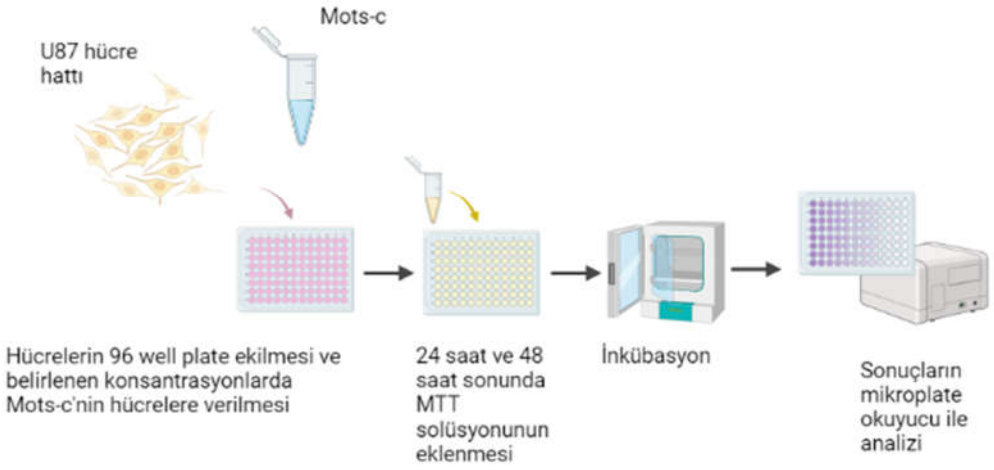
Yapılan literatür araştırmaları sonucunda ilk olarak 1,25 µM ,2,5 µM ve 5 µM olarak MTT deneyleri yapıldı. Daha sonra MOTS-c için konsantrasyonların 10 µM, 20 µM, 40 µM uygulanması ve uygun deney setinin kurulması planlandı. MOTS-c çözücüsü olarak saf su kullanıldı.Ticari olarak alınan MOTS-c -20 ºC'de saklandı



Şekil 20.Ticari Olarak Satın Alınan MOTS-c

3.6.2.5.Sitotoksisite Deneyi

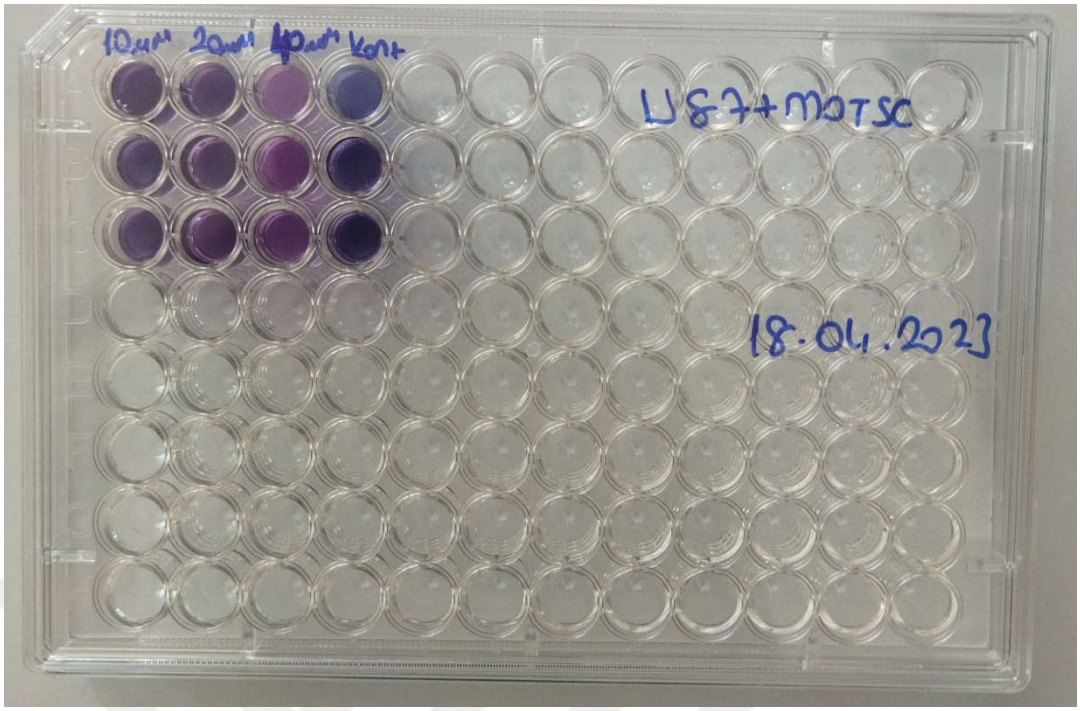
GBM (U-87 MG) hücresi, yeterli sayıda hücre elde etmek için DMEM (Zenginleştirilmiş) %5 CO_2 inkübatöründe 37 ºC'de 25 cm^2 'lik flasklarda kültürlendi. Ardından hücre hattından her bir kuyucuğa 1x104 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekim yapıldı ve 37ºC, %5' lik CO_2' li nemli ortamda hücreler 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün hücrelere, belirlenen konsantrasyon ve düzende MOTS-c (10 µM, 20 µM 40 µM) eklendi. %5 CO_2 içeren nemli bir atmosferde 37 °C' de 24 ve 48 saat inkübe edildi. MTT tahlili, tedavilerden 24 ve 48 saat sonra yapıldı. Her kuyucuğa 10 µl 5 mg/ml MTT solüsyonu ilave edildi ve hücreler, %5 CO_2 içeren nemli bir atmosferde 37 °C' de 3 saat inkübe edildi. 3 saat sonra ortam, 100 µl DMSO ile değiştirildi.



Şekil 21.MTT Aşamalarının Şematik Gösterimi. (BioRender ile yapılmıştır)



Şekil 22. U87 MG Hücrelerinin 96 kuyulu plaka Düzenine Ekimi ve MTT Görüntüleri (24 ve 48 saat)



Şekil 23.U87 MG Hücrelerinin 96 kuyulu plaka Düzenine Ekimi ve MTT Görüntüleri (24 ve 48 saat)

3.6.2.6.Hücre Canlılığının Belirlenmesi

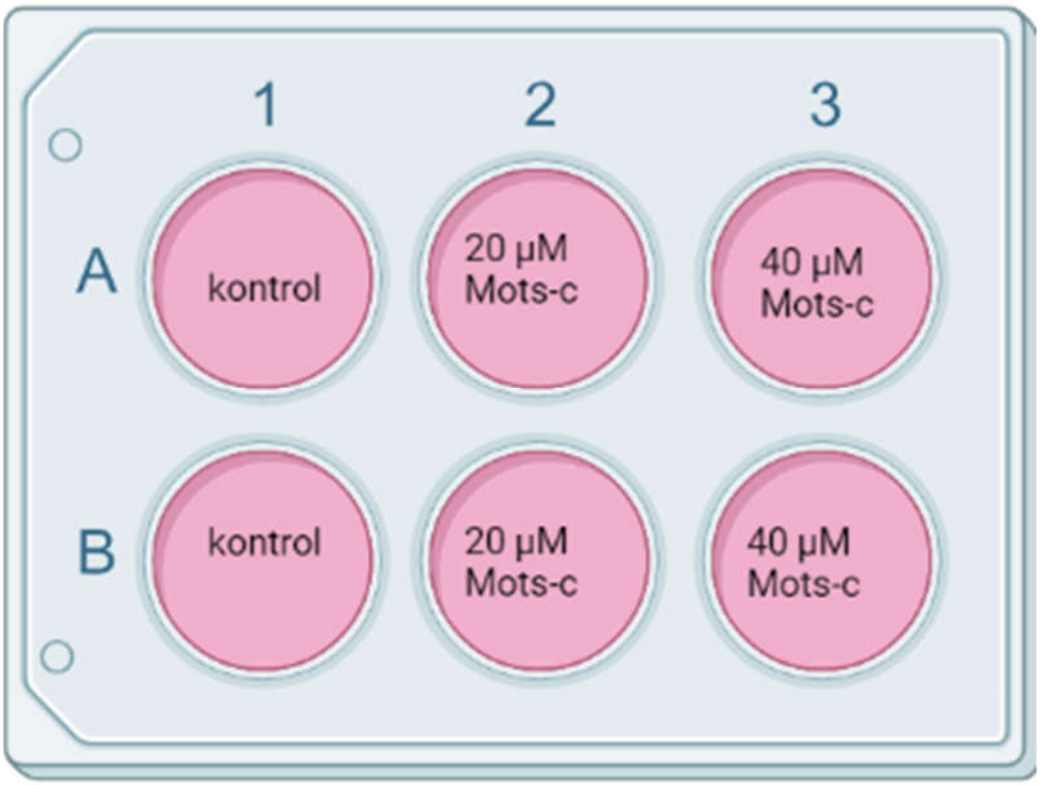
Neubauer Lamı ile hücre canlılığının belirlenmesi için şu işlemler yapılmıştır;
Hücre süspansiyonu 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 1 ml kültür vasatı ile homojenize edildi. Bir kısım 0.4 tripan mavisi ile bir kısım hücre süspansiyonu karıştırılarak, oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. Bir damla tripan mavisi-hücre karışımı Neubauer sayma lamına konarak, mikroskopta incelendi. Boyanmamış ve boyalı hücreler sayılarak hücre sayısı ve canlılığı hesaplandı.

3.6.2.7.In Vitro Kanser Hücrelerine MOTS-c Alımı

Optimum konsantrasyon belirlendi ve buna göre hücrelere uygulanacak konsantrasyonlar sıralandı. Hücreler 24 saat FBS içermeyen besin ortamında inkübe edilerek aynı hücre döngüsü evresinde sabitlenmesi sağlandı. Ardından hücreler 6 kuyulu plakalara bölünüp; bunlardan dördüne farklı konsantrasyonlarda MOTS-c denemesi yapıldı. Farklı konsantrasyonlar MTT testine tabii tutularak belirlendi.

Diğer flasklar saf alkolün hücrelere toksik etkisi göz önünde bulundurularak negatif kontrol olarak deneylere dahil edildi. Neubauer Lamı ile hücre canlılığı tekrar test edildi.

3.6.2.8. MOTS-c'nin Apoptoz ilişkili genlerde mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması (RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Kantitatif Real-Time PCR)



Şekil 24.Gerçek Zamanlı PCR İçin Hazırlanan Deney Düzenekleri. (BioRender ile yapılmıştır)

Hücre kültüründen RNA izolasyonunu gerçekleştirmek için satın alınan ticari kitin (BioBasic RNA İzolasyon kiti) protokolüne uygun şekilde işlemler gerçekleştirildi. Buna göre aşağıdaki basamaklar izlendi. 6 kuyulu plakalarda bulunan hücreler kontrol edildi. Hücre yoğunluğu belirlendi. Daha sonra besiyerleri tek tek uzaklaştırıldı ve 1 ml PBS ile plaka yüzeyleri yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücre kazıyıcı ile yavaşça hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılması sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine 3 ml DMEM besi yeri eklenerek iyice pipetlendi. Pipetaj sonrası her bir örnek ayrı ayrı 15'lik falkonlara alındı.

5 dk 1200 rmp de santrifüj edildi. . Santrifüj sonrası süpernatant (sıvı kısım) atıldı. Her bir örnek için 350 µl RLT solüsyonu pelet üzerine eklendi. Homojenize olana kadar pipetaj işlemine devam edildi. Her bir örnek içim %70 'lik soğuk Ethanol eklenerek pipetaj yapıldı. EZ-10 Spin kolon 2.0 ml 'lik 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Elde edilen lizat kolon içine pipet yardımı ile eklendi. 1 dakika 6,000 x g santrifüj edildi. Santrifüj sonrası eppendorf biriken sıvı kısım atıldı ve her bir örnek için EZ-10 kolon içerisine RW solüsyonundan 500 µl eklendi 1 dakika 6,000 x g santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 1,5 ml mikro santrifüj tüpünde biriken sıvı kısım atıldı 500 µl RPE solüsyonu he örnek için kolon içine eklendi. 1 dakika 6,000 x g santrifüj tekrarlandı. EZ-10 kolon 1,5 ml'lik 1,5 ml mikrosantrifüj tüpe alındı ve kolonun orta kısmına 50 µl RNaz içermeyen su eklendi. 5 ° C de 2 dakika inkübe edildi. Daha sonra 1 dakika 8,000 x g 'de santrifüj edildi. Elde edilen RNA' ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle (nanodrop) belirlendi.

Alınan hücre kültürü örneklerinden elde edilen total RNA'lar Poli A kuyruğu ekleme reaksiyonu kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Yaklaşık 0.5-1 µg cDNA sentezi, 'ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit' ile üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde yapıldı.

Kit Bileşenleri Tablo da belirtilen oranlara uygun olarak karıştırıldı. Elde edilen karışım pipetaj sonrası spinlendi. Reaksiyon ilk olarak 5 dakika 25 °C' de inkübe edildi. Ardından 60 dakika 42°C'de inkübe edildi ardından reaksiyon 5 dakika 80 °C'de inkübe edildi. -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.cDNA Sentez Kiti Bileşenleri

Total RNA	4 µl
Tampon Karışımı (d(T)23, VN (50 µM))	2 µl
PCR Dereceli Su	2 µl
Total Hacim	8 µl

M-MuLV karışımı (2x)	10 µl
M-MuLV enzim karışımı (10 X)	2 µl

Projemizde anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin ekspresyon seviyelerinin saptanması için Gerçek Zamanlı PCR yöntemi (LightCycler480 RT-qpcr cihazı ile) kullanıldı. Primerler firma tarafından Tablo 4'te sekansları belirtildiği şekilde sentezlendikten ve HPLC yöntemiyle saflaştırıldıktan sonra liyofilize halde satın alındı. Liyofilize halde gelen primerlere gerekli hesaplamalar sonucunda son konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde; DNAse ve RNAse içermeyen steril distile su eklendi. Primer stokları alikotlandıktan sonra Gerçek Zamanlı PCR çalışmasında kullanılmak üzere distile su ile 1:10 oranında seyreltildi.

Tablo 4.Tasarlanan Primer Dizileri

GAPDH	Forward	5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	Reverse	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'
BAX	Forward	5'-AAGAAGCTGAGCGAGT-3'
	Reverse	5'-GCCCATGATGGTTCTG-3'
BCL-2	Forward	5'-TCAGGCTGCTTGGGATAAAGATG-3'
	Reverse	5'-GGCTTCTGGAGGACATTTGGA-3'

Gerçek Zamanlı PCR reaksiyonu hazırlanırken bütün işlemler soğuk blok üzerinde yapıldı. Saflığı ve miktarı belirlenen total RNA'nın RT-q PCR reaksiyonunda hedef genler BAX ve BCL-2 genleri ve hedef genlerin ifade profilinin normalizasyonunda Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz GAPDH referans gen (housekeeping gen) olarak kullanıldı. PCR tüpleri cihaza (LightCycler480 RT-Qpcr) yerleştirildikten sonra RT-q PCR program bilgileri bilgisayarda yazıldı. Hedef genlerin Ct değerleri ile referans GAPDH geninin Ct değerinin karşılaştırılması için gerekli hesaplamalar yapıldı. Her gen 3 tekrarlı şekilde çalışıldı. Bağımsız olarak deneyler üç kez tekrar edildi. Veriler Gerçek Zamanlı PCR analizi sonunda Ct verilerine göre ΔCt ve ΔΔCt formülü ile hesaplandı ve kat sayıları değerlendirildi.

Tablo 5.Real Time PCR İşlemlerinde Kullanılan Malzemeler ve Miktarları

Bileşen	**Hacim (µL)**	**Konsantrasyon**
Kalıp cDNA	**2**	**20- 100 ng /µL**
PCR Primer Karışımı	**0.8**	**Her birinden 0.2 µM**
H_2O	**7.2**	
Hibrigen RT-qPCR Mix SYBR Green	**10**	**2x**
Toplam Hacim	**20**	

PCR karışımı; 2 µL kalıp cDNA, 0,8 µL primer karışımı ve 10 µL Sybr Green Master Mix içermektedir. PCR programı ve erime eğrisi analizi parametreleri optimize edildikten sonra primer bağlanma sıcaklığı 58 ºC olarak belirlendi.

Tablo 6.Gerçek Zamanlı PCR ısıl koşul tablosu

Program	**Siklus**	**Analiz Modu**	**Zaman ve Sıcaklık**	**Okuma Modu**
Başlangıç Denatürasyonu	1	Yok	95 ºC – 5 dk (20 ºC/s)	Yok
Amplifikasyon	40	Kantitasyon	95 ºC – 20 sn (20 ºC/s) 58 ºC – 30 sn (20 ºC/s) 72 ºC – 45 sn (20 ºC/s)	Yok Tek Yok
Son Uzama	1	Yok	72 ºC – 10 dk (20 ºC/s)	Yok
Soğuma	1	Yok	4 ºC	Yok

.

3.7.Araştırma Planı

Tablo 7:Araştırma Planı

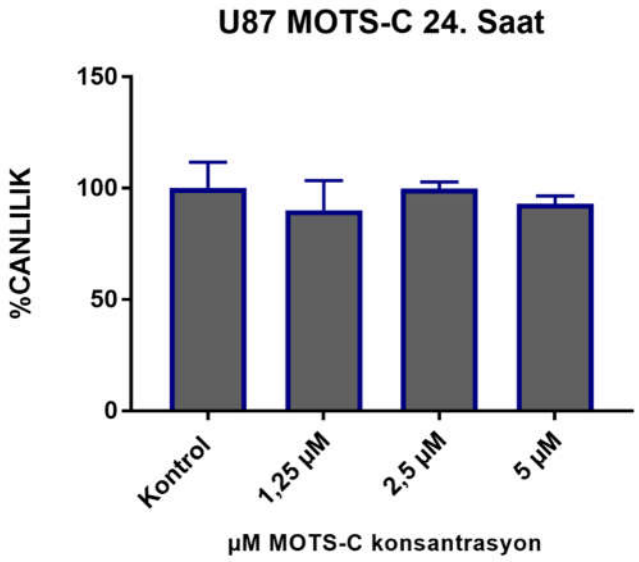
İş Tanımı	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos
Literatür İncelemesi	X	x	X	x	x	x
Sarf malzemelerin alınması ve Hücre Kültürü Deney Setinin Kurulması	X	x				
U-87 MG hücrelerinin belirli konsantrasyonlardaki MOTS-c ile stimülasyonu ve Hücre proliferasyon deneylerinin yapılması		x	X			
Hücre canlılığının Belirlenmesi			X	x		
RT-qPCR ile Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi				x	x	
Veri Analizi ve Rapor Yazımı					x	x

4.BULGULAR

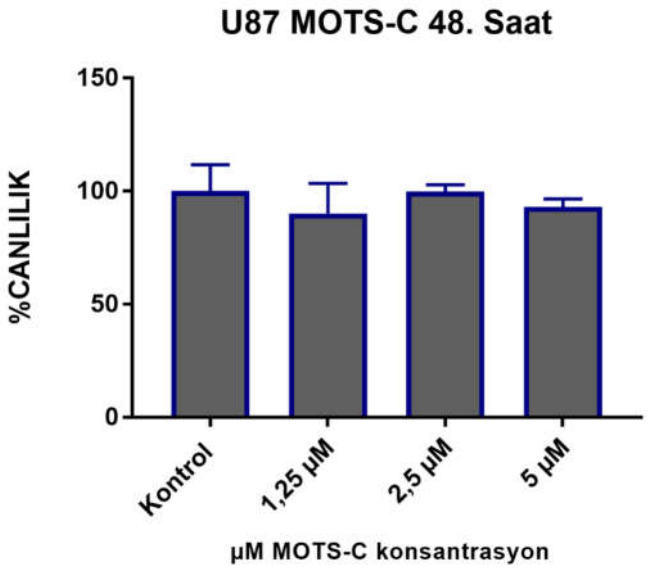
4.1.MTT Sitotoksisite Deney Bulguları

Çalışmamızda MOTS-c ve kontrol gruplarının U87 GBM hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. 96 kuyulu plakalara ekimi yapılan U87 hücre hattına MOTS-c (İlk uygulanan doz konsantrasyonları; 1,25 µM, 2.5 µM, 5 µM), İkinci uygulanan doz konsantrasyonları; 10 µM, 20 µM ve 40 µM ve kontrol gruplarının U87 MG hücre hattı üzerindeki etkisini saptamak için belirtilen konsantrasyonlarda uygulamalar yapıldı. Doz uygulamaları üç tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. MTT sonuçları ile elde edilen veriler Graphpad Prism 9.3 yazılımı aracılığıyla hücre canlılığını gösteren grafikler ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar 3 bağımsız deneyin standart sapma ortalaması ile açıklandı. Hücrelerin canlılık değerinin istatiksel anlamlılığı Graphpad Prism 9.3 yazılımında Student t-testi kullanılarak belirlendi (53, 54).

4.1.1.U-87 MG Hücre Hattının MTT Deney Sonuçları

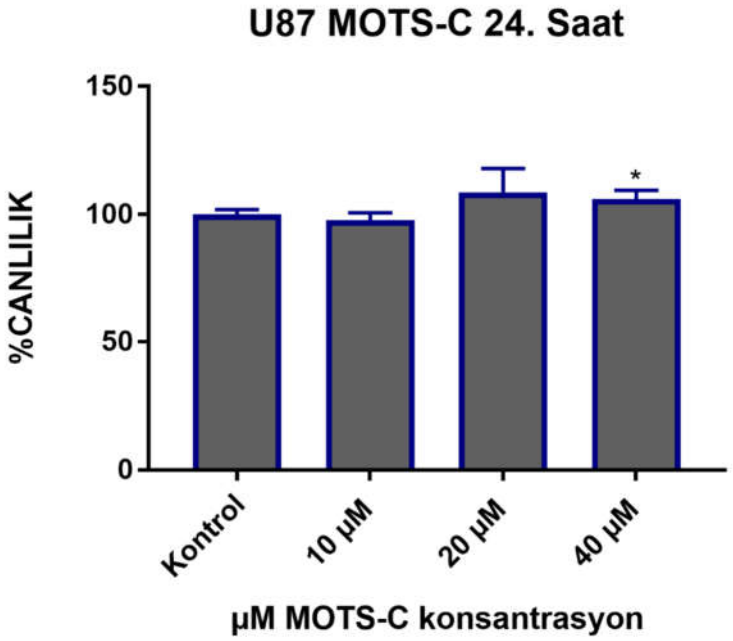


Şekil 25.Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 24. saat sonraki U87 MG % Canlılığı. Sonuçlar, kontrol yüzdesi olarak sunuldu.; Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi



Şekil 26.Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 48. saat sonraki U87 MG % Canlılığı. Sonuçlar, kontrol yüzdesi olarak sunuldu.; Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi.

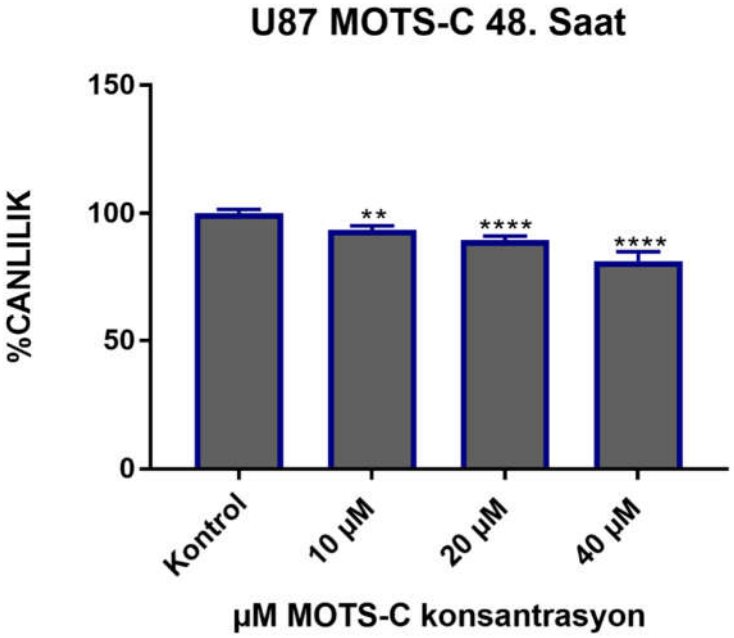
24 ve 48. Saat 1,25 µM ,2,5 µM ve 5 µM MOTS-c doz uygulamalarında anlamlı bir sitotoksik etki görülmemiştir.



Şekil 27.Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 24. Saat sonraki U87 MG % Canlılığı. Sonuçlar, kontrol yüzdesi olarak sunuldu.; * p <0.05, vs. kontrol; Tüm istatistiksel

analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi.

MTT sonuçlarına göre 10 µM ve 20 µM da anlamlı bir değişiklik saptanmamışken 40 µM da kontrole oranla anlamlı bir proliferasyon gözlemlenmiştir.40 µM da 24. Saatte canlılık %106,097 (±3.3375) olarak görülmüştür.



Şekil 28.Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 48. Saat sonraki U87 MG % Canlılığı. Sonuçlar, kontrol yüzdesi olarak sunuldu.; Kontrol gruplarına ** p <;0.01, **** p <0,0001 vs. kontrol. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ±standart sapma (n = 3) gösterildi.

MTT sonuçlarına göre 10 µM ,20 µM ve 40 µM da kontrole oranla anlamlı bir azalış gözlemlenmiştir. 48. Saatte canlılık 10 µM da %93.573 (±1.663); 20 µM da canlılık %89.562 (±1.626); 40 µM da canlılık %81.445 (±3.595) olarak görülmüştür. MOTS-c uygulamaları kontrole kıyasla hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttı.

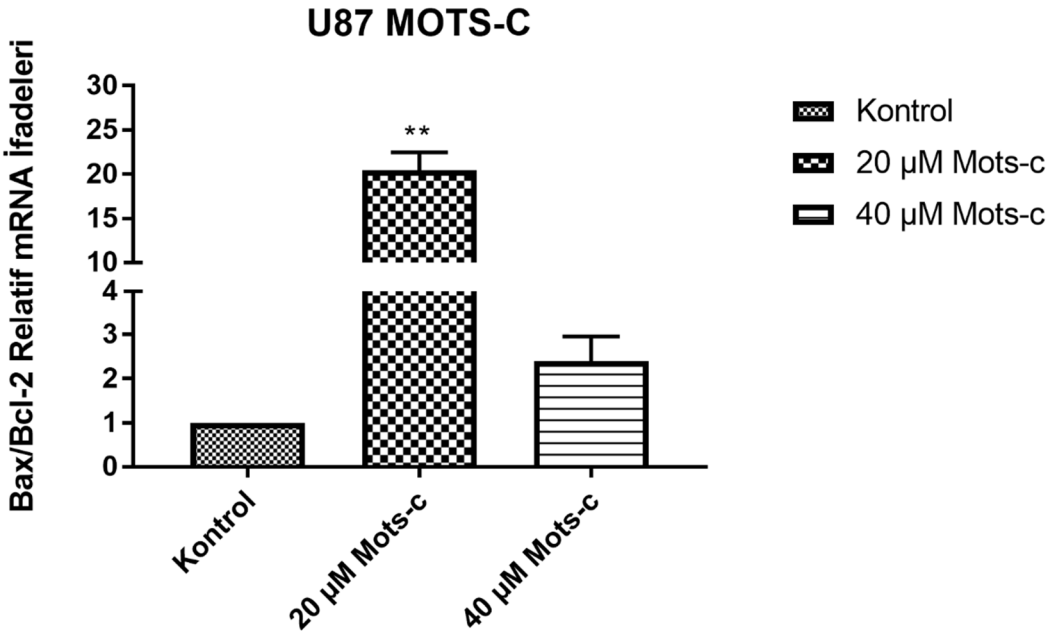
MTT sonuçları U87 MG hücrelerinde MOTS-c uygulaması 48. Saatte doza ve zamana bağlı olarak sitotoksisitesinin arttığını gösterdi. MOTS-c uygulamasının 24. Saatinde ve 48. Saatte hücrelerin canlılığı üzerindeki etkileri şekil 27 ve şekil 28 de gösterilmiştir.

4.2.Gerçek Zamanlı PCR Analiz Sonuçlar

4.2.1.MOTS-c tedavisinin Apoptoz ilişkili genlerde mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması

.

MOTS-c muamelesi sonucu ortaya çıkan hücre ölümünün apoptoz aracılı olup olmadığını göstermek amacıyla BCL-2 ve BAX gen ifadelerini de belirlemeyi amaçladık.



Şekil 29:Kontrol ve MOTS-c grup dozları ile 48. Saat sonraki U87 hücre serisi üzerinde anti-apoptotik (BCL-2) ve pro-apoptotik (BAX) genlerinin RT-PCR analizi ** p <0.01 vs. kontrol; Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n=3) gösterildi.

Yapılan çalışmalar sonucu gen ifadelerinde meydana gelen değişimler m-RNA düzeyinde belirlendi. Elde edilen sonuçlar MOTS-c peptidinin U87 hücre hattına uygulamasının apoptotik süreçte görev alan BAX ve BCL-2 genlerine ait mRNA gruplarına 20 μM ‘da 40 μM’ a göre 20 kat daha yüksek BAX/BCL-2 oran değişimi olduğunu göstermiştir. Ancak 40 μM ‘da kontrol grubuna kıyasla BAX/ BCL-2 oranında artış gözlemlenmesine rağmen bu artış istatiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

5.TARTIŞMA

Gliomalar en sık görülen malign primer tümörler olmalarının yanı sıra oldukça agresiftir ve tedavisi her yönden komplekstir. Glioblastoma Multiform (GBM) insidansı 100.000 kişide 0.59-5 arasında değişiklik göstermektedir. İlerleyen yaşlarda teşhis edilebilir ortalama tanı yaşı 64 olarak belirlenmiştir. GBM' li hastalara sunulan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi tedavi seçenekleri olsa da ortalama sağkalım bir yıl gibi az bir süre olarak hesaplanmıştır. Sağkalıma dahil olan prognostik faktörler arasında yaş, belirteçler gibi faktörler yer almaktadır. Hastalık ile ilgili henüz tam tedavi mümkün değildir (55,56). Yakın zamanda keşfedilen Mitokondriyal Türevli Peptitler (MDP) mitokondriyal DNA tarafından kodlanan, hücre metabolizmasına etki eden pleiotropik özelliklere sahip polipeptit sınıfıdır ve kanser dahil birçok hastalıkta umut ışığı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda MDP'lerin Mitokondriyal iletişim ve enerji dengesinin korunmasında rol oynayan bir hormon olduğu ortaya konmuştur. Tanımlanmış olan MDP'lerin diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve prostat kanseri dahil olmak üzere hastalık patolojisi üzerinde hafifletici etkilerinin de olduğu göstermiştir. Mitokondriyal Türevli Peptitler yakın zamanda literatüre kazandırılmıştır bu nedenle hastalıklar ve genetik varyasyonlar üzerindeki etkileri pek araştırılamamıştır fakat Humanin ve MOTS-c de saptanan 2 polimorfizm diyabet ile ilişkilendirilerek hastalık modifikasyonunda rol oynayabilecekleri düşünülmüştür. MOTS-c üzerinde yürütülen çalışmalar genelde obezite üzerine yoğunlaşmış görülse de bu molekülün, gen regülasyonu ve hücresel metabolizma dahil birçok sürece katkı sağlayan AMPK üzerinden hücresel süreçte rol alabileceği de çalışmalara dahil edilmiştir. AMPK' nın metabolik etkisi göz önüne alındığında kanser başta olmak üzere metabolik hastalıklar için terapötik bir ajan olduğu da ortaya konmuştur. Yakın dönemde yapılan bir çalışmada metiyonin döngüsü üzerinde MOTS-c peptidinin etkileri araştırılmıştır bunun sonucunda bu mitokondriyal türevli peptidin metiyonin metabolizmasını azalttığı ve dolayısıyla yaşam süresi, yaş bağımlı hastalıkların görülme sıklığı ve antioksidan molekül seviyelerine pozitif katkı sağladığı görülmüştür. (57,58). MOTS-c'nin AMPK ifadesini uyarımı, metiyonin

döngüsünü inhibe edebiliyor olması bu peptidin kanser tedavi sürecinde etki edebileceğini de düşündürmüştür. Mevcut literatürde Mitokondriyal Türevli Peptit olan MOTS-c ve kanser arasındaki ilişkiyi konu alan bir çalışma henüz yer almaktadır. Bu çalışmada, glioblastoma U-87 MG hücre hattının büyümesi üzerine MOTS-c uygulamasının etkisini araştırdık. Çalışmamızın ana fikri, Mitokondriyal Türevli peptit MOTS-c 'nin Glioblastoma hücre hattındaki rolünü aydınlatmaktır. Bu amaç doğrultusunda MOTS-c incelemesi sonrası MTT analizleri yapılarak bu peptidin kanserli hücrede canlılık düzeyine etkisi ortaya kondu. Sonuçlarımız MOTS-c'nin U87 MG hücre hattında sitotoksik etkisini yüksek dozda (20 μM,) ve 48. Saatte geçekleştiğini gösterdi. Sitotoksisite çalışmalarında Düşük doz MOTS-c uygulanan U87 hücrelerinde (1,25 μM, 2,5 μM, 5 μM) Konsantrasyonda hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

Yaptığımız bir diğer sitotoksisite deneyinde U87 hücre hattına 10 μM, 20 μM ve 40 μM konsantrasyonda MOTS-c uygulaması gerçekleştirdik. Analizler sonucu 20 μM MOTS-c 'nin 40 μM MOTS-c ye göre canlılık üzerinde 48. Saatte 20 kat anlamlı bir etki yarattığını gözlemledik. Bu da çalışmamızda kullandığımız MOTS-c'nin doz bağımlı sitotoksisite sağladığını göstermiş oldu. MOTS-c peptidinin apoptotik hücre ölüm sürecine etkilerinin gözlemlenmesi apoptotik süreçler dışındaki ölüm mekanizmalarına da katkı sağlayabileceğini işaret etmektedir. MOTS-c muamelesi sonucu ortaya çıkan hücre ölümünün apoptoz aracılı olup olmadığını göstermek amacıyla BCL-2 ve BAX gen ifadelerini de belirlemeyi amaçladık. Apoptoz, hücresel yaşam ve ölüm arasındaki kararı dengelemek için hem proapoptotik hem de hayatta kalma yanlısı üyeleri içeren BCL-2 protein ailesi tarafından düzenlenen, evrimsel olarak korunmuş bir hücre ölüm yoludur (59). Hücre ölümünde yer alan iki önemli molekül, proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2'dir ve Bax' ın Bcl-2'ye oranı, hücrelerin apoptoz geçirip geçirmeyeceğini belirler. Yürütülen çalışmalar sonucu gen ifadelerinin değişimleri mRNA düzeyinde belirlenmeyle ortaya kondu. Elde ettiğimiz sonuçlar MOTS-c uygulamasının apoptotik süreçte görev alan BAX ve BCL-2 genlerine ait mRNA gruplarına göre anlamlı düzeyde değişmediğini gösterdi. Apoptozun içsel yolağının anahtar düzenleyicisi olan BCL-2 geninde kontrole kıyasla anlamlı ölçüde değişim gözlemlendi.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Glioblastomlar agresif, ölümcül ve tedaviye dirençli birincil beyin tümörleridir. Birçok kanser tedavisi GBM üzerinde kanserin ilerlemesini yavaşlatmak amacıyla kullanılsada farklı birçok nedenden dolayı tedavi genel olarak başarısız olmaktadır ve hala yeni yöntemler araştırılmaktadır. Yakın zamanda literatüre kazandırılmış olan MOTS-c peptidinin başta enerji metabolizması olmak üzere, kardiyovasküler hastalıklar, obezite, kas-iskelet sistemi gibi birçok alanda AMPK yoluyla etki ettiği ortaya konmuştur. AMPK 'nın kanser ve yaşlanma dahil önemli patolojik durumlarda inhibe edilebildiği ve aktivasyonunun tedavi alanlarına pozitif katkı sağlayabileceğini de göstermiştir (60). MOTS-c'nin AMPK üzerindeki etkisi kanser tedavilerine bu peptidin katkı sağlayabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda Glioblastoma (U87 hücre hattı) üzerinde MOTS-c peptidinin sitotoksik etkisini açığa çıkarmayı amaçladık. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda MOTS-c 'nin U87 hücre hattında hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür. GBM tedavisi için MOTS-c 'nin yeni ve potansiyel bir aday olabileceği de gösterilmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda MOTS-c'nin farklı kanser modelleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi bu peptidin kanser tedavilerindeki rolünün ve mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sunacaktır. Sonuçlarımız klinik uygulamalarda MOTS-c'nin Glioblastoma tedavisi üzerinde potansiyel terapötik bir yeri olabileceğini düşündürmektedir.

7.KAYNAKÇA

1. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C,Barnholtz-Sloan JS: CBTRUS statistical report: Primarybrain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015. Neuro Oncol 20: iv1-iv86, 2018

2. Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. Cancer. 2022 Jan;128(1):47–58.

3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011 Mar;144(5):646–74.

4. Mercer TR, Neph S, Dinger ME, Crawford J, Smith MA, Shearwood AM, Haugen E, Bracken CP, Rackham O, Stamatoyannopoulos JA, Filipovska A, Mattick JS. The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 2011, 146(4): 645-58.

5. Adachi Y, De Sousa-Coelho AL, Harata I, Aoun C, Weimer S, Shi X, Gonzalez Herrera KN, Takahashi H, Doherty C, Noguchi Y, Goodyear LJ, Haigis MC, Gerszten RE, Patti M-E. l-Alanine activates hepatic AMP-activated protein kinase and modulates systemic glucose metabolism. *Mol Metab* 2018, 17: 61-70.

6. Kim I, He YY. Targeting the AMP-Activated Protein Kinase for Cancer Prevention and Therapy. *Front Oncol* 2013, 3: 175.

7. Sager RA, Woodford MR, Mollapour M. The mTOR Independent Function of Tsc1 and FNIPs. *Trends Biochem Sci* 2018, 43(12): 935-937.

8. Han F, Li CF, Cai Z, Zhang X, Jin G, Zhang WN, Xu C, Wang CY, Morrow J, Zhang S, Xu D, Wang G, Lin HK. The critical role of AMPK in driving Akt activation under stress, tumorigenesis and drug resistance. *Nat Commun* 2018, 9(1): 4728.

9. Wei Wan, Lieliang Zhang, Yue Lin, Xiuqing Rao, Xifeng Wang, Fuzhou Hua & Jun Ying ‚Journal of Translational Medicine volume ‘Mitochondria-derived peptide MOTS-c: effects and mechanisms related to stress, metabolism and aging’ 2023.

10. What is Cancer? [Internet] 2022 Erişim Adresi: https://oncosmolbiol.com/cancer-care/what-is-cancer/

11. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov. 2022 Jan;12(1):31–46.
12. Mark P Lythgoe, Benjamin Mullish, Adam Enver Frampton, Jonathan Krell: Polymorphic microbes: a new emerging hallmark of cancer, September 2022, DOI: 10.1016/j.tim.2022.08.004
13. McKinney PA. Brain tumours: incidence, survival, and aetiology. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004 Jun;75(suppl_2): ii12–7.
14. Armstrong TS, Cohen MZ, Eriksen LR, Hickey J V. Symptom Clusters in Oncology Patients and Implications for Symptom Research in People with Primary Brain Tumors. J Nurs Scholarsh. 2004 Sep;36(3):197–206.
15. Shirahata M, Mishima K. [Metastatic Brain Tumors]. Brain Nerve. 2021 Jan;73(1):5–11.
16. Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. Cancer. 2022 Jan;128(1):47–58.
17. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK ve ark. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. 2016 Jun;131(6):80320.
18. 2015 Türkiye Kanser istatistikleri. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2018
19. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y ve ark. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. Neuro Oncol. 2013 Nov;15(suppl 2): ii1–56.
20. Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. Clin Transl Oncol. 2016 Nov;18(11):1062–71.
21. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D,ve ark. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme–Literature Review. Cancers (Basel). 2022 May;14(10):2412.
22. Thakkar JP, McCarthy BJ, Villano JL: Age-specific cancer incidence rates increase through the oldest age groups. Am J Med Sci 348:65-70, 2014

23. Otero,José Javier ,Aline Paixao B. Precision Molecular Pathology of Glioblastoma. 1st Editio. Otero JJ, Becker AP, editors. Cham: Springer International Publishing; 2021. (Molecular Pathology Library).
24. Hochberg F, Toniolo P, Cole P. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. J Neurooncol. 1990 Feb;8(1).
25. Ogawa T, Sawada N, Iwasaki M, Budhathoki S, Hidaka A, Yamaji T ve ark. Coffee and green tea consumption in relation to brain tumor risk in a Japanese population. Int J Cancer. 2016 Dec;139(12):2714–21.
26. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS: The epidemiology of glioma in adults: A "state of the science" review. Neuro Oncol 16:896-913, 2014
27. Horbinski C ve ark, The Medical Necessity of advanced molecular testing in the diagnostic and treatment of brain tumor patients Neuro Oncol. 2019 Dec 17; 21(12):1498-1508.)
28. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, ve ark. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. Neuro Oncol 2015; 174:1-62.
29. Y. Shan F, Castro E, Sybenga A, Mukherjee S, Wu E, Fung K ve ark. Molecular Diagnostics and Pathology of Major Brain Tumors. In: Primary Intracranial Tumors. IntechOpen; 2019
30. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, ve ark. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol. 2009 May;10(5):459–66.
31. Burzynski SR, Janicki TJ, Burzynski GS, Marszalek A- Child's Nervous System : ChNS: official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery (2014)
32. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495–516
33. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 2009, 21(6): 871-7.

34. deSouza RM, Shaweis H, Han C, Sivasubramaniam V, Brazil L, Beaney R, Sadler G, Al-Sarraj S, Hampton T, Logan J, Hurwitz V, Bhangoo R, Gullan R, Ashkan K: Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years? Br J Cancer 114:146-150, 2016

35. Jain M V., Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K ve ark. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. J Cell Mol Med. 2013 Jan;17(1):12–29

36. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002, 84(2-3): 203-14.

37. Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, Hertig S, Ambrose C, Tschopp J, Schneider P. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem* 2006, 281(20): 13964-71.

38. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 2019, 43(6): 582-92.

39. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Mar;9(3):231–41.

40. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011, 30: 87.

41. Kim SJ, Xiao J, Wan J, Cohen P, Yen K. Mitochondrially derived es as novel regulators of metabolism. *J Physiol* 2017, 595(21): 6613-21.

42. Mercer TR, Neph S, Dinger ME, Crawford J, Smith MA, Shearwood AM, Haugen E, Bracken CP, Rackham O, Stamatoyannopoulos JA, Filipovska A, Mattick JS. The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 2011, 146(4): 645-58.

43.Uzm.Dr. Filiz KOÇ, Prof.Dr.Yakup SARICA'MİTOKONDRİ BİYOKİMYASI',2003

44. Can Veysel Şoroğlu , Ezgi Gizem Berkay , Burçak Vural.' Mitokondriyal DNA, Anaerkil Kalıtım ve İnsan Mitochondrial DNA, Maternal Inheritance and Human' 2021

45. Lu, H., Tang, S., Xue, C., Liu, Y., Wang, J., Zhang, W., Luo, W., & Chen, J. 2019. "Mitochondrial-Derived Peptide MOTS-c Increases Adipose Thermogenic Activation to Promote Cold Adaptation", International Journal of Molecular Sciences, *20*(10), 2456. DOI:10.3390/ijms20102456

46. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, Kim S-J, Mehta H, Hevener AL, de Cabo R. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 2015, 21(3): 443-54.

47. J M Corton , J G Gillespie, S A Hawley, D G Hardie' 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?',1995

48. Ming, W., Lu, G., Xin, S., Huanyu, L., Yinghao, J., Xiaoying, L., Chengming, X., Banjun, R., Li, W., Zifan, L. 2016. "Mitochondria related peptide MOTS-c suppresses ovariectomy-induced bone loss via AMPK activation", Biochemical and Biophysical Research Communications, 5;476(4):412-419. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05.135.

49. Kim KH, Son JM, Benayoun BA, Lee C. The Mitochondrial-Encoded Peptide MOTS-c Translocates to the Nucleus to Regulate Nuclear Gene Expression in Response to Metabolic Stress. *Cell Metab* 2018, 28(3): 516-24 e7.

50. Zarse K, Ristow M. A mitochondrially encoded hormone ameliorates obesity and insulin resistance. *Cell metabolism*. 2015,21(3):355-6.

51. Q.Qin ve ark.'kroner endotel disfonksiyonu olan hastalarda dolaşımdaki Mots-c düzenleyicilerinin aşağı regülasyonu 'Int. J. Cardiol., cilt. 254, s.23-27,01 2018.

52. N.Fuku ve diğerleri'Mitokondriyal Türevli Peptide Mots-c: olağan üstü uzun ömürlü bir oyuncu mu?, Aging Cell, cilt 14 Ağustos 2015

53. Markiewicz-Żukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, Naliwajko SK, Sawicka D, Car H. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U-87 MGMG human glioblastoma cell line. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2013 Dec 27;13(1):50.Availablefrom: https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-13-50

54. Borawska MH, Naliwajko SK, Moskwa J, Markiewicz-Żukowska R, Puścion-Jakubik A, Soroczyńska J. Anti-proliferative and anti-migration effects of Polish propolis combined with Hypericum perforatum L. on glioblastoma multiforme cell line U87MG. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2016 Dec 20;16(1):367.

Availablefrom:http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-016-1351-2

55. Yang Y, Wang Q, Song D, Zen R, Zhang L, Wang Y, Yang H, Zhang D, Jia J, Zhang J, Wang J. Lysosomal dysfunction and autophagy blockade contribute to autophagy-related cancer suppressing peptide-induced cytotoxic death of cervical cancer cells through the AMPK/mTOR pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 2020, 39(1): 197.

56. Yamada H, Tada-Oikawa S, Uchida A, Kawanishi S. TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 265(1): 130-3.

57. Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N. Nutritional control of aging. *Exp Gerontol* 2003, 38(1-2): 47-52.

58. Orentreich N, Matias JR, DeFelice A, Zimmerman JA. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr* 1993, 123(2): 269-74.

59. Singh, Rumani; Letai, Anthony; Sarosiek, Kristopher (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. Nature Reviews Molecular Cell Biology, (), –. doi:10.1038/s41580-018-0089-8

60. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* 2016, 48(7): e245.

8.EKLER

Ek 1 Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. Sefa Kızıldağ

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**goaek@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	6954-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Mitokondriyal Derive Peptidlerin (MOTS-c) Glioma U87 Hücre Hattında Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin in vitro Araştırılması**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Sefa Kızıldağ Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ☒

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2022/04-25**	**Tarih:02.02.2022**
	Prof.Dr. Sefa Kızıldağ'ın sorumlusu olduğu **"Mitokondriyal Derive Peptidlerin (MOTS-c) Glioma U87 Hücre Hattında Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin in vitro Araştırılması"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

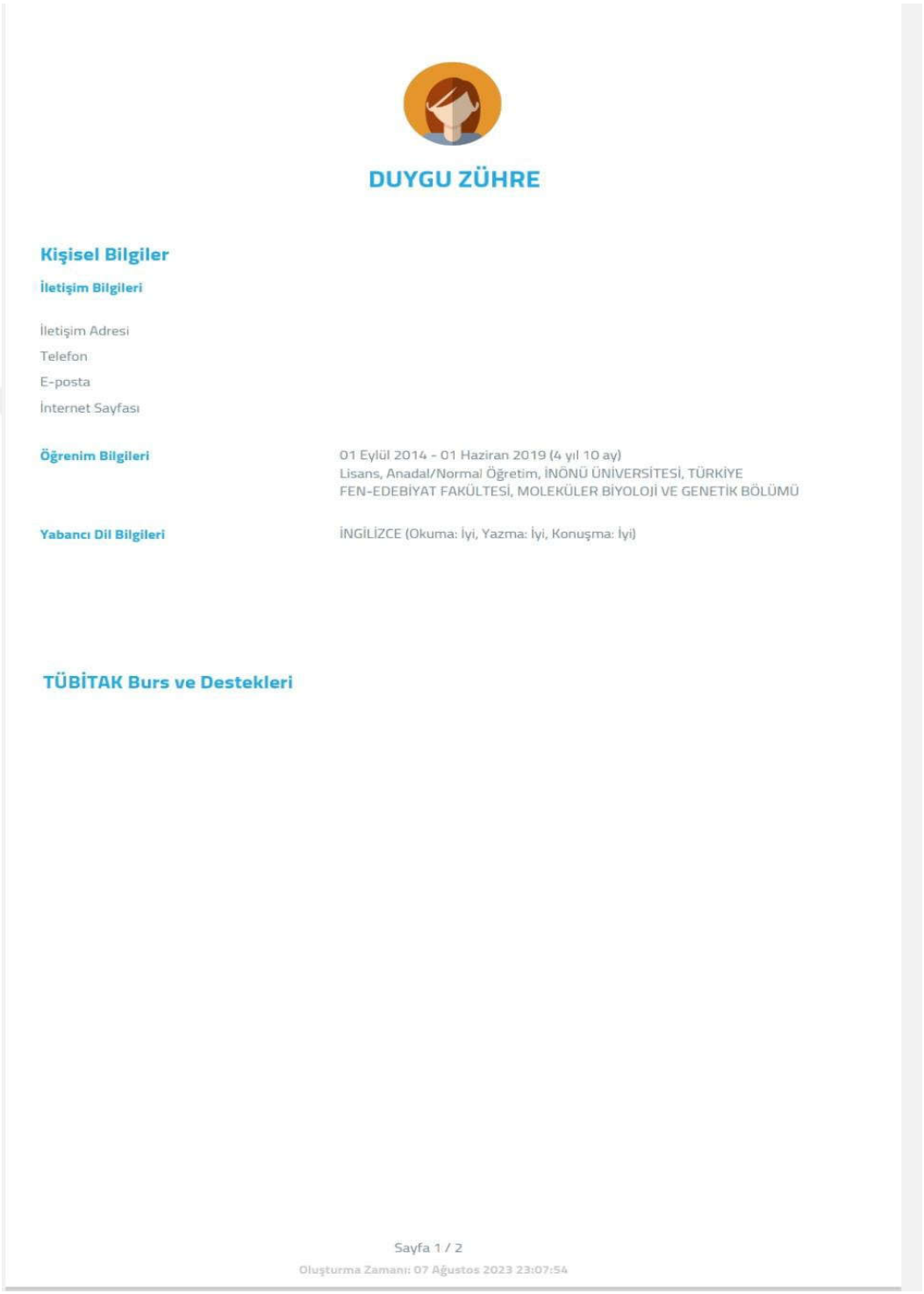
ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Emel Çalıkoğlu (Başkan Yardımcısı)	Prevantif Onkoloji	Onkoloji Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aliye Akcalı	Periodontoloji	Diş Hekimliği Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	

Ek 2. Arbis Özgeçmiş



DUYGU ZÜHRE

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi
Telefon
E-posta
İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Eylül 2014 - 01 Haziran 2019 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Sayfa 1 / 2
Oluşturma Zamanı: 07 Ağustos 2023 23:07:54

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0